

FIZIOLOGIJA KRVI

VJEŽBA 2



- Eritrociti
- Određivanje broja eritrocita
- Određivanje hematokritske vrednosti
- Sedimentacija eritrocita
- Određivanje brzine taloženja eritrocita metodom po Westergreen-u
- Ponašanje eritrocita u hipotoničnim, izotoničnim i hipertoničnim rastvorima
- Hemoliza
- Ustanovljavanje hemolize u različitim uslovima
- Osmotska otpornost eritrocita

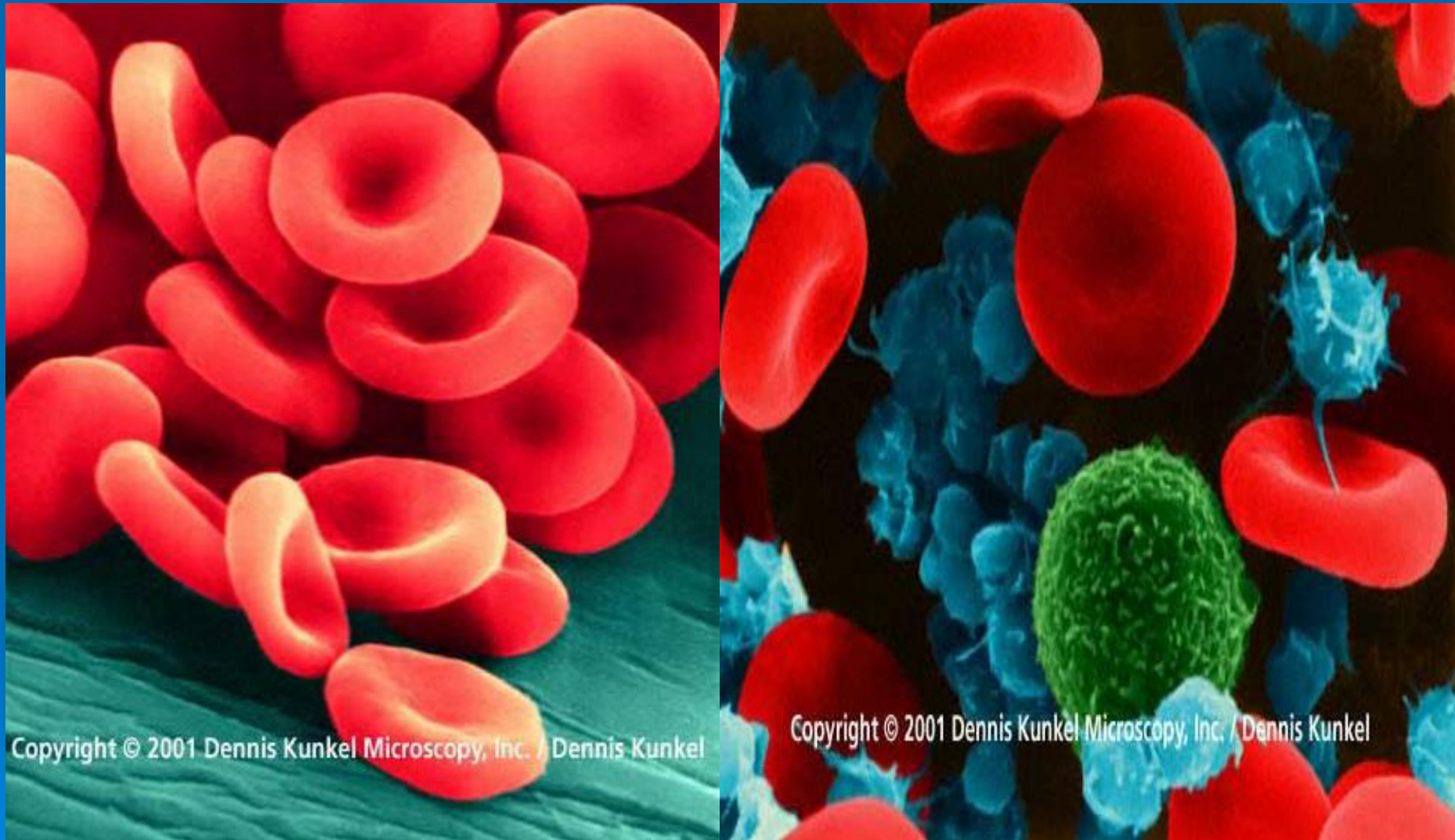
Eritrociti

- Eritrociti su crvene krvne ćelije koje nastaju u koštanoj srži i u slezini.
- Životni vek im je 120 dana, a razgrađuju se u jetri.
- Eritrociti su bezjedarne ćelije (osim kod ptica) bikonkavnog oblika sa zaobljenim ivicama.
- Najvažnija uloga eritrocita je transport kiseonika od pluća do tkiva i ugljen dioksida od tkiva do pluća, što se obavlja preko belančevine hemoglobina.
- Broj eritrocita u krvi zavisi od vrste životinje, mada i kod iste vrste varira u zavisnosti od pola, starosti životinje, rase, ambijentalnih uslova, ishrane i drugih faktora.

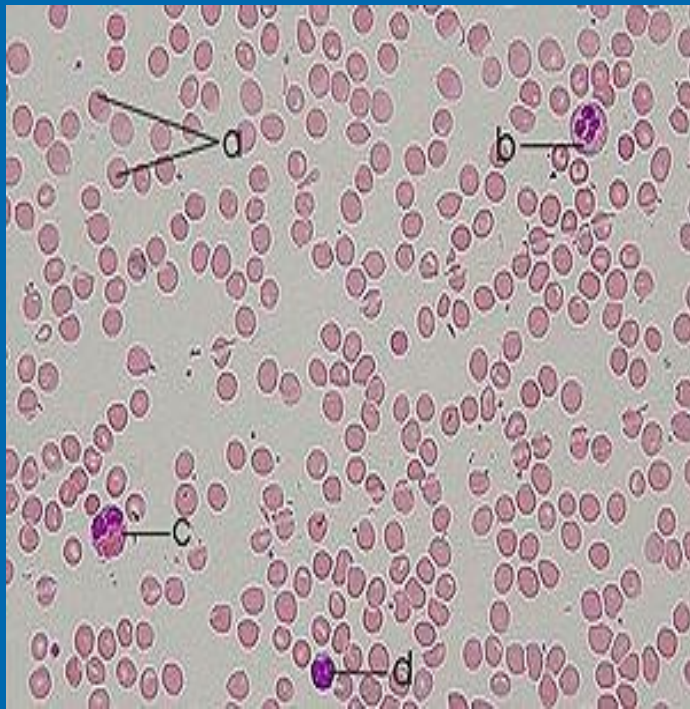
Broj eritrocita kod različitih vrsta u 1 litri krvi

Goveče	6-8	X	10^{12}
Ovca	10-13	X	10^{12}
Koza	13-15	X	10^{12}
Konj (punokrvni)	9-12	X	10^{12}
Konj (tegleći)	7-10	X	10^{12}
Svinja	6-8	X	10^{12}
Pas	6-8	X	10^{12}
Mačka	6-8	X	10^{12}
Kokoška	2,5-3,2	X	10^{12}
Kunić	5,5-6,5	X	10^{12}
Pacov	6-7,5	X	10^{12}
Ribe	1-3,2	X	10^{12}
Čovek-muškarac	4,8-5,5	X	10^{12}
Čovek-žena	4-4,5	X	10^{12}

