

1. Úvod do cvičení. Biologická data

(M. Mlček, V. Hrachovina)

Požadované znalosti: předpokládáme znalosti ze semináře „Biosignál I“ kurzu B00030 – Fyziologie 1.

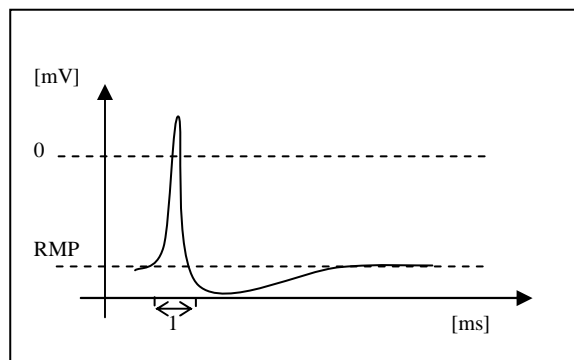
1.1. Grafická reprezentace dat

Velmi užitečným a ve cvičeních i textu učebnic často používaným způsobem, jak zapsat data, jsou grafy. Na poměrně malém prostoru mohou nahradit jeden či více odstavců textu nebo řadu výsledků a přitom mohou být velmi přehledné. To platí pouze v případě, pokud jsou grafy správně konstruovány a reprodukovány. Naše zkušenosti z výuky a zkoušení nás vedou k připomenutí několika základních pravidel, jichž je výhodné se při vytváření grafů držet.

- Graf není obrázkem nebo abstraktním uměním. Jednotlivé součásti mají význam informační, ne dekorační ☺.
- Název grafu. Usnadní první orientaci.
- Popis os. Z grafu musí být patrné, jaká data jsou prezentována, tedy na každé ose musí být uvedena příslušná veličina a jednotka.
- Hodnoty. Alespoň orientačně (řádově) by měly být uvedeny příklady hodnot na jednotlivých osách. Kupř. není podstatné, zda je uvedena glykemie na lačno 4,9 nebo 5,3 mmol/l, ale je chyba tvrdit, že to je 90 mmol nebo 5 %.
- Méně obvyklá zobrazení. Pokud je v grafu neobvyklá orientace os, nelineární měřítko apod., je třeba to zdůraznit.

Na obr 1.1. je příklad přijatelně stručného grafu.

- Jsou popsány osy.
- Je vyznačeno, že nulová hodnota na svislé ose není v úrovni vodorovné osy.
- Hodnota klidového potenciálu (RMP) zde není explicitně uvedena (pro různé buňky může nabývat odlišných hodnot), ale je naznačeno, kde se nachází.
- Na časové ose je orientačně uvedeno trvání jedné milisekundy, což je doba srovnatelná s trváním hrotu (to může být pro různé buňky různě dlouhé).



Obr. 1.1. Schéma akčního potenciálu

Úkol

Zakreslete průběh některé biologické veličiny (např. EKG, krevní tlak, teplotní křivka, ...), který znáte z dosavadních studií (třeba biofyziky).



1.2. Měřicí systémy (Vernier)

Podobně jako v klinické medicíně, je součástí řady úloh praktických cvičení z fyziologie záznam a hodnocení biologických signálů a vzorků. Na rozdíl od kliniky však většinou používáme zjednodušené přístroje tak, aby jejich ovládnutí bylo zvládnutelné bez předchozí praxe nebo školení. Zjednodušení také napomáhá snadnějšímu pochopení principů měření. Ve většině našich úloh je měření postaveno na systému pro snímání a analýzu dat firmy Vernier (www.vernier.com), která se zaměřuje na měřicí systémy pro výuku.

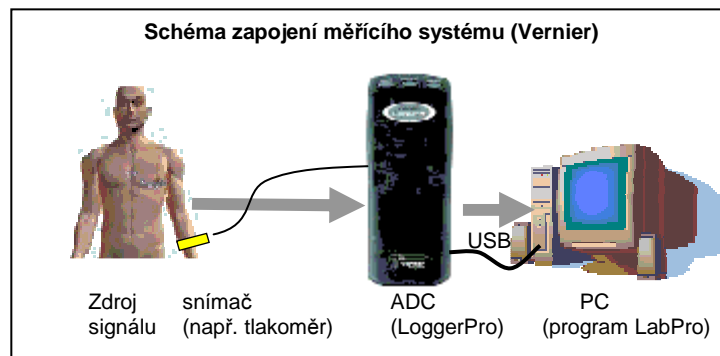
Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Cílem této kapitoly je usnadnění prvního setkání s měřicí aparaturou, a to přiblížením způsobu měření a stručným popisem systému Vernier. Může se zdát překvapivé, že na velmi podobných principech pracuje naše smyslové vnímání, jak bude vysvětleno v neurofyziologii.

