
1 SEDIMENTACE ČERVENÝCH KRVINEK (SUSPENZNÍ STABILITA KRVE)

Klíčová slova

Sedimentace, suspenzní stabilita krve, suspenze, Helmholtzova elektrická dvojvrstva, FW, SE, šikmá sedimentace, faktory ovlivňující sedimentaci, nesrážlivá krev.

Pracovní část

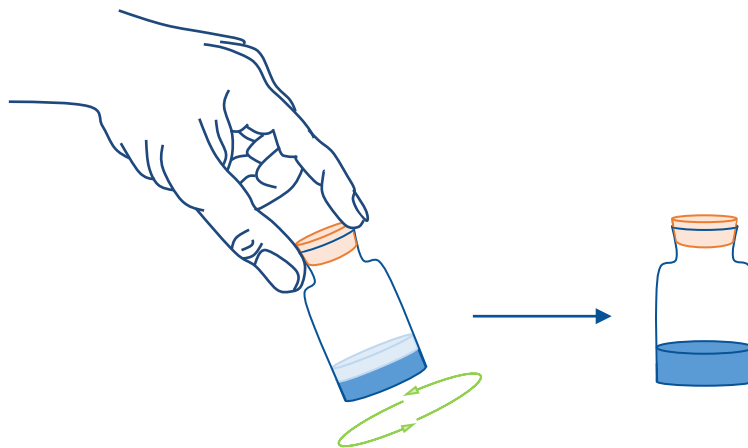
Potřeby

Stojan se sedimentačními pipetami, sada pro určení sedimentace (plná lidská krev, lidská krev – plazma nahrazena fyziologickým roztokem), plná hovězí krev, plná koňská krev, koňská krev – nahrazená plazma fyziologickým roztokem).

Postup práce

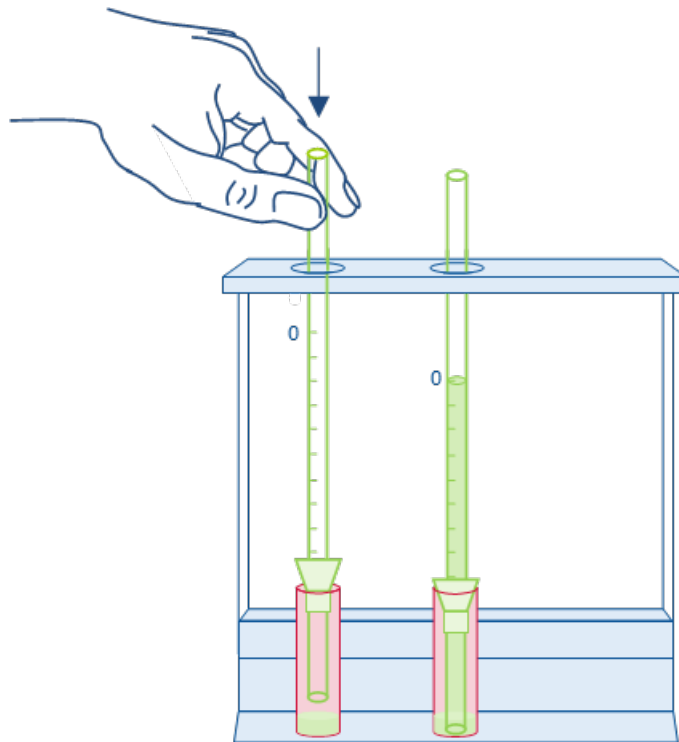
Striktní zásada pro práci s krví: pracujeme pouze v gumových rukavicích!

1. Pomocí kapátka doplníme do zkumavka přibližně 2 ml krve (po černou rysku); každý vzorek má svoji zkumavku i svoje kapátko.



Obrázek 12-1 Je velice důležité promíchat každou krev těsně před použitím. Zvláště koňská krev sedimentuje velice rychle, a proto při nedostatečném zamíchání by docházelo k hodnocení v podstatě pouze plazmy. Krev míchejte pomalými krouživými pohyby, v opačném případě dojde ke vzniku směsi krve a vzduchu, která ovlivní průběh pokusu.

