

FIZIOLOGIJA KRVI

VJEŽBA 3



Pravljenje krvnog razmaza

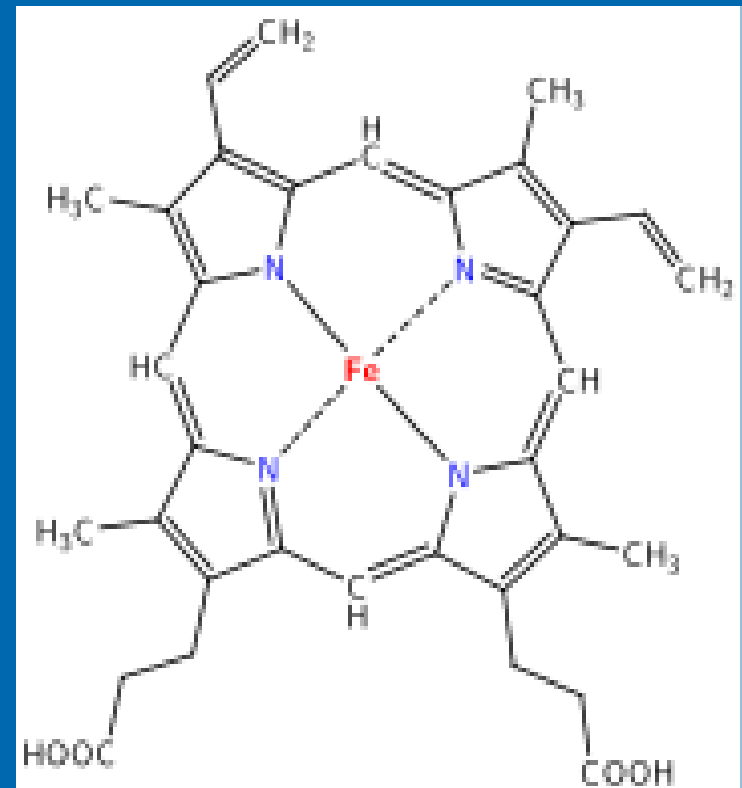
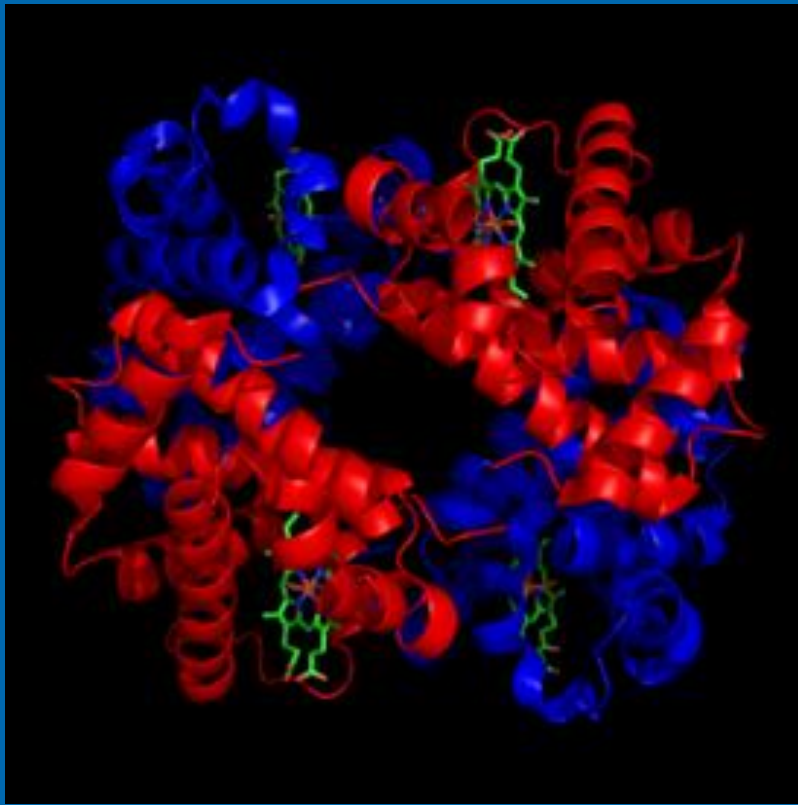
- Pribor: predmetna stakla, boja *May-Grunwald*, destilovana voda, *Giemsa* rastvor, stalak za sušenje i bojenje krvnog razmaza
- Način rada: pripremiti čista i suva predmetna stakla. Na jedan kraj predmetnog stakla staviti kap krvi. Držati predmetno staklo kažiprstom i palcem, a drugom rukom postaviti brušeno pokrovno staklo pod uglom od 45° u odnosu na predmetno staklo. Prvo dodirnuti kap da se razlije duž ivice i brzim potezom razmazati krv po površini predmetnog stakla. Razmaz se suši na vazduhu 1 do 2 sata, a zatim se boji metodom po *Papenheimu*-u.