1. Způsob měření

Studovaný signál je příslušným snímačem zaznamenáván a následně digitalizován AD převodníkem (ADC), aby data mohla být dále zpracována v počítači (PC). Pomocí PC je možné data zobrazit, dále upravovat, hodnotit, uložit, tisknout...

Proč používáme PC. K čemu je ADC?



2. Stručný popis systému

a. Snímače

Biologickou obdobou jsou receptory.

Snímače (sensors) slouží k převodu studovaného signálu (síla, koncentrace O₂, teplota) na signál elektrický, který může být celkem snadno dále elektronicky zpracován (např. v počítači). Běžně používané sensory: fotometr, EKG (snímač napětí), akcelerometr, siloměr, teploměr, barometr, fotobrána (průtokoměr), O₂ čidlo.

b. AD převodník, ADC (analogue to digital converter)

Biologickou obdobou je kódování signálu.

Signál ze sensorů je často spojité – analogový. Počítače však dovedou pracovat pouze s daty digitálními (tj. čísly). ADC slouží k digitalizaci signálu ze snímačů (převodu časově proměnné voltáže na řadu čísel). Proč na rozdíl od snímačů, kterých používáme řadu typů, stačí jen jeden typ ADC?

c. Počítač s příslušným software

U biologických systémů např. centrální zpracování, zapamatování, porovnání, asociace ...

Počítač nabízí především zobrazení měřených dat. K tomu je potřeba správně nastavit řadu parametrů snímání a zobrazení (časová osa, amplituda signálu, vzorkování, kalibrace). Toto nastavení je ve většině úloh automatizované, ale pochopitelně tak nemůže fungovat ve všech případech (např. pro podrobnější hodnocení výsledků vyžadující zvětšení nebo při řešení atypických úloh).

Další funkcí počítače je zpracování signálu a výsledků (např. průměrování, interpolace, filtrování, výpočty apod.)

Co je vzorkování? Proč je nutné umět nastavit zmiňované parametry?

3. Zapojení (hardware)

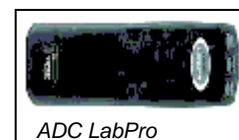
Zapojení jednotlivých zařízení je poměrně jednoduché (viz schéma). Jen pro úplnost uvádíme:

3.1. Sensory:

- jsou vždy zapojeny do ADC. Typ konektoru neumožňuje záměnu;
- nevyžadují samostatné napájení.

3.2. ADC (Lab Pro):

- je propojen s PC pomocí (libovolného) USB portu;
- musí být napájen.



4. Přihlášení k PC (Login)

S PC nelze pracovat bez přihlášení.

(Je ovšem možné, že se k počítači již někdo přihlásil a neodhlásil. Pak přihlášení není vyžadováno a dá se pracovat na „cizí účet“. Je zřejmé, že to není příklad správného postupu.)

Přihlašovací údaje **pro cvičení** (ne testy) jsou:

LOGIN: **student**
HESLO: ********* (Na velikosti záleží. Pozor i na psaní čísel. Heslo sdělí asistent)
DOMÉNA: **Physiology**

5. Ovládání program software (Logger Pro)


Program je nainstalován pouze na stanicích ve cvičebnách 1, 3, 4, 5.