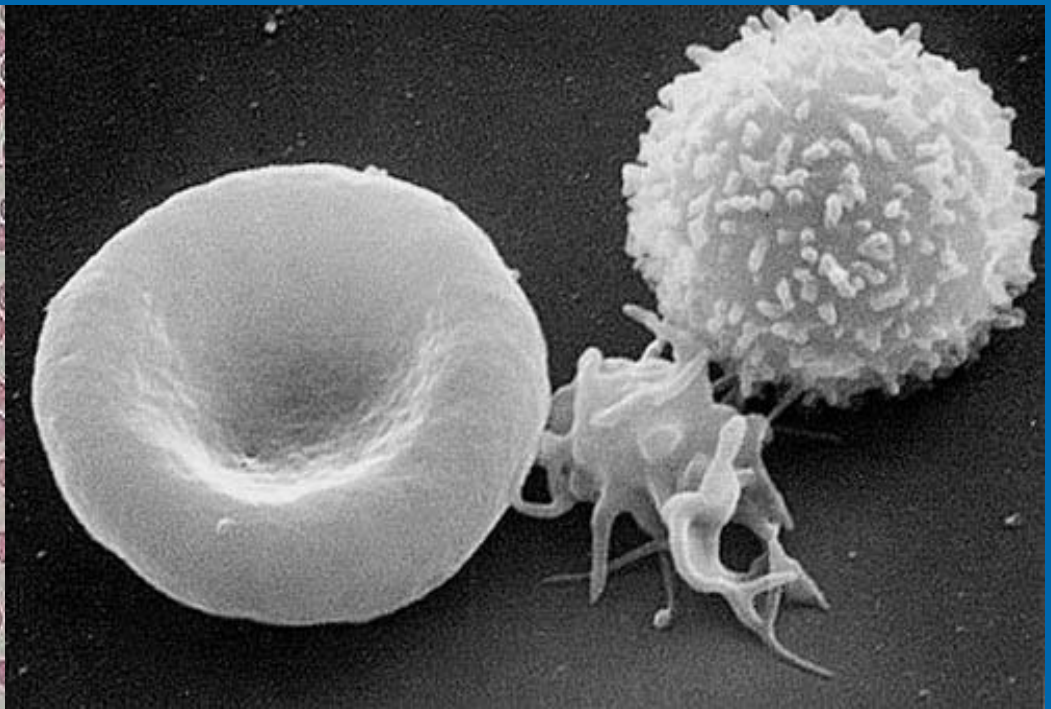
Eritrociti



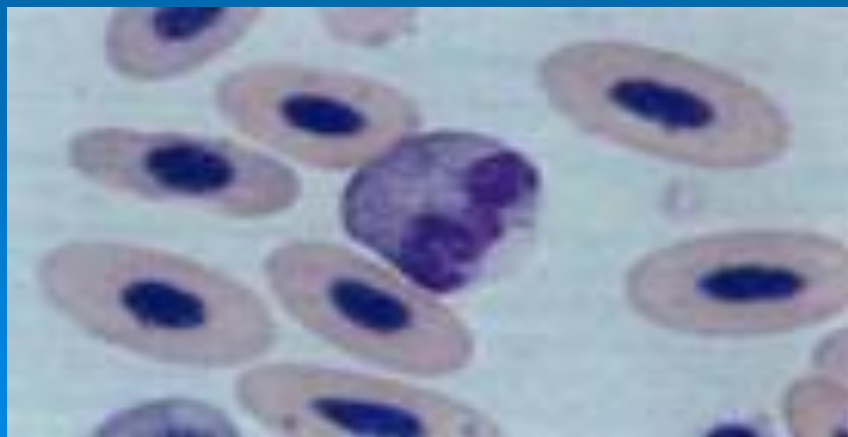
Skening elektronska mikroskopija a)eritrociti, b)stika normalne krvi čoveka



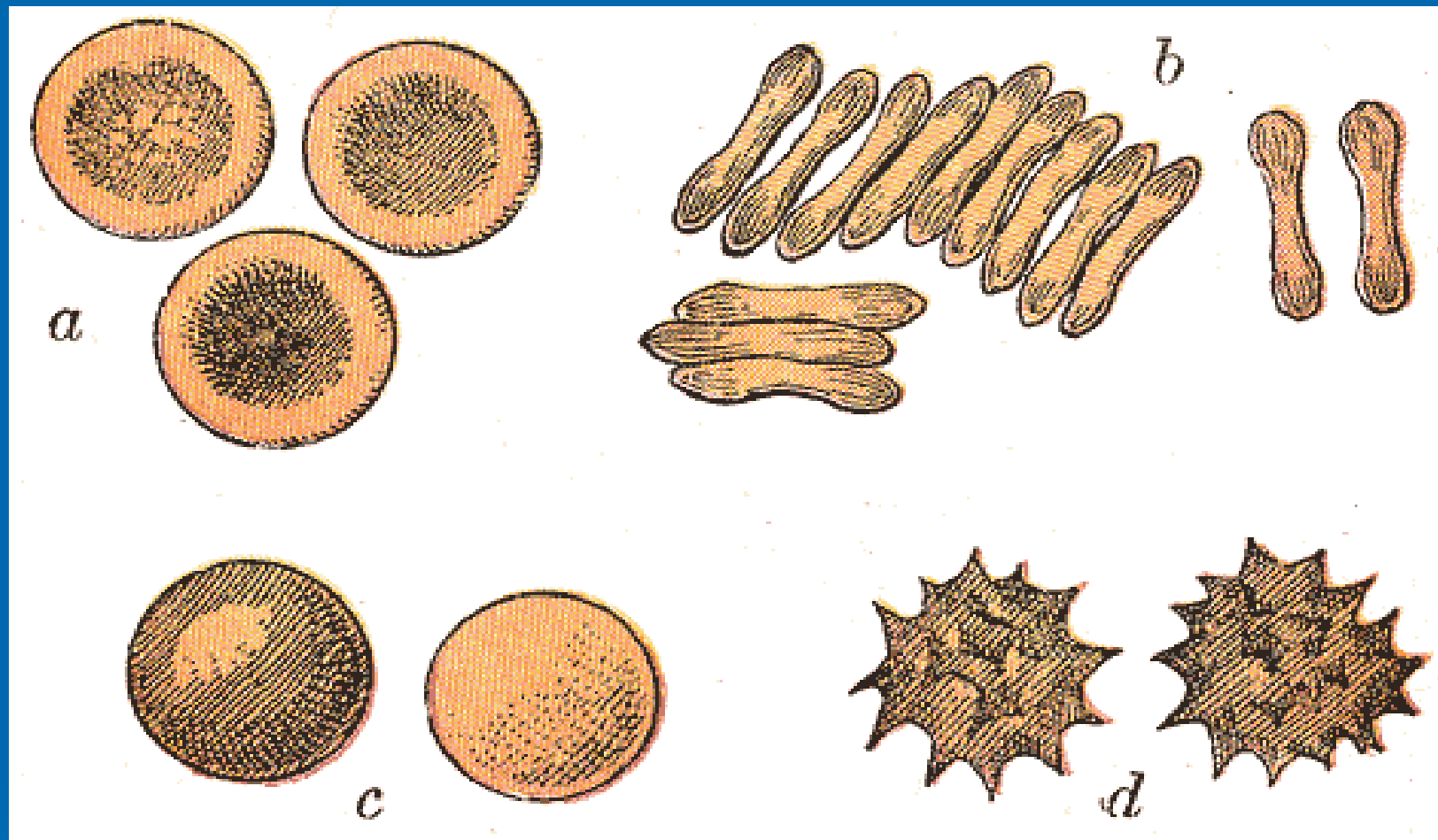
Razmaz humane krvi
a)eritrociti, b)neutrofili
c)eoziofil, d)limfocit