Bojenje po *Papenheim*-u pripremljenih krvnih razmaza

- Nakon sušenja razmaza 1-2 sata, preparat prelići nerazređenom bojom *May-Grunwald* . Posle 2-3 minuta prelići preparat destilovanom vodom, ali da se ne ispere sva boja i ostaviti ga na stalak oko 1 minuta. Potom preparat isprati destilovanom vodom, odliti tečnost sa predmetnog stakla i prelići razređenim rastvorom *Giemsa* (1 ml boje i 9 ml destilovane vode). Razmaz isprati vodom i ostaviti da se suši 1 sat.

Hemoglobin

- Hemoglobin je složena belančevina iz frupe hromoproteida.
- Sastoji se od belančevine globina i prostetične grupe hema.
- Globin se sastoji od četiri polipeptidna lanca i za svaki od njih je vezan po jedan molekul hema.
- Hem se sastoji od četiri pirolova prstena, a u centru se nalazi atom dvovalentnog gvožđa.
- Molekul hema daje crvenu boju hemoglobinu.

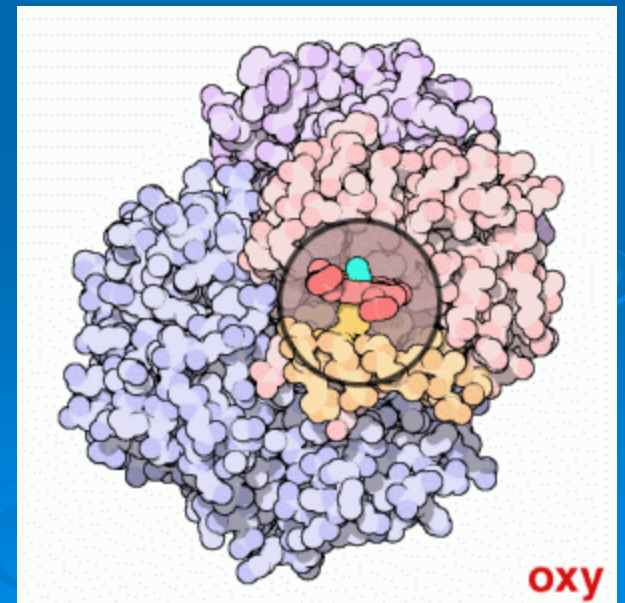
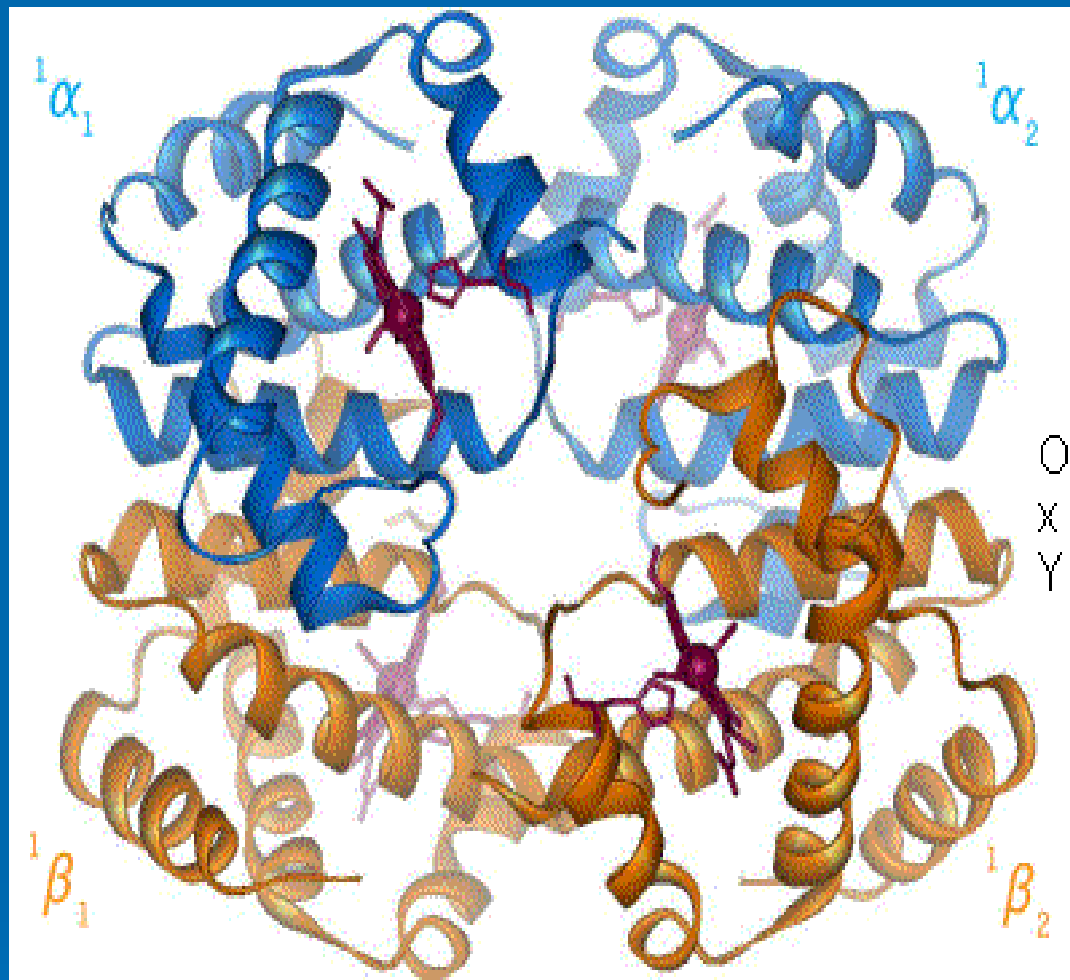