2. Levou rukou uchopíme naplněnou zkumavku a pravou rukou pipetku mírným tlakem zasuneme kolmo dovnitř zkumavky (kalíšku)s krví. Vytvoří se tak podtlak.
3. Při správném postupu sloupec krve postupně vystoupá po značku 0. Zkumavku „zacvakneme“ do příslušného stojanu.
4. V časových intervalech odečítáme v milimetrech rychlost sedimentace krevního sloupce erytrocytů, zapíšeme do grafu v protokolu.



Obrázek 12-2 Správné nasátí krve do Westergrenovy pipety.

Komentář: Automatickou pipetu přitlačíme ke kalíšku se vzorkem tak, aby vznikl v kalíšku přetlak. Při plnění kalíšku je potřeba věnovat pozornost zvláště vhodnému množství krve. Při přeplnění kalíšku může dojít po vsunutí pipety k vylití vzorku.

Hodnocení a výsledky

Tabulka 12-1 Zapište typy hodnocené krve a sedimentaci v mm po uplynutí dané doby.

Vzorky					
Čas
15 minut					
30 minut					
45 minut					
60 minut					

Tabulka 12-2 Fyziologické hodnoty sedimentací po odečtu nejméně 1 h.

Typ	Sedimentace
Muži:	2 - 8 mm/h
Ženy:	7 - 12 mm/h
Novorozenci:	2 mm/h
Kojenci:	4 - 8 mm/h

Závěr

Popište rozdílné průběhy sedimentací a zdůvodněte příčinu.

2 OSMOTICKÁ REZISTENCE ERYTROCYTŮ

Klíčová slova

Osmotický tlak, izotonicita, hypotonicita, hypertonicita, hemolýza.

Pracovní část

Potřeby

stojan s 13 zkumavkami, nesrážlivá krev, destilovaná voda, fyziologický roztok, 1 % roztok NaCl, 0,9 % NaCl, kapátko, 2 pipety, emitní miska.