skening elektronska mikroskopija:
eritrocit, trombocit, bela krvna ćelija



eritrociti ptica

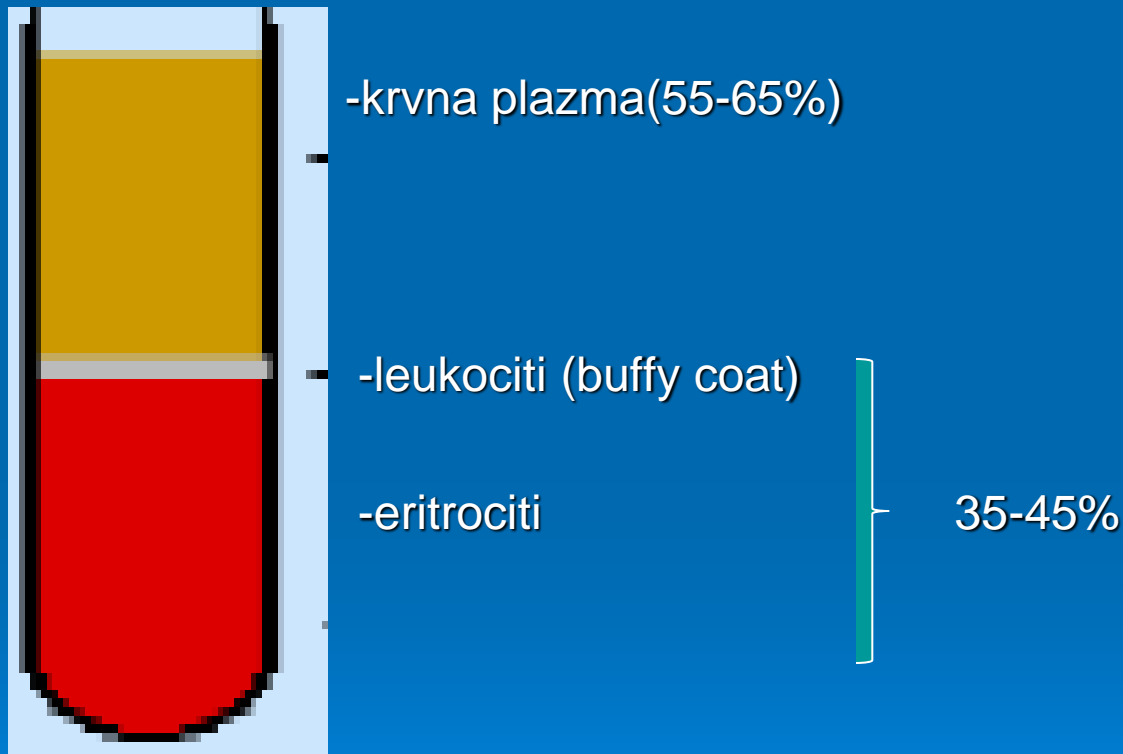


Eritrociti : a) pogled odozgo, pogled na površinu, b) profil
c) u vodi d) u soli

C i d se u normalnim uslovima ne nalaze u telu

Hematokritska vrednost

- Hematokritska vrednost je odnos tečne i korpuskularne komponente krvi, tj. hematokrit predstavlja zapreminski odnos uobličjenih krvnih elemenata u odnosu na plazmu.
- Hematokritska vrednost je pokazatelj promena volumena telesnih tečnosti.



- Kod domaćih životinja hematokritska vrednost zavisi, pre svega, od vrste životinje, broja i veličine eritrocita i fiziološkog stanja.
- Normalne vrednosti hematokrita kod domaćih životinja kreću se u granicama 0,35-0,45

Sedimentacija eritrocita

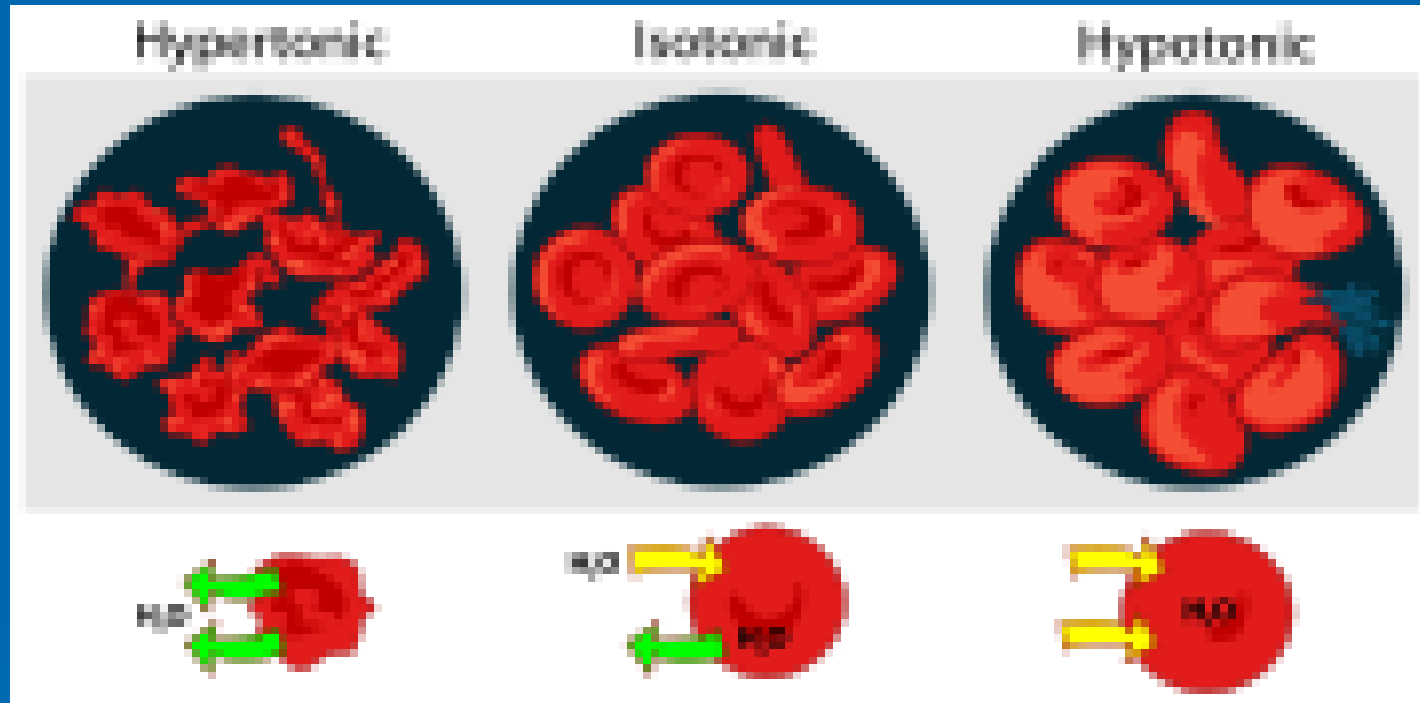
- Stabilnost eritrocita u krvi koja cirkuliše je velika zbog negativnog naelektrisanja membrane, usled čega se oni međusobno odbijaju, bez mogućnosti taloženja.
- Nakon vađenja krvi u epruvetu i dodatka antikoagulansa, eritrociti izvesno vreme lebde, a zatim se postepeno talože.
- Iznad taloga nalaze se leukociti, a tečni deo čini krvna plazma.
- Sedimentacija je nespecifična reakcija, ali brzina kojom se eritrociti talože je pokazatelj zdravstvenog stanja jedinke.
- Sedimentacija je ubrzana kod brojnih akutnih i hroničnih oboljenja (virusne i bakterijske infekcije, anemije, leukemija...)
- Sedimentacija ne ukazuje na određeno oboljenje, ali ukazuje da jedinka nije zdrava.
- Brzina taloženja eritrocita nije ista kod svih vrsta domaćih životinja, najveća je kod konja, a najmanja kod goveda.
- Faktori koji utiču na brzinu sedimentacije eritrocita : broj eritrocita, kvantitativan odnos belančevina krvne plazme, temperatura sredine...
- Povećana brzina taloženja eritrocita javlja se kod povećane koncentracije belančevina fibrinogena i globulina. To se verovatno dešava usled apsorbcije globulina na površinu eritrocita, čime se smanjuje njihova elektronegativnost i oni se ubrzano talože.