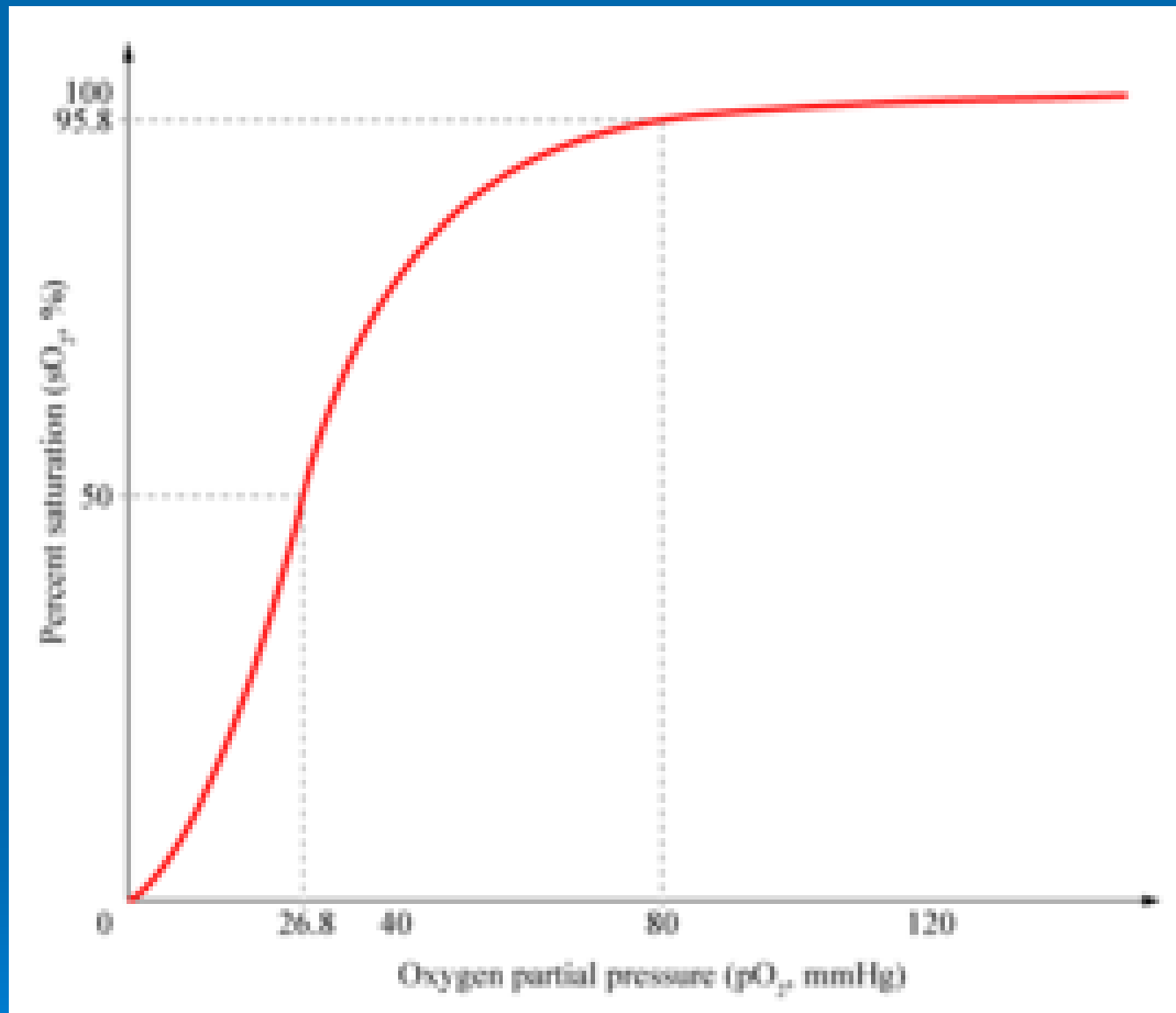
α polipeptidni lanac

β polipeptidni lanac

Hem

hem





Sigmoidna kriva vezivanja hemoglobina

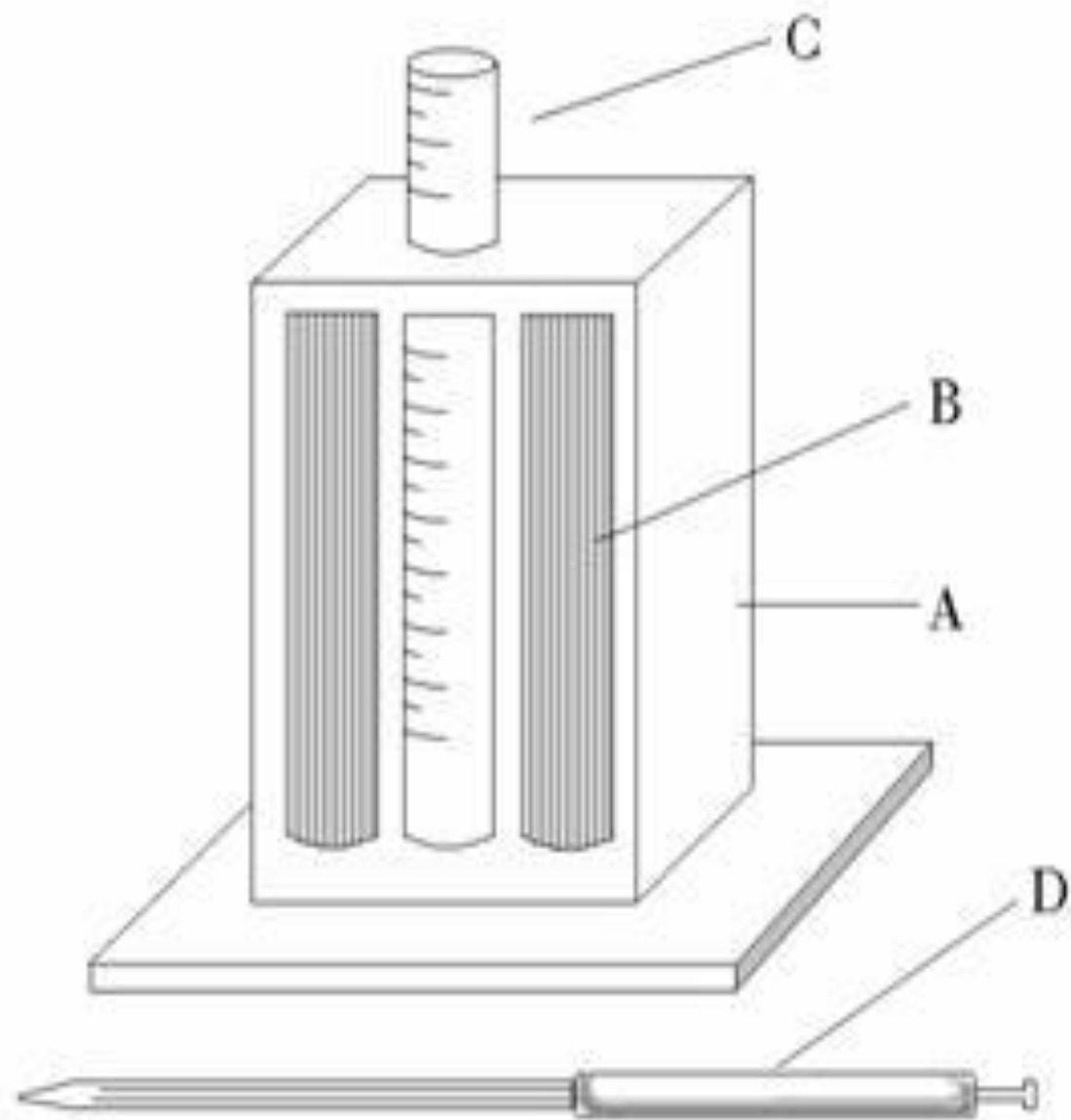
- Kod fetusa postoji samo fetalni hemoglobin, koji po rođenju čini 40-100% ukupnog hemoglobina eritrocita, koji se pred kraj prve godine života nalazi u količini od 1%.
- Fetalni hemoglobin pri nižem parcijalnom pritisku vezuje za 20-30% više kiseonika nego hemoglobin odraslih.

Određivanje koncentracije hemoglobina

- Određivanje koncentracije hemoglobina u eritrocitima je od velike važnosti, jer promena njegove koncentracije ukazuje na poremećaj stvaranja i sazrevanja eritrocita, kao i o njihovom pojačanom raspadanju.
- Za kvantitativno određivanje hemoglobina mogu se koristiti sledeće metode:
 - ❖ Kolorimetrijske metode – kod ovih metoda upoređuje se boja rastvora hemoglobina ili nekog njegovog derivata, sa bojom standardnog rastvora poznate koncentracije.
 - ❖ Gasometrijske metode – pošto hemoglobin vezuje O_2 (1 g hemoglobina vezuje $1,34 \text{ cm}^3 O_2$), onda se iz zapremine vezanog gasa izračuna količina prisutnog hemoglobina.
 - ❖ Hemijske metode – ove metode se zasnivaju na određivanju hemoglobinskog gvožđa (procentualna zastupljenost gvožđa u molekulu hemoglobina iznosi 0,334%). Hemijske metode daju najpouzdanije rezultate, ali zbog dugog izvođenja i specijalne skupe aparature, ne primenjuju se u kliničkoj dijagnostici.

Određivanje koncentracije hemoglobina po *Sahli*-ju

- Jednostavna metoda za izvođenje. Zasniva se na pretvaranju hema u hematin (hlorhematin) čija se boja poredi sa bojom standardnog rastvora hematina koji se nalazi u cevčicama hemoglobinometra.
- Pribor:
- Hemoglobinometar po *Sahli*-ju, injekciona igla, vata, 0,1 M HCl, destilovana voda, stakleni štapić, kapilarna pipeta za uzimanje krvi, pipeta za usisavanje vode
- Način rada: u graduisanu kivetu hemoglobinometra do oznake 10 sipati 0,1 M HCl. Potom u kapilarnu pipetu do oznake 0,02 uzeti krv i odmah preneti u graduisanu kivetu hemoglobinometra u kojoj se nalazi HCl. Dva do tri puta u kapilarnu pipetu usisati destilovanu vodu i svaki put je preneti u epruvetu da bi se sva količina krvi sprala sa zidova pipete. Zatim staklenim štapićem lagano mešati sadržaj u kiveti da ne bi došlo do stvaranja kristala hlorhemina. Kivetu staviti u stativ hemoglobinometra i ostaviti da stoji 5 minuta. Za to vreme HCl hemolizuje eritrocite, a gvožđe se oksidiše iz oslobođenog hemoglobina i nastaje jedinjenje hematin-hlor-hidrat, braon boje.