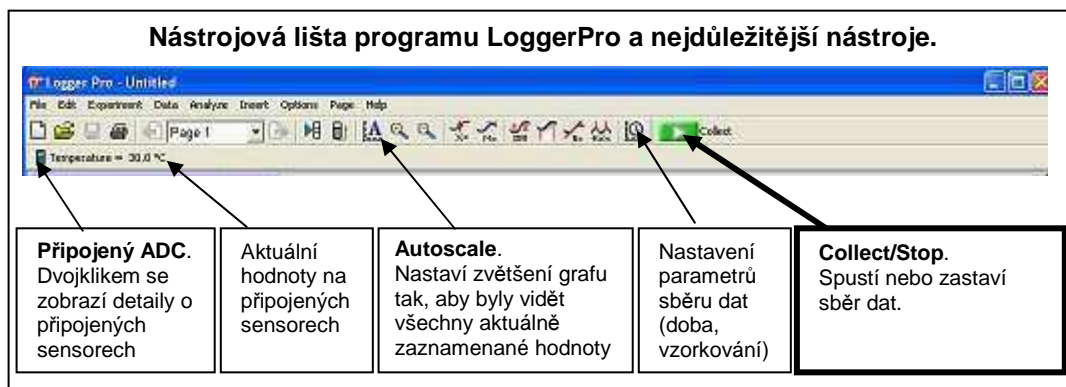
Program LoggerPro se spouští:

- poklepáním na odkaz na příslušnou úlohu z intranetových stránek;
- nebo obvyklým způsobem pro Windows – z menu: Start → Programs → Vernier Software → LoggerPro).

5.1. Task Bar

V horní části okna programu LoggerPro se nachází několik užitečných nástrojů a informací.

Spuštění měření se provádí stisknutím tlačítka  Collect.



Následující část textu je jen stručný návod, kde hledat nastavení základních funkcí a parametrů snímání dat, jak byly uvedeny výše. Opakujeme, že ve většině případů bude vše nastaveno automaticky, leč nelze na to spoléhat (podobně jako v budoucí praxi). Podrobný popis je v „on-line“ dokumentaci (Help programu LoggerPro).

5.2. Nastavení parametrů snímání dat – menu *Experiment* → *Data Collection ...* nebo .

V dialogu je mimo jiné možno nastavit:

- trvání snímání dat – docela užitečné;
- vzorkovací frekvenci;
- triggering – automatické spuštění snímání.

5.3. Kontrola připojení ADC a snímačů – menu *Experiment* → *Sensor Setup* nebo ikona .

vlevo. Otevře se dialog zobrazující připojený ADC a k němu připojené sensory a umožňuje manuálně připojit nebo odpojit snímače dle potřeby. Pokud ADC není připojen (nebo nekomunikuje se software), ikona chybí.

5.4. Kalibrace – menu *Experiment* → *Calibrate*

Kalibrace sensorů je nutná, pokud je to výslovně uvedeno v popisu úlohy (například u fotometrie). Kalibraci je vhodné zkontrolovat u všech úloh vždy, když měřená data neodpovídají očekávání. Postup je vcelku intuitivní a podrobný návod je součástí on-line Help nebo popisů jednotlivých úloh, pokud to je třeba.

5.5. Hodnocení výsledků – menu *Analyze* nebo ikony .

Analýza probíhá nad hodnotami v aktuálně vybraném grafu (ten, jehož okno je zvýrazněné) a v celém průběhu hodnot. Úsek pro analýzu je možno nastavit dle libosti, a to posunem hranatých závorek v grafu (tažením myší).

- **Statistics** vypočítá průměrnou hodnotu, median, odchylku a počet hodnot.
- **Linear fit** proloží hodnoty přímkou a uvede její rovnici.
- **Integral** integruje hodnoty ve vyznačeném intervalu.

5.6. Popis, tisk a uložení výsledků

- Popisky do aktuálního grafu se vkládají z menu *Insert* → *Text Annotation*.
- Tisknout lze z vybraných stanic. Tiskárna je umístěna ve cvičebně 2.
- Data je možno uložit pouze do složky N:\Students Notes a odtud mohou být kdykoliv bez varování smazána ☹.

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

6. „Troubleshooting“

Potíže mohou nastat jak na cvičeních, tak v praxi.

- 6.1. Nejde login – zkontrolujte přihlašovací údaje (viz bod 4 výše).
- 6.2. Obecné rady, pokud nastanou potíže.
 - Zkontrolujte napájení a zapnutí (PC, ADC, některé sensory). Působí to komicky, ale je to stále nejčastější příčina nefunkčnosti.
 - Zkontrolujte propojení kabelů (dle dokumentace u jednotlivých úloh – např. fotka na intranetových stránkách). Obecně viz schéma zapojení a odstavec 3 výše.
 - Pokud PC nebo software nereaguje. Zkuste postupně: 1. restartujte aplikaci, 2. vysuňte a zasuněte USB kabel propojující ADC a počítač a restartujte aplikaci, 3. restartujte PC, 4. požádejte o pomoc asistenta.
- 6.3. Možné potíže specifické pro jednotlivé úlohy a jejich řešení jsou uvedeny v příslušných kapitolách nebo na intranetu.