Brzina sedimentacije eritrocita

	Za 1 sat	Za 2 sata	Za 24 sata
Konj	69	71	74
Goveče	1	2	12
Ovca	1-4	3-8	6-15
Koza	1-4	3-10	9-24
Svinja	2-8	5-20	8-50
Pas	0,5-8	1-26	7-54
čovjek	2-6	7-15	-

- Sedimentacija se određuje u krvi uzetoj natašte zbog mogućeg uticaja unetih hranjivih materija i vode
- Brzina sedimentacije eritrocita određuje se na osnovu visine stuba krvne plazme iznad istaloženih eritrocita. Visina stuba krvne plazme se očitava posle 1, 2 i 24 sata. Sedimentacija eritrocita se određuje metodom po Westergreenu-u

Ponašanje eritrocita u hipotoničnim, izotoničnim i hipertoničnim rastvorima



- Eritrociti zadržavaju veličinu i oblik samo u onoj sredini gde je osmolaritet isti kao u krvnoj plazmi.
- Ako osmotski pritisak krvne plazme znatno opadne, dolazi do hemolize eritrocita, odnosno izlaska hemoglobina iz eritrocita.

Hipotonični rastvor

- U hipotoničnom rastvoru (rastvor koji ima niži osmotski pritisak nego u krvnoj plazmi), voda iz rastvora ulazi kroz polupropustljivu membranu u eritrocite. Eritrociti povećavaju zapreminu, ali pošto je mambrana do izvesne mere elastična, ona u jednom momentu puca i hemoglobin izlazi u spoljašnju sredinu. Nakon izlaska hemoglobina ostaje ćelijska stroma.



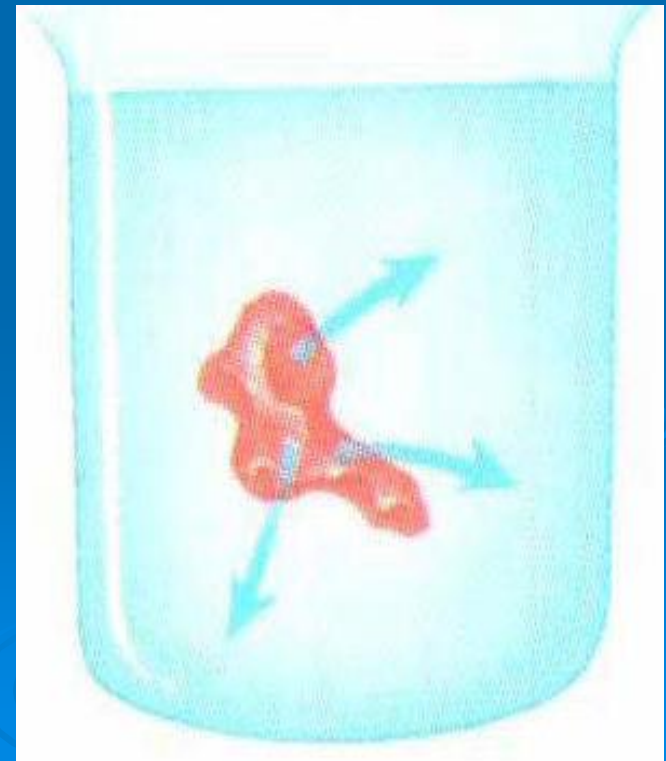
Izotonični rastvor

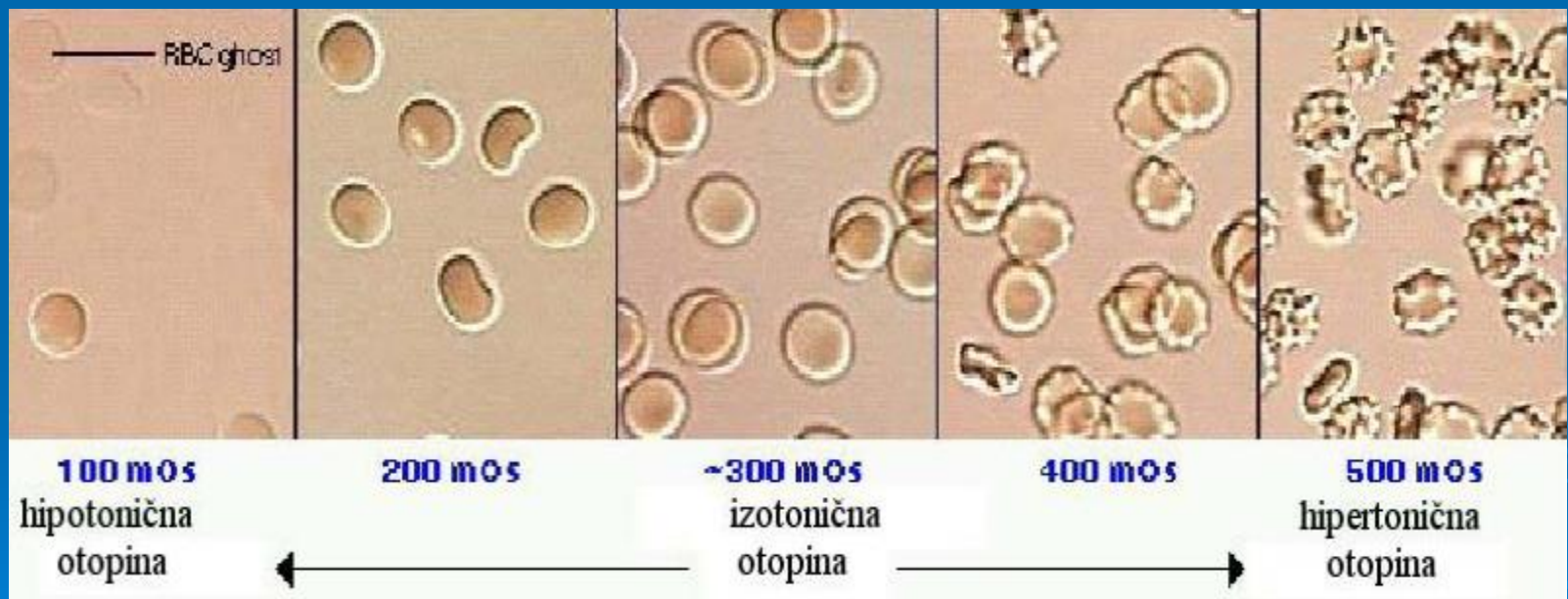
- Rastvori koji imaju sličan osmotski pritisak kao i krvna plazma, nazivaju se izotonični rastvori. Eritrociti u ovakvim rastvorima ostaju nepromenjeni, jer se količina vode koja difunduje u ćeliju i van nje nalazi u ravnoteži.
- Najčešće se koristi izotonični rastvor NaCl u koncentraciji od 0,85-0,9%. Pored ovog izotoničnog rastvora u upotrebi su i složeniji fiziološki rastvori kao što su : Ringerov, Lokov, koji osim NaCl sadže i druge soli (KCl, CaCl₂, NaHCO₃, glukozu.
- Ovi rastvori se upotrebljavaju kada jedinka izgubi veliku količinu tečnosti – često povraćanje, dijareja...