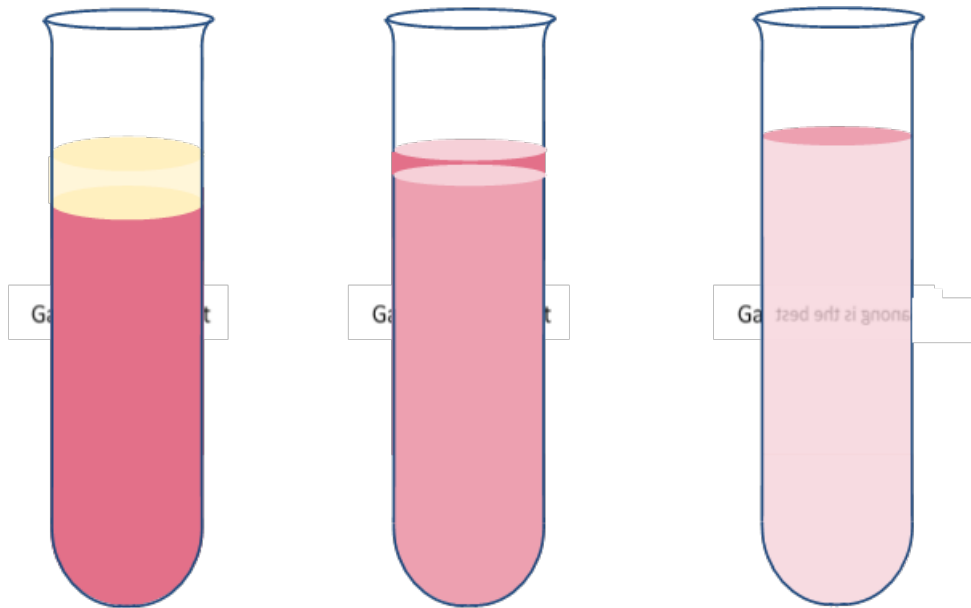
Postup práce

1. Do 12 zkumavek napipetujte 1 % roztok NaCl v následujících množstvích: 6,3; 6,0; 5,7; 5,4; 5,1; 4,8; 4,5; 4,2; 3,9; 3,6; 3,3; 3,0 ml.
2. Doplňte zkumavky destilovanou vodou do celkového objemu 10 ml.
3. Do 13. zkumavky napipetujte 10 ml fyziologického roztoku (0,9 %NaCl).
4. Zkumavky s roztoky mírně zamíchejte.
5. Krev v lahvičce opatrně promíchejte a pomocí kapátka do každé zkumavky kápněte 2 kapky krve. Zkumavky palcem v rukavici uzavřete, pomalu překlňte a vraťte do původní polohy (opravdu pomalu, nechceme vytvořit fyzikální hemolýzu). Nechejte minimálně 30 minut reagovat.
6. Po daném čase subjektivně stanovte přítomnost hemolýzy. Jako kontrolu použijte zkumavku s fyziologickým roztokem.

Hodnocení a výsledky

Zakreslete do zkumavek stav hemolýzy - Tabulka 13-2).

- Nepřítomnost hemolýzy: Nehemolyzované erythrocyty tvoří neprůhlednou suspenzi. Nad touto suspenzí v důsledku sedimentačního efektu se nachází tenká čirá do žluta zbarvená vrstva čisté plazmy
- Částečná hemolýza: Hemolyzované erythrocyty mění barvu vrstvy plazmy ze žluté na jemně růžovou. Její intenzita závisí od úrovně hemolýzy v roztoku
- Úplná hemolýza: Zkumavka obsahuje průhledný, rovnoměrně růžově zbarvený roztok. Není patrná žádná zákal na dně zkumavky.



Obrázek 13-1 Stav hemolýzy ve zkumavkách.

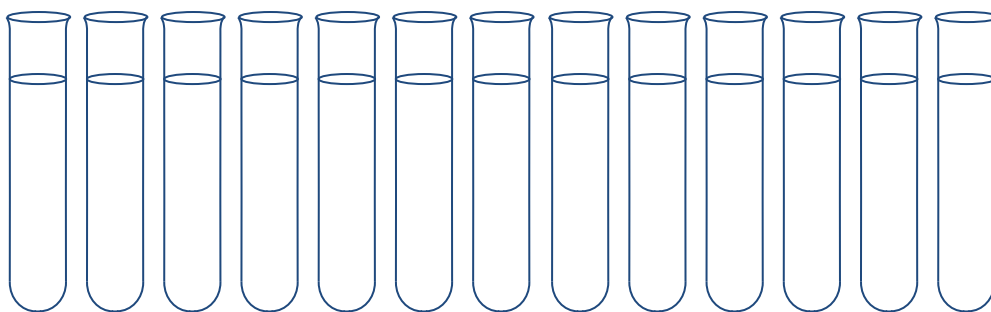
Komentář: Vlevo nepřítomná hemolýza. Uprostřed částečná hemolýza. Vpravo úplná hemolýza.

Tip: Položte za zkumavky list s textem a sledujte, zda lze přes zkumavku text číst. Pokud ano, znamená to, že v této zkumavce již probíhá hemolýza (nejčitelnější text je ve zkumavce s úplnou hemolýzou, žádné membrány odolných erytrocytů nebrání viditelnosti textu).

Určení minimální, maximální rezistence a rezistentní šíře

- **Minimální osmotická rezistence:** Odečítá se na první zkumavce s načervenalým zbarvením plazmy nad neprůhledným sedimentem. V této zkumavce dochází k hemolýze nejméně odolných erytrocytů.
- **Maximální osmotická rezistence:** Odečítá se na poslední zkumavce se zákalem u dna. Ten je tvořen nejvíce odolnými erytrocyty.
- **Osmotická rezistentní šíře:** Jedná se o rozmezí mezi hodnotou minimální a maximální osmotické rezistence.

