

ĆWICZENIE 1: HEMATOLOGIA

Opracowali: dr Michał Bulc, dr Katarzyna Palus,
prof. Sławomir Gonkowski, prof. Jarosław Całka

POBIERANIE KRWI

Świnie - Można pobierać krew z żyły brzeżnej ucha, żyły brzusznej czy żyły ogonowej. Pobieranie krwi z tych naczyń jest bardzo powolne i uciążliwe, a pobrana krew, często w bardzo małej ilości, może ulegać hemolizie lub koagulacji. Można też pobierać krew z zatoki podoczodołowej, co przez osoby postronne postrzegane jest jako bardzo brutalne i niehumanitarne. Prawidłowe pobranie krwi, z dużą dozą niezawodności, możliwe jest u świń tylko z wkłucia do żyły jarzmowej zewnętrznej (*v. jugularis externa*) lub żyły czczej przedniej (*v. cava cranialis*). Wkłucie należy rozpocząć w dole jarzmowym (*fossa jugularis*), przedniobocznie od rękoności mostka i przyśrodkowo od mięśnia ramienno-głowego (*m. brachiocephalicus*)

Szczury – odcięcie koniuszka ogona, nacięcie małżowiny usznej, z ogona za pomocą igieł do wstrzykiwań insuliny

Świnki morskie, chomiki – poprzez nakłucie lewej komory serca

Króliki – żyły na grzbietowej powierzchni ucha

Konie, bydło, owce, kozy – żyła szyjna zewnętrzna

Psy, koty żyła ramieniowa, żyła dopiszczelowa

Rodzaje materiału biologicznego

- **Krew pełna żylna** (osocze plus krwinki), służy do badań morfologicznych. Pobieramy najczęściej do próbki z wersenianem potasu (EDTA).
- **Krew pełna tętnicza** pobieramy z dużych naczyń tętniczych, najczęściej do próbek z heparyną. Służy do badań gazometrycznych (prężność tlenu i dwutlenku węgla).
- **Krew pełna włosniczka** pobiera się ją do heparynizowanych kapilar można oznaczać z niej morfologię, gazometrię czy poziom glukozy oraz elektrolitów. Uwaga szczególnie w u ludzi należy uwzględnić tzw. efekt zbierania osocza. Występuje on wówczas gdy naczynia włosowate rozgałęziają się pod kątem 90 stopni, krew płynie warstwowo czyli krwinki w środku naczynia a osocze blisko śródbłonna. W takich naczyniach znajduje się więcej osocza a mniej krwinek co może powodować zafałszowanie niektórych wyników badań.
- **Osocze** uzyskuje się po odwirowaniu krwi pełnej i oddzieleniu elementów komórkowych. Standardowe warunki wirowania to 3000 obr./min, 10 minut. Osocze zawiera elementy układu krzepnięcia krwi dlatego w krzepnie bez dodatku antykoagulantów.
- **Surowica** uzyskuje się ją po odwirowaniu krwi pobranej do próbki nie zawierającej antykoagulantów lub takiej, która zawiera aktywatory krzepnięcia. W pierwszym przypadku należy próbkę odstawić na ok 45 minut. Po wykrzepieniu należy krew odwirować i oddzielić skrzep. Surowica nie zawiera elementów układu krzepnięcia przede wszystkim fibrynogenu dlatego nie krzepnie. W surowicy oznacza się większość wskaźników biochemicznych krwi.

Technika pobierania krwi

Obecnie dostępne są gotowe zestawy do pobierania krwi. Probówki w zależności od oznaczenia które chcemy dokonać zawierają odpowiednie proporcje substancji hamującej proces krzepnięcia. Należy unikać pobierania krwi za pomocą strzykawek przeznaczonych do iniekcji.