Hipertonični rastvori

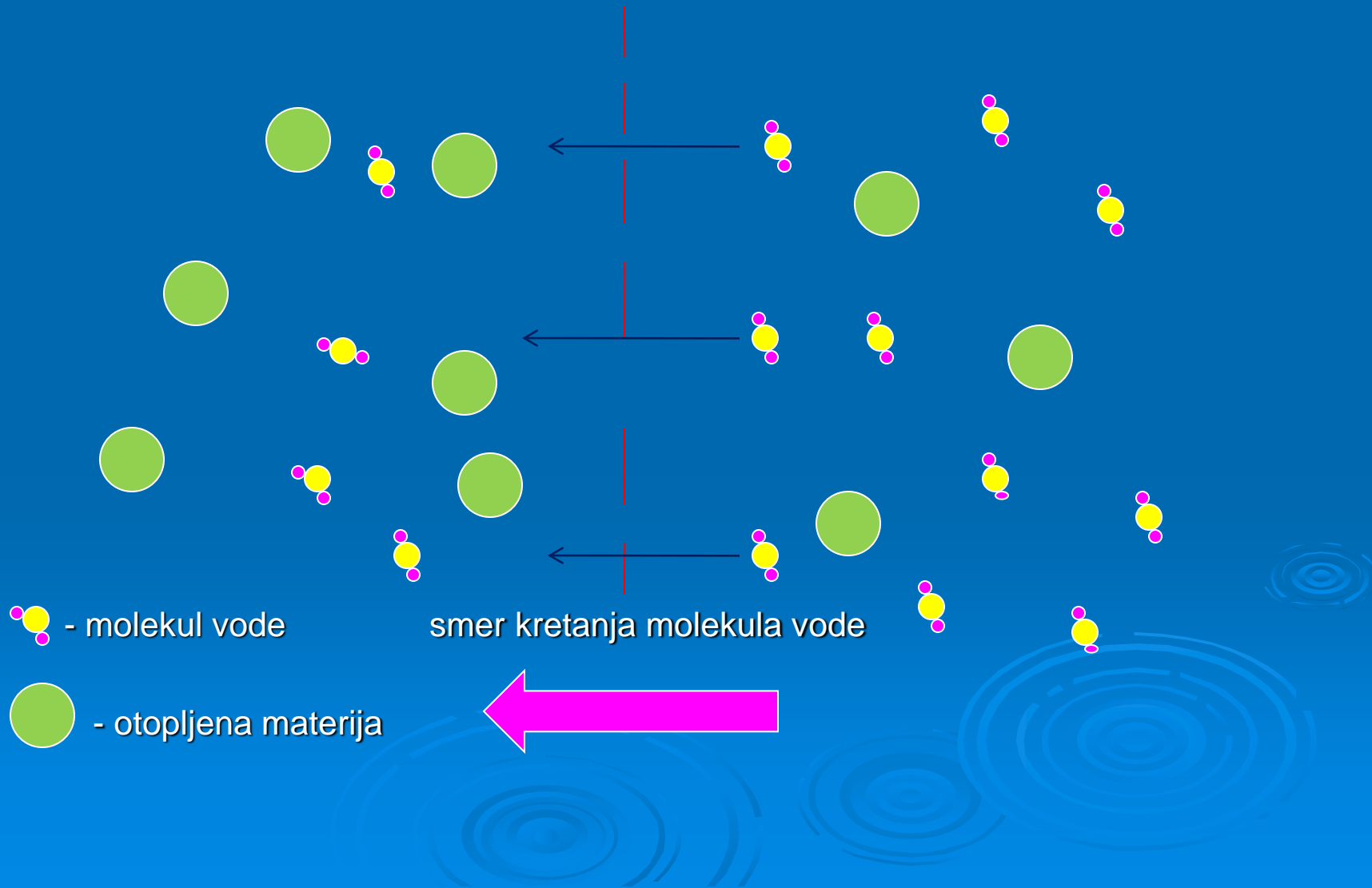
- Rastvori koji imaju veći osmotski pritisak od krvne plazme nazivaju se hipertonični rastvori.
- Eritrociti stavljeni u ovakav rastvor gube vodu, jer voda iz eritrocita odlazi u sredinu sa većim osmotskim pritiskom.
- Takvi eritrociti se smežuravaju.





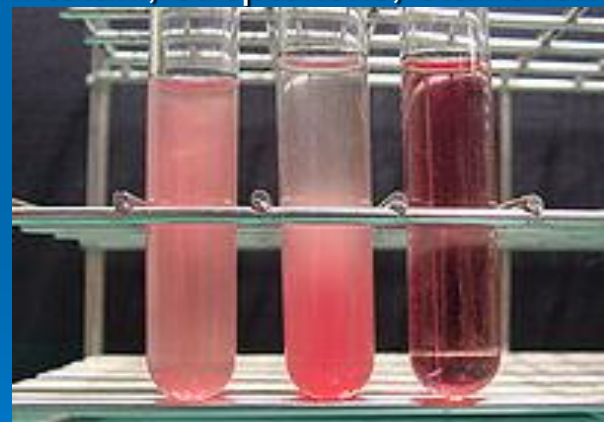
Osmoza

Osmoza je kretanje vode iz sredine sa nižom koncentracijom u sredinu sa većom koncentracijom kroz polupropustljivu membranu. Pritisak koji sprečava ulazak vode u eritrocite, zove se osmotski pritisak.