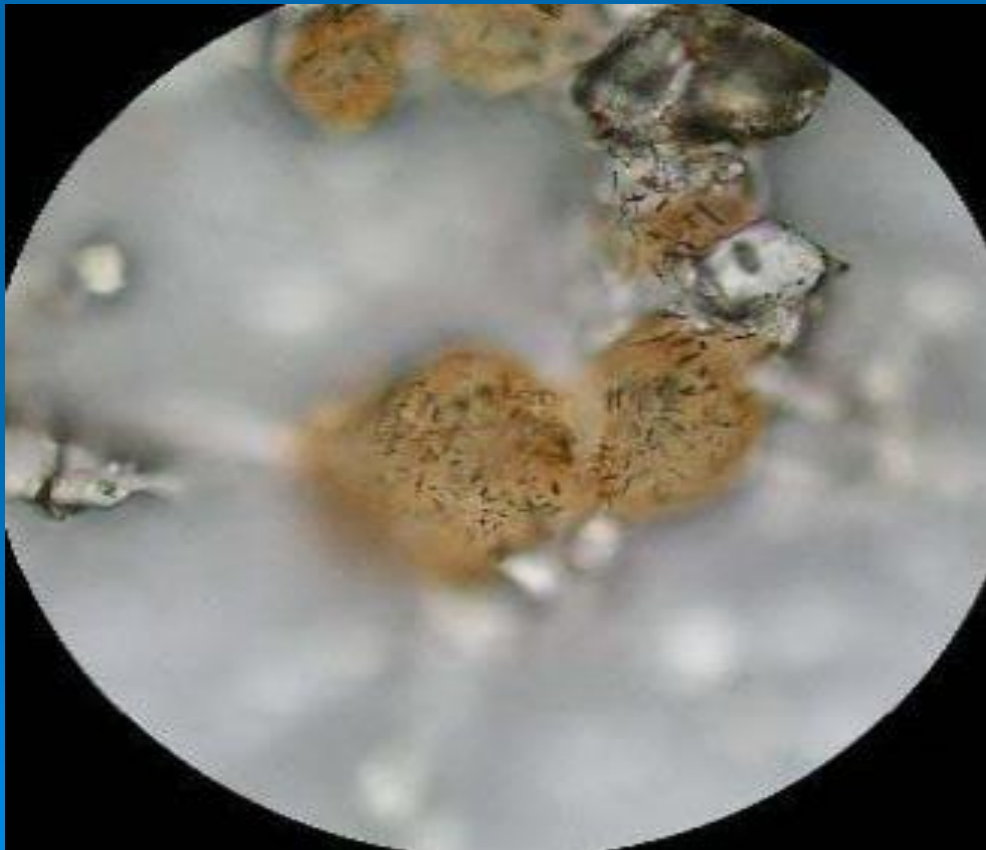


Hemoglobinometar: A - stalak, B - staklene standardne prizme,
C - graduisana epruveta, D - melanžer za uzimanje krvi.

- Sačekati 5 minuta i potom u kivetu dodavati kap po kap destilovane vode, uz istovremeno mešanje staklenim štapićem. Posle svakog dodavanja destilovane vode, izvaditi štapić i porediti intenzitet boje sa bojom standardnog rastvora. Hemoglobinometar postaviti u visini očiju i okrenuti ga prema izvoru svetloszi. Kada se uoči da je boja rastvora u kiveti i boja standarda ista, pročita se na skali koncentracija hemoglobina.
- Koncentracija hemoglobina izražava se u *Sahli*-jevim stepenima ili oznakom g% jer graduisana kiveta hemoglobinometra ima dve vrste podeoka. Noviji hemoglobinometri imaju jednu skalu na kojoj se očitava koncentracija hemoglobina u g/l.
- Najvažniji nedostatak metode je taj što se intenzitet boje određuje subjektivno pa se greške kreću 5-10%.