U zwierząt ze względu na sierści miejsce podrabia należy odpowiednio przygotować (ogolić, skórę odkazić), można użyć opaski uciskowej, którą zakładamy powyżej miejsca wkłucia igły. Krew pełna jeżeli sami nie wykonujemy oznaczenia powinna być dostarczona do laboratorium w czasie nie dłuższym niż 2 godziny. Czas ten dotyczy również osocza i surowicy. W niektórych przypadkach surowicę i osoczę można przechowywać w temp 4 stopni do 24 godzin lub zamrozić i przechowywać w temperaturze – 20 stopni do 1 – 2 tygodni w zależności od oznaczenia.

UWAGA każdą krew traktujemy jako materiał potencjalnie zakaźny.

Przydatne linki

<https://www.youtube.com/watch?v=S4XmJTEIcFQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=LG5Qce-tt6g>

ODCZYN BIERNACKIEGO

Edmund Faustyn Biernacki (ur.19 grudnia 1866 w Opocznie, zm. 29 grudnia 1911 we Lwowie) - polski lekarz, neurolog i filozof. Studiował medycynę na Uniwersytecie Warszawskim, gdzie uzyskał dyplom w 1889 r. W 1894 r. opisał zjawisko opadania krwinek czerwonych w pracy pt. : *"W kwestii wzajemnego stosunku czerwonych ciałek i osocza we krwi krążącej"*. Jako pierwszy zaobserwował związek między szybkością opadania krwinek w osoczu a ogólnym stanem organizmu. W 1897 r. przedstawił własną metodę badania szybkości opadania krwinek we krwi, wskazującą na obecność w organizmie określonych procesów chorobowych (*"Samoistna sedymentacja krwi jako naukowa i praktyczno-kliniczna metoda badania"*). Od 1902 mieszkał we Lwowie, w 1908 został profesorem nadzwyczajnym Uniwersytetu Lwowskiego. Test na opad krwi nazwany odczynem Biernackiego na zjeździe internistów polskich w Wilnie w roku 1923, należy do podstawowych badań diagnostycznych. Biernacki wydał ponadto pierwszy polski podręcznik hematologii pt. *"Zarys patologii krwi"* (1906).

W nomenklaturze między narodowej częściej używany jest termin współczynnik opadania krwinek czerwonych

Odczyn Biernackiego (OB), rzadziej używana nazwa: opad Biernackiego, nazwa międzynarodowa: wskaźnik opadania erytrocytów (ESR, ang. erythrocyte sedimentation rate) jest to pomiar szybkości opadania krwinek czerwonych w niekrzepnącej krwi (najczęściej z dodatkiem cytrynianu sodu). Fizjologicznie krwinki mają ładunek elektryczny ujemny, który zapobiega ich skupianiu się. Białkowe składniki osocza mają ładunek elektryczny dodatni. Krwinki poza organizmem tracą ładunek ujemny (pod wpływem działania dodatnich ładunków osocza), skupiają się i opadają na dno rurki.

Opadanie krwinek spowodowane jest różnicą ciężarów właściwych elementów komórkowych i osocza krwi i zależy od wielu czynników, z których można m. in. wymienić: obecność ciał odpornościowych w surowicy (powodujących agregację lub aglutynację krwinek), wysycenie tlenem, liczbę erytrocytów, skład i ilość białka osocza, poziom fibrynogenu, temperaturę, równowagę kwasowo-zasadową i elektrolitową.

Należy podkreślić, że mechanizm opadania erytrocytów nie jest w pełni jasny. Sedymentacja inicjowana jest po pobraniu krwi. Wewnątrznaczyniowo zjawisko to nie występuje.