7. Úkoly

Cílem je prakticky se seznámit se systémem pro sběr dat, který bude používán v řadě úloh během praktických cvičení z Fyziologie tak, aby v konkrétních úlohách se bylo možno věnovat především fyziologické problematice.

- 7.1. Přihlašte se k PC a z intranetových stránek spusťte vhodnou úlohu.

Ke každému počítači mohou být připojeny jiné sensory vyžadující odlišné nastavení programu. Je možno:

 - spustit program LoggerPro (Start -> Programs -> Vernier Software -> LoggerPro). Program provede o autoidentifikaci snímačů a v naprosté většině správně nastaví pracovní plochu.
 - Spustit patřičnou úlohu z intranetových stránek (odkaz z domovské stránky pod názvem kapitoly). Úloha je již připravena pro naše cvičení. Zvolte úlohu podle sensorů nebo instrukcí u počítačů. Pozor: Program přesto provede kontrolu sensorů a pokud zjistí neshodu, upozorní na to dialogem. Situaci je možno řešit přepojením sensorů nebo ignorováním neshody.
- 7.2. Projděte všechny body odstavce 5 a vyzkoušejte.
- 7.3. Proved'te simulovaný sběr dat (event. bez připojení biologického subjektu) a analýzu.
- 7.4. Ve zbylém čase projděte i ostatní volby programu.

Výsledky:

Závěr:

Jméno:

studijní kroužek:

studijní skupina: A, B, C, D

.....
datum

.....
podpis vyučujícího

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

I. blok

2. Praktická cvičení z fyziologie krve
 - Stanovení počtu červených a bílých krvinek
 - Hemoglobinometrie, hematokrit, sedimentace
 - Krevní skupiny
3. Membránový potenciál

2. Praktická cvičení z fyziologie krve

(L. Šmídová, V. Šlapetová, M. Langmeier)

Úvod

Vyšetření krve patří mezi základní vyšetření používaná v klinické medicíně. Informuje nás o krevních elementech a jejich zastoupení, o poruchách krevního srážení, pomáhá v diagnostice onemocnění. Vyšetření krevních skupin je důležité pro převody krve, transplantace, k určení otcovství a i k identifikaci osob.

Úkol:

- 2.1. Stanovení počtu červených a bílých krvinek
- 2.2. Hemoglobinometrie
- 2.3. Stanovení hematokritu
- 2.4. Sedimentace erytrocytů
- 2.5. Základní hodnoty červené krevní složky
- 2.6. Hemostáza
- 2.7. Krevní skupiny

2.1. Stanovení počtu červených a bílých krvinek

Úvod

Krevní elementy – erytrocyty a leukocyty – počítáme v naředěné krvi mikroskopickou technikou v Bürkerově komůrce (obr. 2.1., 2.2., 2.3.). Počet erytrocytů patří mezi důležité základní hodnoty nejen při hematologickém, ale i celkovém vyšetření člověka. Množství erytrocytů se určuje buď pomocí mikroskopu nebo průtokovým cytofotometrem. Existuje již několik principů přístrojového počítání. Jedním z nich je registrace elektrických impulsů, které vznikají průchodem krvinek malým otvorem, opatřeným po stranách platinovými elektrodami, na které je přiváděn elektrický proud. Vzhledem k relativně malé vodivosti krvinek klesne každým průchodem krvinky vodivost mezi elektrodami a pokles vodivosti – impuls, je automaticky zaznamenán.

V praktickém cvičení zjišťujeme počet erytrocytů i leukocytů mikroskopicky jednoduchou baničkovou metodou, která je sice časově náročnější, ale je spolehlivá a stále se v klinických laboratořích, zvláště menších, používá.

Změny počtu leukocytů jsou důležitým ukazatelem při různých onemocněních, jako jsou např. infekce, záněty, nádorová onemocnění a samozřejmě i při chorobách krevní soustavy. U leukocytů je důležitý nejen celkový počet, ale i poměrné zastoupení jednotlivých typů. Větší počet mladších forem (tyčka) svědčí o zvýšené tvorbě neutrofilních granulocytů, převaha starších forem (více segmentované jádro) znamená útlum tvorby neutrofilních granulocytů.