Tabulka 13-1 Zanešte do tabulky přítomnost hemolýzy v jednotlivých zkumavkách



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Koncentrace Roztoku NaCl [%]	0,63	0,6	0,57	0,54	0,51	0,48	0,45	0,42	0,39	0,39	0,33	0,3	0,9
Přítomnost hemolýzy [ANO/NE]													

Závěr

Shrňte všechny naměřené výsledky a stručně popište fyziologické jevy, které se s nimi pojí. Popište, zda naměřené hodnoty byly ve fyziologickém rozmezí. Jaké nemoci jsou spojeny se zvýšenými nebo sníženými hodnotami osmotické rezistence?

3 STANOVENÍ POČTU ERYTROCYTŮ

Klíčová slova

Erytrocyty, leukocyty, trombocyty, diferenciální počet, retikulocyty, anémie, erythrocytopenie, polyglobulie, hematokrit, icterus neonatorum.

Pracovní část

Potřeby

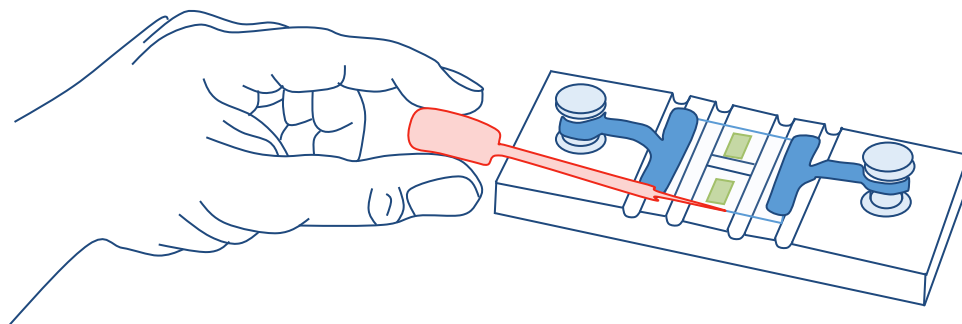
Bürkerova komůrka, krycí sklíčko, mikroskop, banička se zátkou, dávkovací mikropipety, kapátko s jemným hrotem, Hayemův roztok, emitní miska.

Postup práce

Striktní zásada práce s krví:

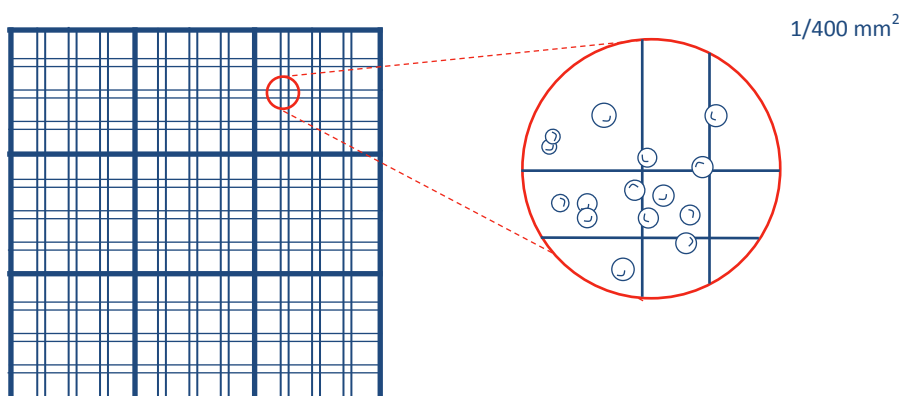
Pracujte pouze na vybraných místech. Pracujte pouze v gumových rukavicích a plášti.