Hemoliza

- Hemoliza predstavlja prskanje opne eritrocita, što ima za posledicu izlazak hemoglobina iz eritrocita. Opna eritrocita je nepropustljiva za hemoglobin, ali pod uticajem raznih fizičkih i hemijskih faktora dolazi do oštećenja opne i izlaska hemoglobina. Hemoliza može biti izazvana različitim sredstvima:
 - 1) mehanička i fizička-mučkanje, mešanje, naglo zamrzavanje i odmrzavanje krvi, zračenje i zagrevanje
 - 2) osmotska-destilovana voda, rastvor ureje
 - 3) hemijska-etar, aceton, hloroform, benzin
 - 4) biološka-toksini mikroorganizama (Clostridium tetani, streptokoke, stafilokoke), pčelinji i zmijski otrov



- Hemolizirana krv je prozirna i svetlije boje za razliku od pune krvi koja je tamne boje i neprozirna.

Osmotska otpornost eritrocita

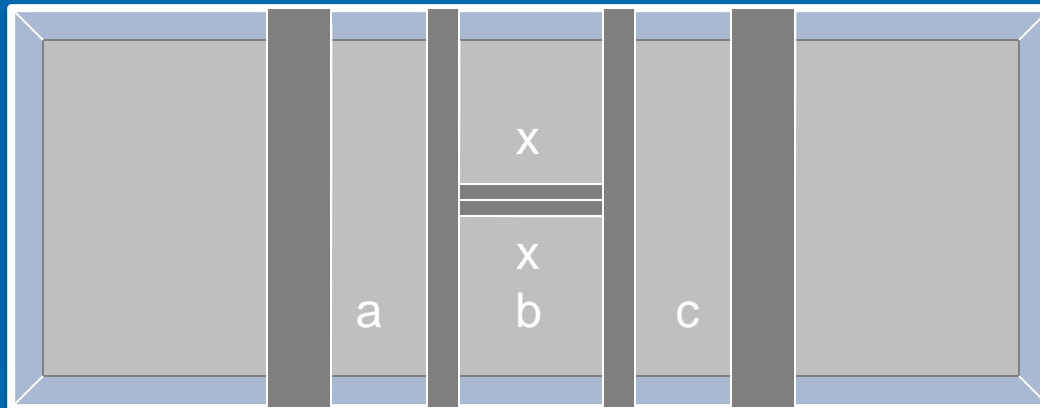
- Eritrociti u hipotoničnom rastvoru su izloženi poremećaju transporta vode kroz ćelijsku membranu.
- Sposobnost eritrocita da se suprotstave hemolitičkom delovanju hipotoničnih rastvora zove se osmotska otpornost ili rezistencija.
- Ona nije jednaka kod svih domaćih životinja
- Različita je i kod istih vrsta, pa i kod jedne jedinke zavisno od starosti eritrocita
- Retikulociti i mladi eritrociti imaju veću otpornost od starijih eritrocita.
- Raspon između minimalne i maksimalne rezistencije naziva se širina rezistencije eritrocita.
- Za kliničke svrhe se koristi određivanje otpornosti eritrocita prema hipotoničnim rastvorima natrijum-hlorida.

Rezistencija eritrocita kod pojedinih domaćih životinja (koncentracija NaCl u g/100ml)

Vrsta	hemoliza	
	minimalna	maksimalna
Konj	0,59	0,39
Goveče	0,59	0,42
Ovca	0,62	0,48
Svinja	0,74	0,45
Koza	0,62	0,48
Živina	0,41	0,28
Pas	0,45	0,36

Određivanje broja eritrocita

- Pribor : hemocitometar (komora za brojanje uobličanih elemenata krvi), melanžer za eritrocite, Hayem-ov rastvor (1g NaCl, 5g Na₂SO₄, 0,1g HgCl₂, 200 ml destilovane vode), vata, alkohol, injekciona igla, mikroskop

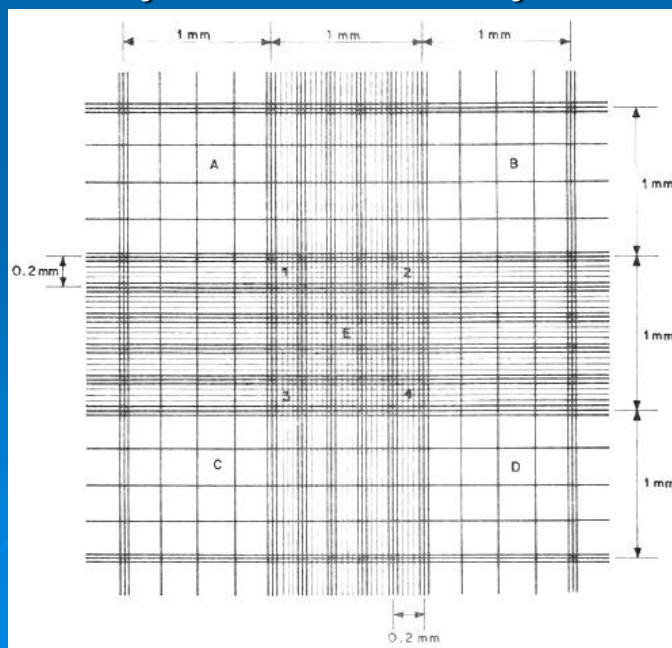


visina 1/10 mm



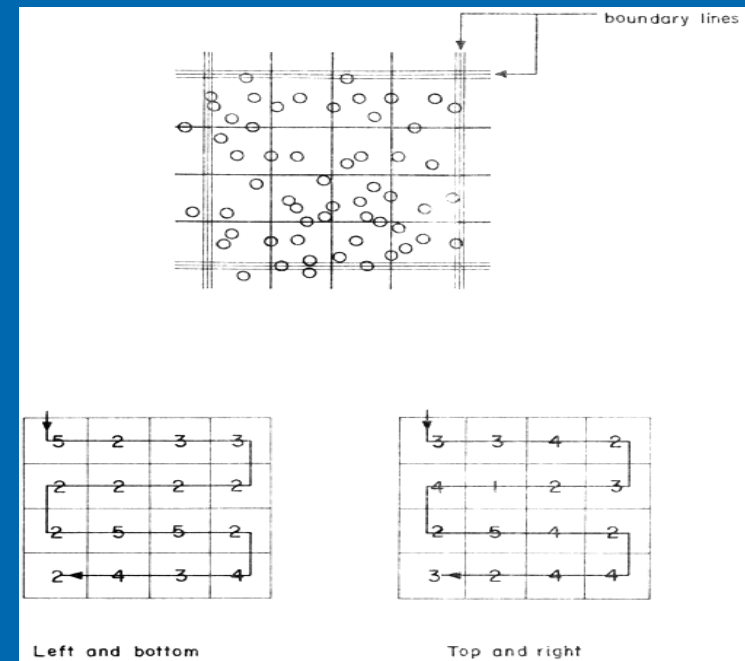
Izgled komore za brojanje uobličanih elemenata krvi (hemocitometar)

- Hemocitometar (komora) je staklena pločica u koju su urezana četiri žljeba koja ograničavaju tri polja. Srednje polje (b) je izbrušeno tako da je za 0,1 mm niže od dva susedna (a i c) polja. Na njemu je urezana mrežica koja služi za brojanje eritrocita. Prema izgledu mrežice postoji više tipova komora (Burkerova, Türckova, Thoma-Zeisova, Neubauerova...). Neke se koriste za brojanje eritrocita, a neke za brojanja leukocita.
- Türckova komora : na ovoj komori nalazi se mrežica površine 9 mm², podeljena na 9 velikih kvadrata. Centralni kvadrat podeljen je trostrukim linijama na 16 srednjih kvadrata od kojih svaki ima površinu od 1/25 mm². srednj kvadrati su jednostrukim linijama izdeljeni na po 16 kvadratića površine od 1/400 mm². u njima se broje eritrociti. Veliki kvadrati (ugaoni) podeljeni su dvostrukim linijama na 16 srednjih kvadrata koji služe za brojanje leukocita.