Opadanie krwinek czerwonych zachodzi w 3 etapach:

- aglomeracja i „rulonizacja” erytrocytów,
- jednostajne opadanie aglomeratów (agregatów) erytrocytów,
- zwolniona sedymentacja

OB krwi (Odczyn Biernackiego krwi)

Grupy wiekowe	Normy	Interpretacja
Noworodki	0-2 mm/h	<p>Chorobami powodującymi przekroczenie norm mogą być: stany zapalne (infekcyjne i nieinfekcyjne), nowotwory, choroby rozrostowe krwi (np. białaczki), choroby autoimmunologiczne, w zawałach mięśnia sercowego, w urazach, złamaniach kości, w niedoczynności i nadczynności tarczycy, w hipercholesterolemii. Szczególnie wysokie wartości obserwuje się w nowotworach krwi i chorobach zwyrodnieniowych stawów</p> <p>Wzrost OB jest również spotykany fizjologicznie u kobiet w okresie przedmenstruacyjnym i miesiączki, w okresie ciąży i okresu połogu (od 10-11 tygodnia ciąży do 6 tygodni po porodzie), w czasie stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych. Występuje też po obfitych posiłkach (dieta wysokobiałkowa), przemęczeniu.</p> <p>Po niektórych lekach, jak morfina, witamina A</p> <p>Zmniejszenie wartości OB występuje w chorobach alergicznych, żółtaczce, w obniżonej wartości fibrynogenu, w nadkrwistości i przewlekłej niewydolności krążenia. W stanach powodujących zagęszczenie krwi (biegunka, wymioty, poty)</p>
Niemowlęta (do 6 miesięcy)	12-17 mm/h	
Kobiety < 60 roku życia	do 12 mm/h	
Kobiety > 60 roku życia	do 20 mm/h	
Mężczyźni < 60 roku życia	do 8 mm/h	
Mężczyźni > 60 roku życia	do 15 mm/h	

Odczyn Biernackiego w weterynarii

gatunek	OPAD [mm]					
	15 min	30 min	45 min	1 h	2 h	24 h
Koń	48	107	124	135	143	148
Bydło	-	-	-	0-2	-	10-12
Owce	-	-	-	1-3	-	-
Kozy	-	-	-	0-4	-	-
Świnie	-	-	-	1-14	-	-
Psy	-	-	-	1-6	6-8	-
koty	-	-	-	2-6	-	-

Zwolnienie OB u koni obserwuje się przy:

Ochwacie (niebakteryjne, rozległe zapalenie tworzywa kopytowego)

Mięśniochwacie (Zwany inaczej chorobą poświęteczną. Koń zapada na tą chorobę kiedy jest obficie (normalnie) żywiony, ale nie zapewnia się mu wymaganej ilości ruchu i pracy)

Odczyn Biernackiego jest badaniem nieprecyzyjnym i nieswoistym to znaczy, że nie jest typowe dla jakiegoś określonego schorzenia

Przyczyny przyspieszenia OB:

- stany zapalne (infekcyjne i nieinfekcyjne),
- nowotwory,
- choroby rozrostowe krwi (np. białaczki),
- choroby autoimmunologiczne,
- martwica tkanek (w tym zawały mięśnia sercowego),
- złamania kości,
- niedoczynność i nadczynność tarczycy,
- hipercholesterolemia
- **Szczególnie wysokie wartości** obserwuje się w nowotworach krwi i chorobach zwyrodnieniowych stawów

Przyspieszenie OB jest również spotykane fizjologicznie:

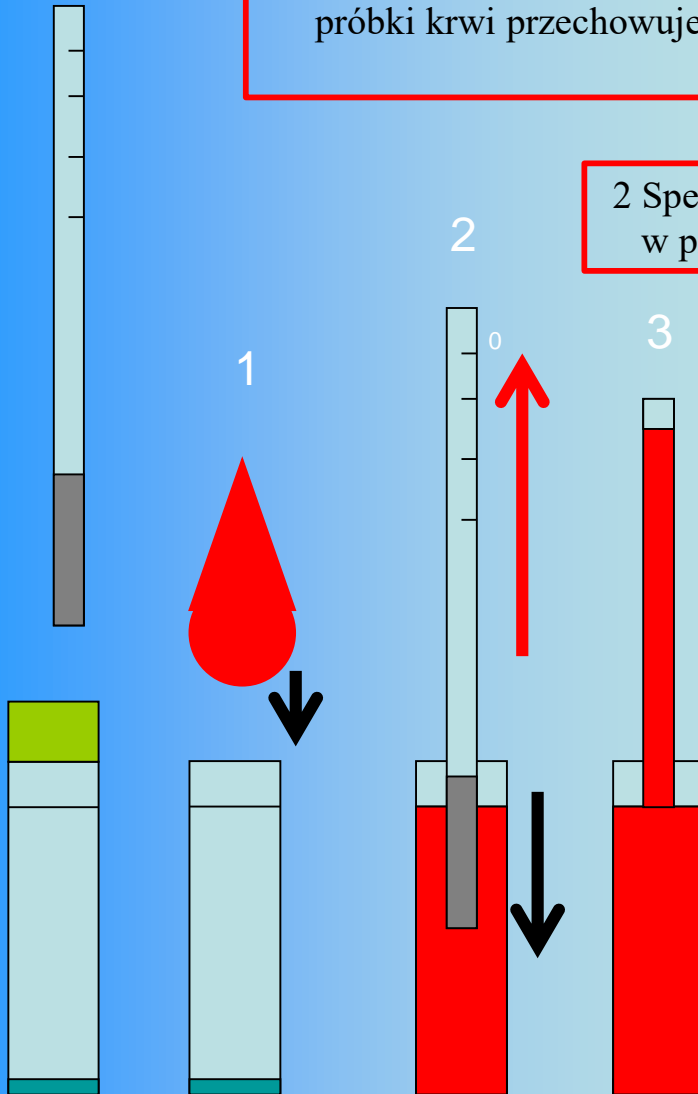
- u kobiet w okresie przedmenstruacyjnym i miesiączki,
- w okresie ciąży i okresu połogu (od 10-11 tygodnia ciąży do 6 tygodni po porodzie),
- w czasie stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych,
- po obfitych posiłkach (dieta wysokobiałkowa),
- przy przemęczeniu,
- po niektórych **lekach**, jak morfina, witamina A.

ODCZYŃ BIERNACKIEGO – wykonanie metodą manualną

1. Probówkę z cytrynianem sodu wypełnia się krwią żylną do oznaczonego poziomu. Jeśli próbki krwi przechowuje się w temperaturze pokojowej, badanie należy wykonać w przeciągu 2-3 godzin od pobrania.

2. Specjalnie oznaczoną i skalibrowaną rurkę delikatnie wciska się w probówkę tak ażeby słup krwi podniósł się do poziomu „0”.

3. Tak przygotowaną próbkę umieszcza się w statywie pionowym (metoda Westergrena; wynik odczytuje się po godzinie i po dwóch godzinach od momentu wstawienia próbki do statywu) lub skośnym (metoda Pronto; wówczas wynik I odczytuje się po siedmiu minutach, a II po 3 minutach od pierwszego odczytania).



Współcześnie OB określa się najczęściej metodami automatycznymi polegającymi na optycznym pomiarze opadu erytrocytów przez analizator.

Przydatne linki

<https://www.youtube.com/watch?v=ZDB9FINwJ58>

<https://www.youtube.com/watch?v=EfLB62fITdU>

<https://www.youtube.com/watch?v=mulymE0WjbU>

Hematokryt (stosowane skróty: HCT, HT, PCV) to jeden z podstawowych parametrów ocenianych w standardowych badaniach krwi (morfologii krwi). Jest to stosunek objętościowy między komórkami a osoczem krwi. Wyrażany zwykle w procentach (jednostka tradycyjna) lub w postaci ułamka (tzw. frakcji objętości).