1. Nasadte si rukavice a odměřte mikropipetou 4950 μ l Hayemova roztoku. Roztok aplikujte do připravené baňky. Použitou špičku z mikropipety odstraňte do emitní misky. Uzavřete Hayemův roztok a odložte.
2. Krouživými pohyby opatrně promíchejte nádobu s krví tak, aby se erytrocyty v kapalině rovnoměrně rozložili. Pomocí druhé mikropipety přeneste 25 μ l krve do baňky s Hayemovým roztokem. Použitou špičku z mikropipety odstraňte do emitní misky, uzavřete nádobu s krví a odložte.
3. Baňku s Hayemovým roztokem a krví uzavřete a krouživými pohyby promíchejte její obsah (důvodem je snaha předejít vzniku bublin). Dbejte na to, aby se roztok nedostal do kontaktu se zátkou baňky.
4. Nachystejte si Bürkerovu komůrku. Ta obsahuje pohyblivá ramena a aretační šroubky, pomocí kterých upevníte krycí sklíčko na střed komůrky. Pohledem proti světlu se ujistěte, že komůrka a sklíčko jsou čisté. V případě potřeby je přetřete buničitou vatou.
5. Kapátko s jemným hrotem umístěte ke hraně krycího sklíčka. Malým tlakem na mikropipetu aplikujte krev mezi dno Bürkerovy komůrky a sklíčko. Vizually ověřte, že kapalina vyplnila celou část mezi sklíčkem a komůrkou (Obrázek 14-1).



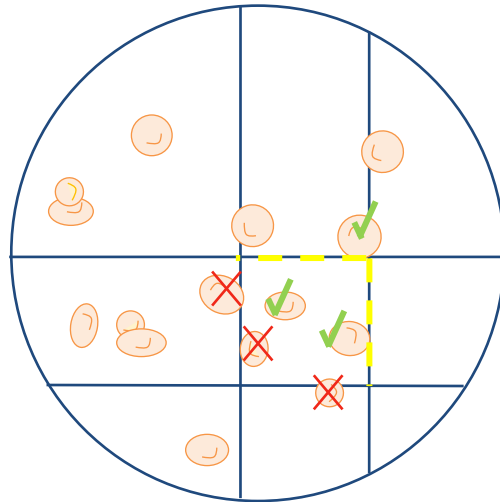
Obrázek 14-1 Názorná ukázka aplikace vzorku krve na Bürkerovu komůrku.

6. Komůrku se vzorkem umístěte na vyhrazené místo na mikroskopu, nastavte okulár na maximální zvětšení (100x) a začněte ostřit. Dávejte si pozor, abyste sklíčko nepromáčkli. Na obrazovce počítače by se měly objevit erythrocyty a hrany vyrytých čtverců počítací mřížky (Obrázek 14-2).



Obrázek 14-2 Ukázka mřížky Bürkerovy komůrky s udanou plochou malého čtverce.

7. Erythrocyty počítejte na 40 malých čtverečkách. Výsledek z každého čtverce zanepte do tabulky ve výsledcích.
8. Počítání provádějte podle pravidla horní/pravý nebo dolní/levý – tj. budete počítat ty erythrocyty, které se nachází uvnitř čtverce a dotýkají se zvenku horní a pravé hrany čtverce nebo ty, které se zvenku dotýkají dolní a levé hrany čtverce (Obrázek 14-3).



Obrázek 14-3 Ukázka počítání erytrocytů, kdy kromě erytrocytů uvnitř čtverečku uvažujeme také ty, které se dotýkají zvenku horní a pravé hrany.

9. Stanovte průměrný počet erytrocytů v jednom čtverečku a přepočítejte ho na objem 1 litr.

3.1 Hodnocení a výsledky

1. Výpočet počtu erytrocytů přímou metodou

Zaznamenávejte napočítané erytrocyty z každého čtverečku z Bürkerovy komůrky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										

1.a Údaje potřebné pro výpočet

Impedanční metoda

Srovnejte vaši vypočtenou hodnotu s hodnotou z impedančního měření.

2. Výpočet počtu erytrocytů impedanční metodou

Zaneste výsledky získané z automatického analyzátoru a porovnejte je s vašimi naměřenými výsledky.