Neubauerova komora

- Način rada : za brojanje eritrocita koristi se krv dobijena iz uha životinje ili krete kod živine. Mesto sa koga će se uzeti krv, očistiti i dezinfikovati alkoholom. Sterilnom iglom izvršiti ubod, prvu kap obrisati vatom, a pri formiranju druge kapi, uzeti krv u melanžer do oznake 0,5 ili 1.0. Papirnom vatom obrisati vrh melanžera, pa uvući pripremljen Hayem-ov rastvor do oznake 101. Melanžer postaviti između palca i kažiprsta pa blago mešati nekoliko minuta, da bi se krv u proširenom delu, pomoću staklene kuglice (crvene boje) ravnomerno izmešala. Komoru postaviti na ravnu površinu, navlažiti uzvišenja i na njih navući pokrovno staklo. Da bi pokrovno staklo potpuno naleglo, izvršiti pritisak krajevima palčeva, pojava Newtonovih prstenova potvrda je da se pravilno postupilo. Ispustiti nekoliko kapi iz melanžera, potom prisloniti vrh melanžera uz donju ivicu pokrovnog stakla i sledećom kapi napuniti komoru. Ako se sadržaj prelije preko pokrovnog stakla, skinuti ga, oprati komoru i pokrovno staklo, osušiti, pa ponoviti postupak. Komoru staviti pod mikroskop i malim uveličanjem pronaći mrežu, pomoću objektiva koji uveličava 10 puta. Zatim pomoću objektiva koji uveličava 40 puta, centrirati jedan srednji kvadrat, koji je podeljen na 16 kvadratića u kojima se broje eritrociti. Eritrociti se broje u 80 kvadratića, odnosno u 5 velikih kvadrata. Broje se svi eritrociti unutar malog kvadrata, kao i oni koji leže na gornjoj i desnoj liniji. Eritrociti su razasuti u kvadratićima bez nekog reda, pa se neki nalaze i na linijama koje dele kvadrate. Pri brojanju eritrocita voditi računa da ako se broje eritrociti na gornjoj i desnoj ivici kvadrata, onda se ne broje oni koji su na donjoj i levoj ivici.



Broj eritrocita se izračunava pomoću sledećeg obrasca:

izbrojani eritrociti

x razblaženje krvi x 4000 =

Broj kvadratića u kojima se broje eritrociti (80)

= broj eritrocita u 1 mm² krvi.

Količnik između izbrojanih eritrocita i broja kvadratića u kojima se broje eritrociti predstavlja prosečan broj eritrocita u jednom kvadratiću. Dobijeni broj se množi sa 100 ili 200 u zavisnosti da li je krv uzeta u melanžer do oznake 1 ili 0,5 (razblaženje krvi), a zatim sa 4000 jer je zapremina komore 1/4000 mm³ (površina kvadratića je 1/400 mm², a visina komorice 1/10 mm).

Kako se broj eritrocita izražava na 1 l krvi, dobijenu vrednost treba pomnožiti sa 10⁶.

Primer: izbrojano je 560 eritrocita u 80 kvadratića, razblaženje krvi je 200. broj eritrocita je $560/80 \times 200 \times 4000 \times 1000000 = 5,6 \times 10^{12} / l$

Određivanje hematokritske vrednosti

- Pribor : hematokrit po Wintrobou-u ili hematokritska cevčica, injekciona igla, brizgalica, alkohol, heparin, centrifuga
- Način rada : u heparizovanu brizgalicu uvući 3 ml krvi ubodom igle u odgovarajuću venu. Zatim u hematokrit pažljivo niz zid uliti krv do oznake 100. Ako se koristi hematokritska cevčica, tada se krv iz brizgalice prenese u porcelansku posudu i kapilarna cevčica se potom uroni u krv. Po zakonu kapilarnosti, krv ulazi u cevčicu, ali pri tome voditi računa da oko 15 mm cevčice ostane prazno. Kraj cevčice koji je bio uronjen u krv obriše se vatom, a suprotan kraj zatvori voskom, ili se provuče nekoliko puta kroz plamenik da bi se zatopio. Epruveta (hematokrit) ili cevčica stavi se u centrifugu oko 15 min na 3000 obrtaja/min. S obzirom da eritrociti imaju najveću specifičnu masu, talože se na dno, iznad njih je beličast sloj koga čine leukociti i trombociti, a gornji sloj čini krvna plazma. Čitanje hematokritske vrednosti vrši se direktno na skali epruvete, a ako se radi sa kapilarnom cevčicom ona se stavlja u poseban čitač gde se direktno očitava hematokritska vrednost.

Određivanje brzine taloženja eritrocita metodom po Westergreen-u

- Pribor : stativ sa pipetama po Westergreen-u (dužine 300 mm i promera 2,5 mm), špric od 2 ml, vata, alkohol, 3,8% natrijum citrata, epruvete, stakleni štapić, labaratorijski časovnik
- Način rada : u špric od 2 ml ispunjenim sa 0,4 ml natrijum citrata, uzeti krv do oznake 2. ovaj sadržaj istisnuti u epruvetu, blago promešati štapićem i uneti pipetu po Westrgreen-u do oznake 0 (podeoci na pipeti su od 0 do 200). Ispunjenu pipetu postaviti vertikalno u stalak i posle prvog, odnosno drugog sata od vremena postavljanja, odrediti visinu stuba plazme. Kod životinja sa sporom sedimentacijom, visina stuba plazme čita se i posle 24 sata. Pri određivanju sedimentacije eritrocita u krvi svinja, pipete se postavljaju koso pod određenim uglom a ne vertikalno, jer u suprotnom ne dolazi do taloženja eritrocita.

Ponašanje eritrocita u hipotoničnim, izotoničnim i hipertoničnim rastvorima

- Pribor : citratna krv, predmetna stakla, pokrovna stakalca, destilovana voda (hipotoničan rastvor), izotoničan rastvor 0,9% NaCl, hipertoničan rastvor 12% NaCl
- Način rada : na tri predmetna stakla staviti po jednu kap citratne krvi, pa preko svake staviti po dve kapi i to : preko prve kapi izotoničan rastvor (fiziološki), preko druge kapi hipertoničan rastvor i preko treće destilovanu vodu. Laganim pokretanjem predmetnog stakla, pomešati krv sa dodatim rastvorom. Nakon 5 minuta pokriti pokrovnim stakalcem i posmatrati pod mikroskopom. U prisustvu izotoničnog rastvora, eritrociti se nisu promenili, sačuvali su oblik i zapreminu. U hipertoničnom rastvoru eritrociti su smežurani, a u prisustvu destilovane vode (hipotonična sredina) eritrociti su hemolizirani, mada se može uočiti i izvestan broj nabubrelih eritrocita.