U dospělého muže je průměrný počet erytrocytů $4,3-5,7 \cdot 10^{12}/l$, u žen $3,8-4,9 \cdot 10^{12}/l$.

Počet leukocytů u dospělého člověka je $4-10^9/l$ bez pohlavních rozdílů. Fyziologicky kolísá v souvislosti s tělesnou námahou, emocemi a příjmem potravy. Krev na počítání erytrocytů i leukocytů odebíráme ráno a nalačno.

Při práci s lidskou krví je bezpodmínečně nutné dodržovat zásady bezpečnosti práce, které se týkají jak odběru krve, tak i manipulace s ní.

2.1.1. Počítání erytrocytů

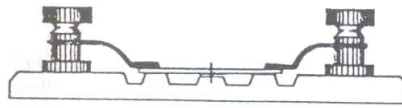
Pomůcky: banička pro počítání červených krvinek, Hayemův roztok, mikropipeta (25 μ l), Bürkerova komůrka, třepačka, mikroskop.

Provedení:

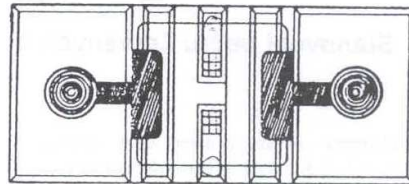
1. Do baničky pro počítání erytrocytů napipetujeme 4 975 μ l Hayemova roztoku. Pozor jed!
2. Mikropipetou přidáme napipetovaných 25 μ l krve (nezapomeneme opatrně otřít od krve zevní část pipety!). Opakovaným nasátím a vyfouknutím Hayemova roztoku z baničky mikropipetu 3x propláchneme.
3. Baničku necháme minimálně 3 min třepat v třepačce.
4. Připravíme si mikroskop (okulár 10x, objektiv 20x) a Bürkerovu komůrku – speciální podložní sklíčko.
5. Hned po skončení třepání kápneme Pasteurovou pipetou kapku krve (naředěné Hayemovým roztokem) ke hraně krycího sklíčka Bürkerovy komůrky. Kapilaritou se zředěná krev nasaje do komůrky, ale nesmí přetéci na horní plochu krycího sklíčka, ani do dělicí rýhy mezi poli s mřížkami.
6. Po 3 až 5 min (erytrocyty se usadí na dně komůrky) počítáme erytrocyty v 80 malých čtverečcích, které mají plochu $1/400 \text{ mm}^2$ tak, že počítáme všechny erytrocyty uvnitř čtverečku a ty, které se dotýkají vně i uvnitř dvou stran k sobě kolmých (obr. 2.3.).
7. Komůrkou v mikroskopu posouváme a postupně počítáme erytrocyty od prvního řádku k devátému.
8. Rozložení krvinek i po dokonalém protřepání vzorku není rovnoměrné, počet krvinek nad jednotlivými čtverečky je variabilní, proto je nutné sečíst výsledky z většího počtu čtverečků. S ohledem na jednoduchý výpočet je nejvhodnější počítat nad 80 čtverečky. Tím spočítáme krvinky v objemu $1/50 \text{ mm}^3$ 200x naředěného vzorku, tj. v $1/10\,000 \text{ mm}^3$.
9. Výsledek vyjádříme jako počet krvinek v 1 l krve.
10. Objem jedné komůrky pro výpočet erytrocytů je $1/4\,000 \text{ mm}^3$, erytrocyty spočítáme v 80 těchto komůrkách. Tuto sumu ($\Sigma 80$) máme v objemu $1/50 \text{ mm}^3$ naředěné krve ($1/4\,000 \text{ mm}^3 \times 80$). Abychom vyjádřili počet erytrocytů v objemu 1 mm^3 musíme $\Sigma 80$ vynásobit 50 a pak ještě 200, abychom dostali výsledek v plné krvi.

Složení Hayemova roztoku: chlorid rtuťnatý 0,5
 chlorid sodný 1,0
 síran sodný 5,0
 dest. voda ad 200,0.