Do oznaczania hematokrytu metodą mikrohematokrytową potrzebna jest:

- krew żylna lub włośniczkowa,
- cienkościenne kapilary szklane heparynowane,
- mikrowirówka wysokoobrotowa z głowicą hematokrytową,
- czytnik umożliwiający odczytanie wyniku w %,

HEMATOKRYT w weterynarii

gatunek	Jednostki SI	Jednostki tradycyjne [%]
Koń	0,24-0,25	24-25
Bydło	0,24-0,46	24-46
Owce	0,24-0,50	24-50
Kozy	0,23-0,39	24-39
Świnie	0,32-0,50	32-50
Psy	0,37-0,55	37-55
koty	0,24-0,45	24-45
króliki	0,30-0,53	30-53
Świnki morskie	0,37-0,51	37-51
Chomiki syryjskie	0,36-0,59	36-59

Wzrost poziomu hematokrytu następuje ogólnie rzecz ujmując gdy krew jest zagęszczona. Jest to objaw potencjalnie niebezpieczny, ponieważ zęszczenie i zwiększenie lepkości krwi może powodować tendencję do tworzenia się zakrzepów i zatorów.

Podwyższona wartość hematokrytu może być to spowodowana przez:

-wzrost liczby krwinek czerwonych - nadkrwistości pierwotne (czerwienica prawdziwa - choroba rozrostowa, w przebiegu której dochodzi do nadprodukcji czerwonych krwinek) i wtórne (przebywanie na dużych wysokościach, przewlekłe choroby płuc, nowotwory nerek),

-odwodnienie - obfite biegunki, uporczywe wymioty, moczówka prosta, nadmierne pocenie, zmniejszona objętość osocza- zapalenie otrzewnej, rozległe oparzenia.

U sportowców należy pamiętać, że podwyższenie wartości Ht może być objawem stosowania środków dopingujących – wiele z nich wyraźnie zwiększa produkcję erytrocytów i powoduje względne zagęszczenie krwi.

Spadek poziomu hematokrytu może być wynikiem rozrzedzenia krwi.

Może być spowodowany przez:

- zmniejszenie liczby krwinek czerwonych - niedokrwistości, utrata krwi (krwawienia),
- hemolizę wewnątrznaczyniową związaną z reakcją potransfuzyjną, choroby szpiku kostnego (choroba popromienna, fibroza, guzy),
- przewodnienie organizmu.
- w czasie ciąży zmniejszenie wartości Ht wynika z adaptacji układu krążenia kobiety ciężarnej do wymogów płodu

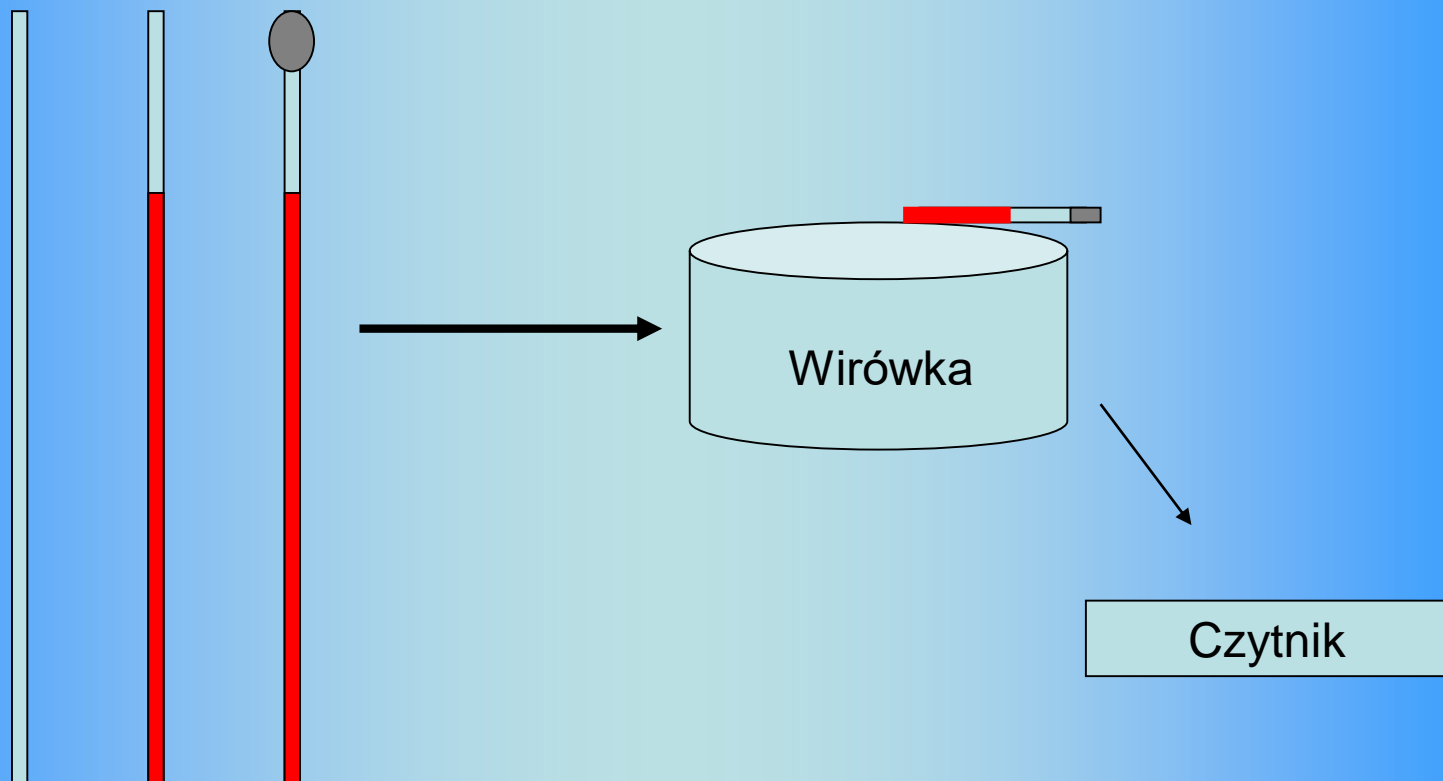
Przydatne linki:

https://www.youtube.com/watch?v=ZdDuH4l9M_w

<https://www.youtube.com/watch?v=SGygXwl7Wq4>

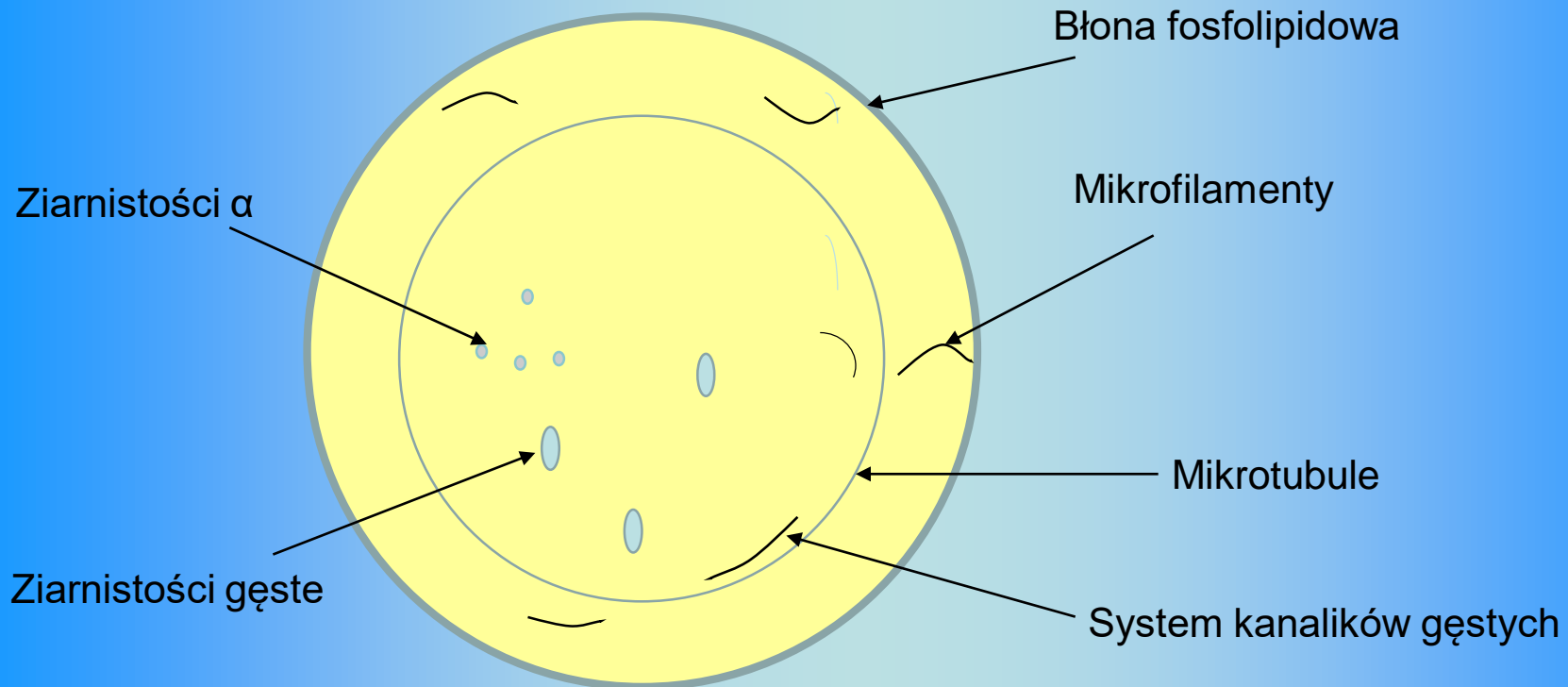
Wykonanie oznaczenia wartości hematokrytu:

- do kapilary nabrać krew włośniczkową (bezpośrednio po nakłuciu opuszki palca) lub uprzednio pobraną krew żylną do wysokości $\frac{3}{4}$ rurki.
- koniec kapilary, który nie miał kontaktu z krwią zamknąć plasteliną lub poprzez zatopienie nad palnikiem
- zaślepione kapilary włożyć do wirówki zaślepionym końcem kapilary na zewnątrz.
- wirować przez 10 minut przy 4000 obr./min,
- odczytać przy użyciu czytnika



PLYTKI KRWI – okrągłe lub owalne struktury stanowiące najmniejsze elementy morfotyczne krwi (o średnicy około 1-2 μm) powstające w szpiku kostnym z odszczepiania fragmentów cytoplazmy megakariocytów. Okres przeżycia płytek wynosi 5-20 dni.

Budowa płytek krwi: Trombocyty od zewnątrz otoczone są błoną fosfolipidową i błoną komórkową o typowej budowie. Wewnątrz wyróżnić można białka kurczliwe w postaci mikrofilamentów, liczne ziarnistości, cytoskielet czyli mikrotubule, a także gęsty układ błon siateczki endoplazmatycznej.



Funkcje trombocytów: odgrywają zasadniczą rolę w procesie krzepnięcia krwi, a ściślej mówiąc w pierwszym etapie tego procesu czyli reakcjach naczyniowych. Dzięki zdolności przekształcania się z postaci spoczynkowej w wypustkową oraz zdolności do agregacji i adhezji tworzą sieć płytkową w miejscu uszkodzenia naczynia. Ponadto uwalniają ze swych ziarnistości liczne czynniki biorące udział w krzepnięciu krwi.

Niektóre substancje uwalniane z ziarnistości trombocytów:

Ziarnistości α :

Fibrynogen

Fibronektybna

Trombospondyna

Czynnik V

Czynnik von Willebranda

Białko S

Ziarnistości gęste:

ADP, ATP,

Serotonina

Jony wapnia i magnezu

Fosfoinozytyle

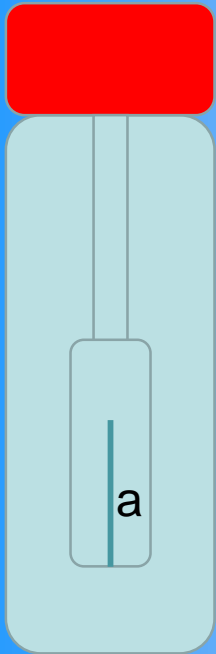
Inne funkcje płytek:

-Pobudzają wzrost komórek mięśni gładkich

-Trophiczne działanie na ściany naczyń

-Mogą inicjować zmiany miażdżycowe

Liczenie płytek krwi przy pomocy gotowego zestawu Thrombo+



- Wypełnić kapilarę „a” krwią żylną lub włósczkową
- umieścić kapilarę z krwią w probówce z odczynnikiem a następnie zamknąć probówkę korkiem
- mieszać do momentu wypłukania krwi z kapilary (uzyskane rozcieńczenie krwi wynosi 1:50)

- po około 3 minutach następuje hemoliza erytrocytów
- Przenieść badaną próbę na płytkę licznikową Neubauera lub Thoma (przygotowaną jak do liczenia erytrocytów)
- Liczyć płytki (świeące punkciki) na tle 5 grup kwadratów po 16 małych kwadratów, a następnie uzyskany wynik pomnożyć przez współczynnik 2.500

W warunkach fizjologicznych liczba trombocytów waha się w granicach:

150.000 - 400.000/ μ l krwi (jednostka konwencjonalna); 150 - 400 G/l krwi (jednostka SI).

Małopłytkowość (Trombocytopenia)

występuje gdy liczba płytek spada poniżej 100000/ μ l. Przy czym wartość jeszcze 30 000 płytek/ μ l wystarcza do utrzymania prawidłowej hemostazy, podczas gdy spadek poniżej tej wartości powoduje jawną skazę krwotoczną.

Trombocytopenie dzieli się na:

- wywołane niedostatecznym wytwarzaniem megakariocytów w szpiku kostnym (tak zwane małopłytkowości centralne);
- spowodowane nadmiernym usuwaniem płytek krwi z krążenia (małopłytkowości obwodowe), najczęściej na tle autoimmunologicznym;
- wywołane nierównomiernym rozmieszczeniem płytek krwi w ustroju;
- wywołane rozcieńczeniem płytek krwi.

Nadpłytkowość (trombocytoza) występuje wówczas, gdy liczba płytek krwi wynosi powyżej 600000/ul (600 K/ul).

Trombocytoza może być:

- **Samoistna (pierwotna)**, związana z nadmierną produkcją megakariocytów w szpiku kostnym.
- **Wtórna** - może pojawić się w przebiegu białaczki, czerwienicy prawdziwej, włóknieniu szpiku, po usunięciu śledziona, po ostrej utracie krwi, w przewlekłym alkoholizmie, w niedokrwistościach (hemolitycznej, z niedoboru żelaza), w przebiegu nowotworów oraz u stałych dawców krwi.

Małopłytkowość rzekoma:

Gdy wyniki badań wskazują na małopłytkowość, a stan pacjenta nie odpowiada wynikom badań. Do małopłytkowości rzekomej dochodzi w wyniku badania laboratoryjnego krwi. Odczynnik EDTA (używany do badań laboratoryjnych) może powodować łączenie się płytek w duże agregaty, które następnie nie są zliczane przez analizator i w ten sposób dochodzi do zaniżenia liczby płytek.

Po zapoznaniu się z przedstawionym materiałem student powinien:

1. Znać definicję, fizjologiczne podłoże warunkujące powstawanie opadu krwinek czerwonych.
2. Określić stany kliniczne w trakcie których dochodzi do zmian w poziomie OB.
3. Znać podstawowe zasady pobierania krwi oraz rodzaje materiału biologicznego jaki można uzyskać z krwi.
4. Znać definicje hematokrytu, wiedzieć dlaczego i w jaki sposób zmienia się jego poziom
5. Znać metodę oznaczania hematokrytu i OB.
6. Znać funkcje płytek krwi oraz podstawowe stany kliniczne w przebiegu których dochodzi do ich zmienności.

Dziękuję