Impedanční měření [ery/l]	Přímá metoda počítání [ery/l]
.....[ery/l][ery/l]

Jaké mohou být důvody rozdílu mezi vašimi výsledky a naměřenými výsledky z automatu?

Závěr

Shrňte všechny naměřené výsledky a stručně popište fyziologické jevy, které se s nimi pojí. Pokud jste naměřili jiné než fyziologické hodnoty, zamyslete se nad možnými příčinami. Jaká je příčina rozdílu počtu erytrocytů u žen a mužů?

4 URČENÍ KREVNÍ SKUPINY SKLÍČKOVOU METODOU

Klíčová slova

Antigen, protilátka, aglutinogen, aglutinin, aglutinace, Rh faktor, fetální erythroblastóza.

Pracovní část

Potřeby

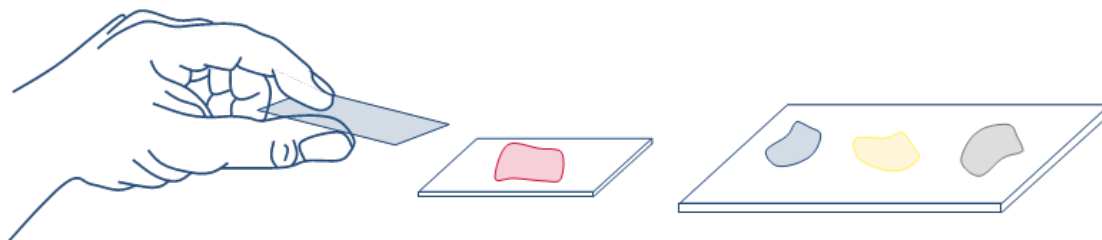
Standardní séra skupiny anti A, anti B a anti AB, nesrážlivá krev, emitní miska, miska s dezinfekčním roztokem.

Postup práce

Striktní zásada pro práci s krví:

Pracujte pouze ve vyhrazeném prostoru. S krví se manipuluje pouze v gumových rukavicích.

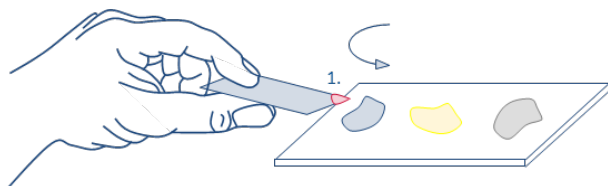
1. Před začátkem práce zkontrolujte baňky se séry (datum výroby, průhlednost, souhlasné označení a barvy sér).
2. Na podložní sklíčko aplikujte jednotlivá séra. Každé sérum je rozlišitelné podle svého barevného označení (modrá – anti A sérum, žlutá – anti B sérum, průhledná – anti AB sérum). Ujistěte se, že na sklíčko nedochází k mísení sér (Obrázek 15-5 vpravo).
3. Krev v lahvičce opatrně promíchejte a pomocí kapátka aplikujte 1-2 kapky krve na další separátní sklíčko (Obrázek 15-5). Uzavřete lahvičku s krví a odložte.



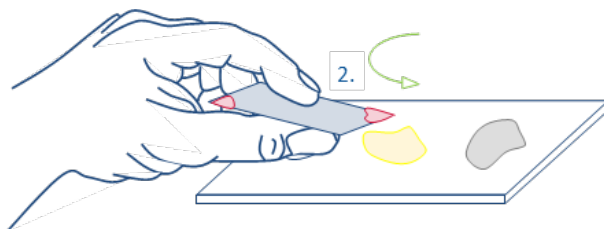
Obrázek 15-1 Počáteční příprava krve a sér na oddělená sklíčka. Dejte pozor, aby na sklíčku s jednotlivými séry nedošlo k jejich vzájemnému promíchání.