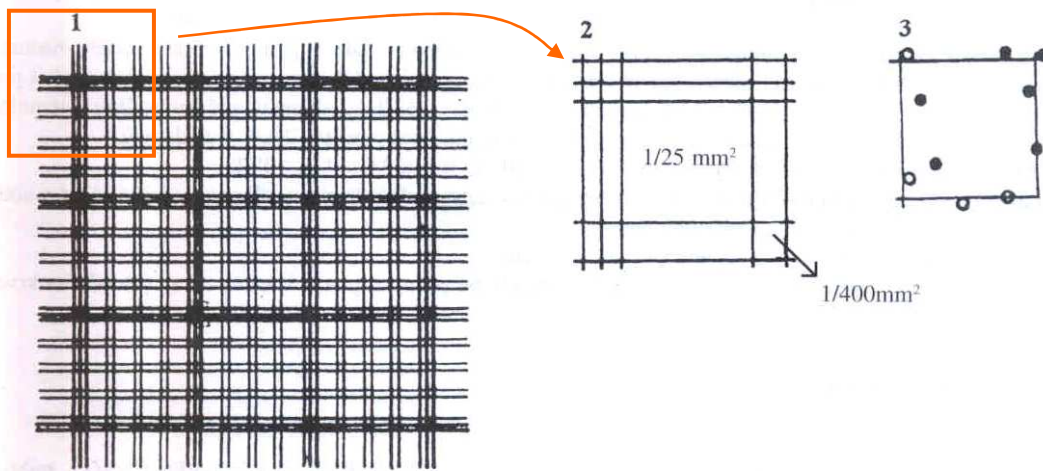
Hayemův roztok je mírně hypertonický. Sublimát v něm obsažený fixuje erythrocyty.



Obr. 2.1. Bürkerova komůrka při pohledu ze strany



Obr. 2.2. Bürkerova komůrka při pohledu shora



Obr. 2.3. Bürkerova komůrka: 1. mřížka Bürkerovy komůrky, 2. schéma čtverečků pro červené a bílé krvinky, 3. počítáme krvinky označené plnými kroužky

Hodnocení:

Řádek	čtverce	Součet
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		X
Celkem		

Počet erythrocytů v 1 mm³ krve = _____

Počet erythrocytů v 1 l krve = _____

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Závěr:**2.1.2. Počítání leukocytů**

Princip počítání leukocytů je stejný jako u erytrocytů, ale krev se ředí Türkovým roztokem pouze 20x a leukocyty se počítají ve větších čtvercích.

Složení Türkova roztoku:

Kyselina octová	3,0
1 % vodný roztok genciánové violeti	2,0
destilovaná voda	ad 300,0.

Kyselina octová rozruší erytrocyty, genciánová violeť obarví jádra leukocytů.

Pomůcky: banička pro počítání bílých krvinek, mikropipeta (25 μ l), Türkův roztok, třepačka, mikroskop.

Provedení:

1. Do baničky pro počítání leukocytů napipetujeme 475 μ l Türkova roztoku.
2. Mikropipetou přidáme 25 μ l krve. Opakovaným nasátím a vyfouknutím roztoku propláchneme aspoň 3x mikropipetu od krve. V případě nepřesného náběru krve použijeme jinou mikropipetu.
3. Baničku necháme minimálně 3 min třepat v třepačce.
4. Leukocyty (jejich obarvená jádra) počítáme podle stejného principu jako erytrocyty, ale nad 50 většími čtverečky o ploše 1/25 mm^2 . Výsledný součet jader nad 50 čtverečky odpovídá počtu jader v objemu 1/5 mm^3 20x naředěného vzorku, v 1/100 mm^3 původní krve.
5. Výsledek převedeme na hodnotu v 1 litru krve a porovnáme s fyziologickou normou.

Výpočet: Objem jedné komůrky pro výpočet leukocytů je 1/250 mm^3 , leukocyty spočítáme v 50 těchto komůrkách. Tuto sumu ($\Sigma 50$) máme v objemu 1/5 mm^3 naředěné krve (1/250 $\text{mm}^3 \times 80$). Abychom vyjádřili počet leukocytů v objemu 1 mm^3 musíme $\Sigma 50$ vynásobit 5 a pak ještě 20, abychom dostali výsledek v plné krvi.