Hemin kristali

- Kristali hlorhemina (hematina) nastaju delovanjem HCl na hemoglobin. Hemoglobin se u kontaktu sa HCl prilikom zagrevanja razlaže na globin i hem koji sa HCl gradi hlorhematin (hematin).



Izvesti *Teichman*-ovu probu za dokazivanje krvi

- Pribor: mikroskop, predmetno staklo, pokrovno staklo, stakleni štapić, NaCl u supstanci, sirćetna kiselina, defibrinisana krv
- Način rada: staklenim štapićem staviti kap krvi na predmetno staklo i ostaviti ga da se osuši na sobnoj temperaturi. Na osušenu kap staviti par kristala NaCl i staklenim štapićem sve istisnuti i izmešati. Zatim kanuti dve kapi sirćetne kiseline, pokriti ljušpicom i nekoliko puta provući preko plamenika, sve do iščezavanja mehurića. Preparat se ohladi, a zatim se posmatra pod mikroskopom. Jasno se vide mrko-žuti prizmatični kristali hlorhemina.
- Prisustvo hemin kristala u materijalu za koji se sumnja da je krv, pouzdano potvrđuje prisustvo krvi. Međutim, ovom metodom ne može se utvrditi da li krv potiče od čoveka ili neke životinje.

Hematološki indeksi

- Hematološki indeksi se koriste za određivanje prosečne zapremine eritrocita (mean corpuscular volume - MCV), prosečne vrednosti hemoglobina u eritrocitu (mean corpuscular hemoglobin – MCH), i prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (mean corpuscular hemoglobin concentration- MCHC). Ove vrednosti mogu se koristiti u dijagnostici različitih oblika anemije.
- Hematološki indeksi se izračunavaju iz:
 - ❖ broja eritrocita,
 - ❖ količine hemoglobina i
 - ❖ hematokrita.

MCV- mean corpuscular volume-prosečna zapremina eritrocita

$$\text{MCV} = \frac{\text{hematokritska vrednost} \times 10}{\text{broj eritrocita} / \text{l}}$$

- Primer: hematokritska vrednost =45, broj eritrocita= $5 \times 10^{12} / \text{l}$

$$\text{MCV} = \frac{45 \times 10}{5 \times 10^{12}} = \frac{450}{5 \times 10^{12}} = 90 \times 10^{12} = 90 \mu^3$$

- Ako je vrednost MCV iznad $100 \mu^3$, to ukazuje da su eritrociti velikog prečnika i zapemine. Ova pojava se naziva **makrocitoza**. Suprotno, ako je vrednost ispod $80 \mu^3$, onda je to **mikrocitoza**.

MCH- mean corpuscular hemoglobin-prosečna vrednost hemoglobina u eritrocitu

$$\text{MCH} = \frac{\text{količina hemoglobina g/l}}{\text{broj eritrocita / l}}$$

- Primer: količina hemoglobina je 150 g/l, broj eritrocita= 5×10^{12} /l

$$\text{MCH} = \frac{150}{5 \times 10^{12}} = \frac{30}{10^{12}} = 30 \text{ pg (pikograma)}$$

- Prosečna vrednost hemoglobina predstavlja prosečnu težinu hemoglobina u pg, koja se nalazi u eritrocitima.

MCHC- mean corpuscular hemoglobin concentration- prosečna koncentracija hemoglobina u eritocitu

$$\text{MCHC} = \frac{\text{hemoglobin g/l} \times 10}{\text{hematokritska vrednost}}$$

- Primer: koncentracija hemoglobina je 15 g/l, hematokritska vrednost je 45

$$\text{MCH} = \frac{150 \times 10}{45} = 33\%$$

- Izračunata vrednost daje podatak o stepenu funkcionalne sposobnosti eritrocita. Prosečna procentualna vrednost hemoglobina u eritocitu je oko 35%.