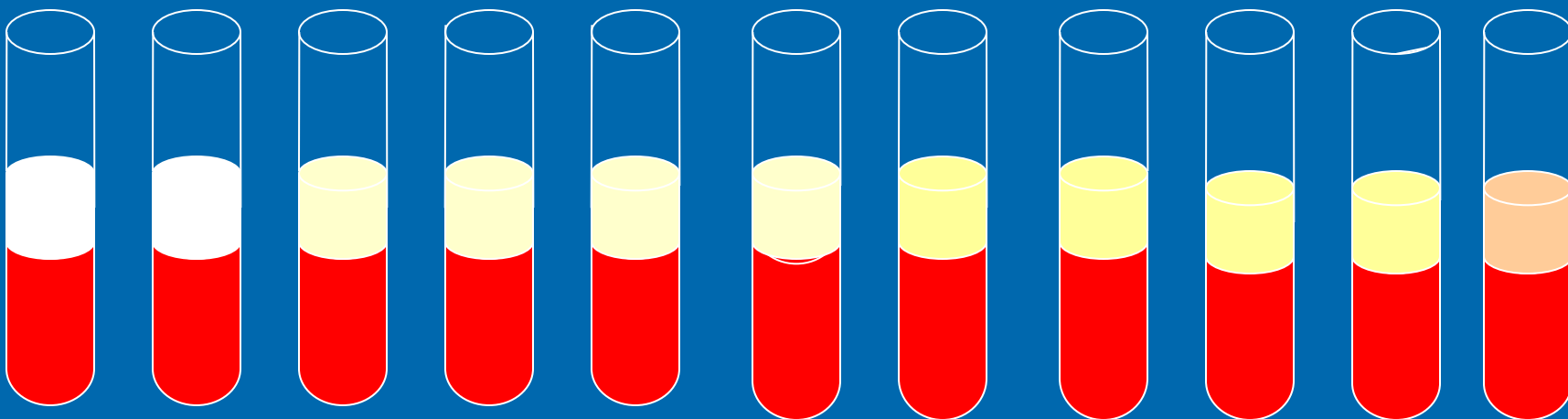
Ustanovljavanje hemolize u različitim uslovima

- Pribor : citratna krv, stalak sa epruvetama, destilovana voda, fiziološki rastvor (0,9%NaCl), etar
- Način rada : u tri epruvete obeležene brojevima od 1-3 sipati po 5 kapi citratne krvi. U prvu epruvetu sipati 18 ml fiziološkog rastvora, u drugu 18 ml destilovane vode, u treću sipati 16 ml fiziološkog rastvora i 2 ml etra. Svaku epruvetu izmešati laganim izvrtnjem, pa potom posmatrati epruvete.
- U prvoj epruveti nema hemolize, rastvor je neprovidan jer fiziološki rastvor ima istu osmotsku koncentraciju kao krvna plazma.
- U drugoj epruveti došlo je do potpune hemolize. Sadržaj je bistar i providan, eritrociti su se raspali u destilovanoj vodi usled brzog ulaska vode u eritrocite. U izrazito hipotoničnoj sredini hemoliza nastupa veoma brzo.
- U trećoj epruveti etar dodat u fiziološki rastvor rastvara lipide membrane eritrocita i dolazi do hemolize.

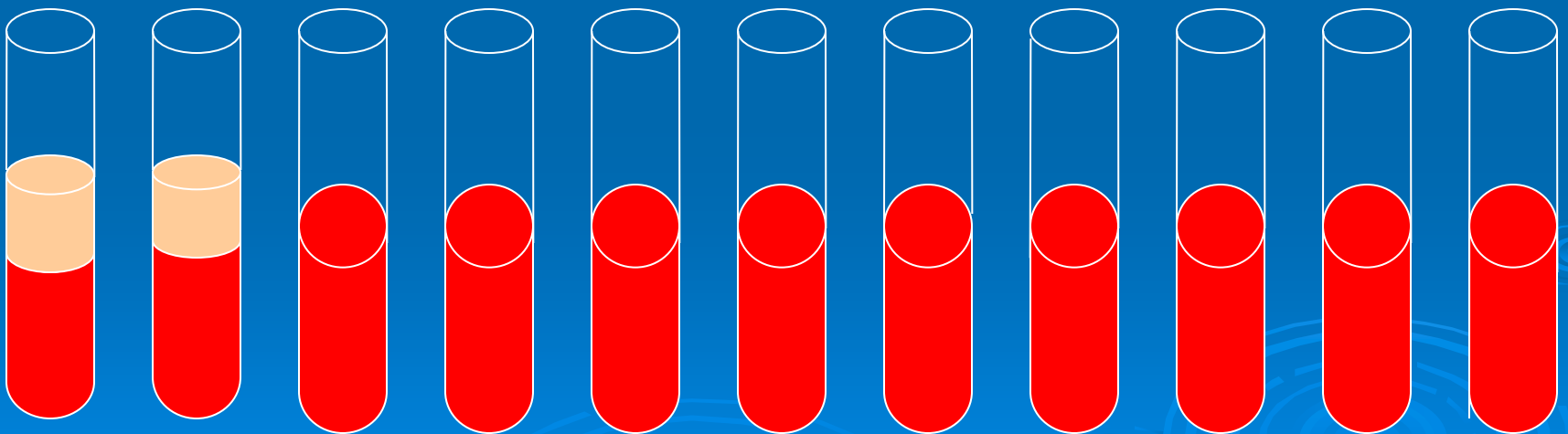
Odrediti minimalnu i maksimalnu rezistenciju eritrocita u hipotoničnim rastvorima natrijum-hlorida

- Pribor: brizgalica, injekciona igla, epruveta, centrifuga, stalak sa 22 serološke epruvete, rastvori natrijum-hlorida, 22 pipete, termostat
- Način rada: izvaditi životinji 10 ml krvi (sprečiti koagulaciju dodatkom antikoagulantnog sredstva), krv centrifugirati i odliti krvnu plazmu. U stalak staviti 22 epruvete, potom u svaku sipati po 2 kapi eritrocita, a potom dodati po 5 ml rastvora NaCl različite koncentracije (od 0,80 do 0,35). Svaku epruvetu lagano izmešati. Stalak sa epruvetama staviti u termostat na temperaturu od 37 °C i izvaditi ga posle sat vremena. Stalak sa epruvetama okrenuti prema izvoru svetlosti i očitati rezultate. Prva epruveta sa crvenkastom bojom iznad taloga eritrocita predstavlja koncentraciju natrijum hlorida koja odgovara minimalnoj rezistenciji eritrocita. Hemolizirani su samo najneotporniji eritrociti. Prateći sledeće epruvete, uočava se sve veći broj hemoliziranih eritrocita-manja količina taloga na dnu epruvete. U prvoj narednoj epruveti u kojoj nema taloga eritrocita, tečnost je providna sa izraženom crvenom bojom, što predstavlja maksimum rezistencije eritrocita (svi eritrociti su hemolizirani) raspon između minimalne i maksimalne rezistencije eritrocita naziva se širina rezistencije eritrocita.

0,80 0,75 0,70 0,65 0,60 0,55 0,50 0,49 0,48 0,47 0,46



0,45 0,44 0,43 0,42 0,41 0,40 0,39 0,38 0,37 0,36 0,35



% NaCl