Hodnocení:

Řádek	čtverce												Součet	
1.														
2.														
3.														
4.														
5.			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Celkem														

Počet leukocytů v 1 mm^3 krve = _____

Počet leukocytů v 1 litru krve = _____

Závěr:

Kontrolní otázky:

1. Jaký je počet erytrocytů u novorozenců? Kdy vznikají pohlavní rozdíly a proč?
2. Za jakých podmínek se odebírá krev na počítání leukocytů? Co může ovlivnit jejich počet?
3. Jak se změní erytrocyty v hypertonickém roztoku?
4. Jaké je procentové zastoupení jednotlivých druhů leukocytů v krvi dospělého člověka?
5. Jak se funkčně liší erytrocyty od leukocytů?

Jméno:

Příjmení:

Kroužek:

Skupina: A, B, C, D

.....
datum.....
podpis vyučujícího

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Jméno:

Příjmení:

Kroužek:

Skupina: A, B, C, D

2.2. Hemoglobinometrie

Úvod

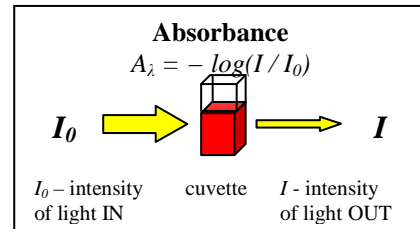
Složitější metody gazometrické určují vazebnou kapacitu pro kyslík a z ní usuzují na obsah hemoglobinu (Hb). Z plně oxygenovaného vzorku krve je kyslík vytěsněn a změřen jeho objem. Při výpočtu se vychází ze skutečnosti, že 1 g Hb uvolnil 1,39 ml O₂. Tyto metody jsou ale velmi pracné a v rutinní klinické praxi se nepoužívají.

Množství hemoglobinu ve vyšetřované krvi stanovujeme nejčastěji kolorimetricky měřením intenzity absorpce světla o určité vlnové délce. Absorbance je přímo úměrná koncentraci rozpuštěné látky. Kolorimetrickou analýzou určíme ovšem veškerý hemoglobin, i inaktivní, neschopný přenášet kyslík (např. methemoglobin).

Barva oxygenovaného či deoxygenovaného Hb není stabilní, mění se podle nasycení kyslíkem. Proto je nutné převést veškerý hemoglobin na stabilní barevnou formu jeho oxidací.

Při kolorimetrickém stanovení hemoglobinu pracujeme s vizuálním zředňovacím kolorimetrem (Sahliho hemometr) a s přesnějším spektrofotometrem, který se používá v klinických laboratořích.

Koncentrace Hb u muže je 130–180 g/l krve, u ženy 120–160 g/l. Určování koncentrace Hb má význam pro jeho nezastupitelnou funkci v erythrocytech. Je ovšem nutno zjistit a zároveň posoudit i množství erythrocytů.



Úkol

2.2.1. Spektrofotometrické stanovení Hb v krvi – Drabkinova metoda

2.2.2. Orientační kolorimetrické stanovení množství hemoglobinu – Sahliho metoda

2.2.1. Spektrofotometrické stanovení Hb v krvi (Drabkinova metoda)

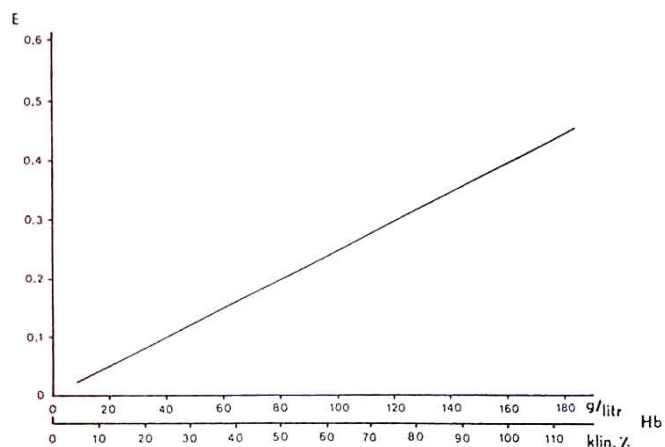
V Drabkinově roztoku erythrocyty hemolyzují a uvolněný Hb oxiduje na cyanmethemoglobin (KCN), jehož barevnou intenzitu měříme ve vhodném spektrofotometru. Program LoggerPro nám po předchozí kalibraci s čistým Drabkinovým roztokem přímo vynese hodnoty absorbance (extinkce) a odpovídající koncentrace Hb v g/l v našem vzorku.