4. Připravte si další podložní sklíčko pro přenos krve do sér. Do kapky krve namočte roh podložního sklíčka a přeneste jej na první sérum. Krouživým pohybem obě kapaliny smíchejte. Poté pootočte sklíčko a dalším čistým rožkem přeneste krev na další sérum (Obrázek 15-5, Obrázek 15-6). Množství krve a séra by mělo být v poměru asi 1:10.

Vždy použijte čistý rožek tak, aby nedošlo ke smíchání sér.



5. Pozorujte reakci na jednotlivých sérech a výsledky překreslete do připravených obrázků.



Hodnocení a výsledky

Obrázek 15-2 Pro míchání séra a krve použijte vždy jiný rožek tak, aby nedocházelo k promíchání jednotlivých sér.

Překreslete výsledky pokusu a určete typ testované krevní skupiny. Popište probíhající děje.

Pokus A			
Zakreslete výsledky reakce na sérech.			
	Sérum Anti A	Sérum Anti B	Sérum Anti AB
Výsledek pokusu: (Reakce/bez reakce)			
Krevní skupina: 			

Jakou krevní skupinu mohli mít rodiče majitele této krevní skupiny:

Pokus B

Zakreslete výsledky reakce na sérech.

	Sérum Anti A	Sérum Anti B	Sérum Anti AB
Výsledek pokusu: (Reakce/bez reakce)			
Krevní skupina:			
Jakou krevní skupinu mohli mít rodiče majitele této krevní skupiny:			

Závěr:

Shrňte všechny naměřené výsledky a stručně popište fyziologické jevy, které se s nimi pojí.

5 STANOVENÍ KONCENTRACE HEMOGLOBINU

Klíčová slova

Hemoglobin, hypochromie, hyperchromie, karbaminohemoglobin, karboxyhemoglobin, methemoglobin, průtoková cytometrie, spektrofotometrie.

Praktická část

Potřeby

Transformační roztok, zkumavka, kapátko, podložní sklíčko, mikropipeta 5000 μl , mikropipeta 20 μl , emitní miska, buničitá vata.

Obsah kyanidu draselného v transformačním roztoku z něj dělá vysoce toxickou látku při vdechování, styku s kůží a při požití! Mějte proto předměty které byste mohli potřísnit a posléze se jich dotýkat bez rukavic mimo pracovní místo (například sešity, tužky, mobil).

Před započítím práce si osoby provádějící cvičení pozorně přečteou pravidla pro zacházení s touto látkou.

Postup práce – spektrofotometrie

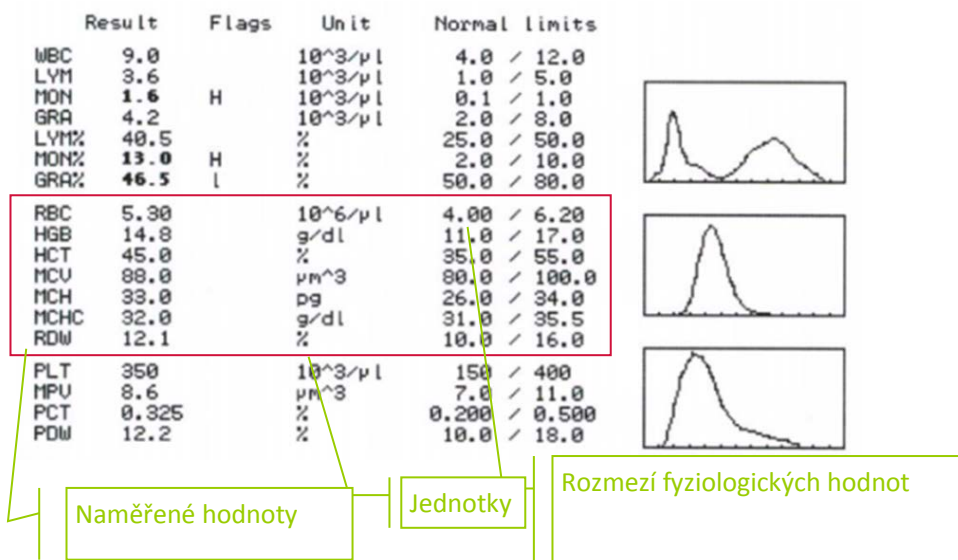
1. Zkontrolujte zapnutí přístroje *Spekol 11*.
2. Do přístroje zasuněte kyvetu se standardem (destilovaná voda) a zmáčkněte C (výstupem přístroje tak bude hodnota koncentrace v jednotkách mmol/l). Kyvetu vždy uchopujte z její matné (neprůhledné) strany. Průhledné části kyvety udržujte v maximální čistotě.
3. Stiskem tlačítka FAKT a následně POS a INC nastavte do paměti přístroje faktor pro přepočet absorbance na látkovou koncentraci hemoglobinu (molární absorpční koeficient methemoglobinkyanidu je $22,8 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Hodnota koeficientu je již upravena s ohledem na očekávané naředění krve transformačním roztokem v poměru 1:250 (20 μl krve a 5 ml transformačního roztoku).
4. Stiskem R vynulujte přístroj.
5. Do zkumavky odměřte 5 ml transformačního roztoku (mikropipeta se žlutým značením).

Upozornění: Student pracující s transformačním roztokem pracuje v modrých rukavicích se štítem před obličejem.

- Odměříte 20 μl krve (mikropipeta s modrým značením).
- Obsah mikropipety vyprázdníte do zkumavky s transformačním roztokem, opatrně promíchejte a čekejte, až dojde k hemolýze erytrocytů (přibližně 5 minut).
- Kyvetu naplníte pomocí kapátka příslušným roztokem a zasuňte ji do přístroje. Po ustálení hodnot na displeji odečtete výslednou hodnotu molární koncentrace hemoglobinu (mmol/l). Hodnotu přepočtete na hmotnostní koncentraci [g/l] vynásobením hodnoty molární koncentrace koeficientem 16,11. Koeficient je odvozen z molekulární hmotnosti hemoglobinu ($M_{\text{Hb}} \approx 64\,440 \text{ g/mol}$). Fyziologicky má hemoglobin tetramerní strukturu. Po reakci s transformačním roztokem však vzniká stabilní methemoglobinkyanid, kterého koncentraci reálně naměříme. Struktura této sloučeniny je však monomerní, proto uvažujeme pouze 1/4 molekulární hmotnosti tetramerního hemoglobinu ($M_{\text{Hbk}} = 16\,110 \text{ g/mol}$). Matematická operace pro převod koncentrace z jednotek mmol/l na mol/l je evidentní, čímž se dostáváme ke zmíněnému koeficientu 16,11.

Postup práce – impedanční cytometrie

Měření na hematologickém analyzátoru *Mythic 18* provádí vyučující. Výstupem analýzy je tištěná zpráva (Obrázek 16-2). Přístroj je kalibrován na hodnocení červené krevní řady (viz rámeček).



Obrázek 16-1 Výstupní zpráva z analyzátoru *Mythic 18*. RBC – erytrocyty (red blood cells), HGB – hemoglobin, HCT – hematokrit, MCV – střední objem erytrocytů (mean cell volume), MCH – střední množství hemoglobinu obsažené v jedné červené krvince erytrocytu (mean corpuscular hemoglobin), MCHC - střední koncentrace Hb v erytrocytech (mean corpuscular hemoglobin concentration), RDW - anizocytóza erytrocytů (red cell distribution width).

Hodnocení a výsledky

Hodnocení výsledků			
Proveďte spektrofotometrické i impedanční měření koncentrace. Výsledky měření srovnajte.			
Metoda měření	Naměřená hodnota (číslo)	Naměřená hodnota (fyzikální jednotka)	Fyzikální Veličina
Spektrofotometrie			
Impedanční cytometrie			

Závěr

Porovnejte hodnoty naměřené a spočítané pomocí spektrofotometrické metody a impedanční cytometrie. Jde o fyziologické hodnoty, pokud ne, na jaké onemocnění mohou poukazovat?