Složení Drabkinova roztoku:	natrii hydrocarbonici	1,0	
	KCN	0,052	(POZOR JED!)
	kaliu ferricyanati	0,198	
	destilovaná voda	ad 1 000,0	

Pomůcky: kyvety, mikropipeta 20 µl, Drabkinův roztok, spektrofotometr.

Provedení:

1. Do kyvet napipetujeme 3 ml Drabkinova roztoku. (Pozor – jed!)
2. Mikropipetou přidáme 20 µl krve a promícháme.
3. 10 minut necháme reagovat.
4. Fotometrujeme proti čistému Drabkinovu roztoku při vlnové délce 565 nm.
5. V programu LoggerPro odečteme koncentraci hemoglobinu v g/l. Porovnáme s fyziologickou normou.
6. Vyšetření provedeme u 3 vzorků krve laboratorního potkana (nebo prasečí krve podle momentální dostupnosti) – normo-, oligo-, polycytemická krev (viz úkol 1.3.) a výsledky zapíšeme do tabulky.



Obr. 2.5. Kalibrační křivka pro určení koncentrace Hb Drabkinovou metodou

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Hodnocení:

Vzorek krve	Koncentrace Hb (g/l)	Poznámka
1.		
2.		
3.		

Závěr:

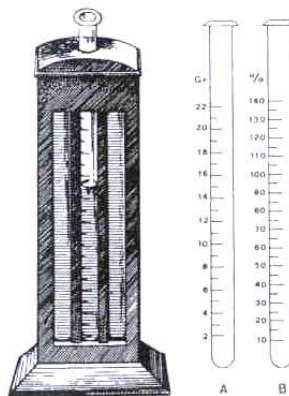
2.2.2. Orientační kolorimetrické stanovení množství hemoglobinu (Sahliho metoda)

Přidání kyseliny chlorovodíkové ke vzorku krve způsobí hemolýzu a uvolněný hemoglobin oxiduje na kyselý hematin hnědé barvy. Destilovanou vodou ředíme kyselý hematin tak dlouho, až je zabarvení vzorku zcela shodné s barvou dvou skleněných standard. Význam této orientační metody spočívá v jednoduchém a názorném předvedení, jak se Hb účinkem HCl mění na barevně stálý hematin (chlorhematin). Při subjektivním posuzování zabarvení hematinu a standard je možná chyba výsledku až ± 10 %.

Pomůcky: mikropipeta 20 µl, Sahliho hemometr, 0,1 N HCl, tyčinka na míchání.

Provedení:

1. Do kalibrované zkumavky v Sahliho hemoglobinometru (obr. 2.6.) napipetujeme 0,1 N HCl po značku 10 na černé stupnici.
2. Přidáme 20 µl krve hematologickou mikropipetou.
3. Mikropipetu propláchneme opakovaným nasáváním a vypouštěním kyseliny ve zkumavce.
4. Obsah zkumavky protřepeme a necháme stát při pokojové teplotě 10 min.
5. Za stálého míchání tyčinkou přidáváme po kapkách destilovanou vodu tak dlouho, až se barva roztoku ve zkumavce shoduje s barvou skleněných standard.
6. Výška hladiny roztoku ve zkumavce udává na stupnici množství Hb ve vyšetřované krvi jednak v g % (množství Hb v g ve 100 ml krve), jednak v klinických procentech (16 g % = 100 klinických %).
7. Výsledky převedeme na g/l a porovnáme s hodnotami zjištěnými Drabkinovou metodou.



Obr. 2.6. Sahliho hemoglobinometr. Zkumavka ve stojánku je kalibrovaná v g % (A) a v klinických % (B)

Hodnocení:

Vzorek krve	Hb (g/l)- Drabkin	%	Hb (g/l) - Sahli	%	Zhodnocení
1.					
2.					
3.					

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Závěr:

2.3. Stanovení hematokritu (HTK)

Úvod

Hematokrit vyjadřuje objemové zastoupení erytrocytů z celkového objemu krve. U mužů je hodnota HTK 0,39–0,51, u žen 0,33–0,47. Stanovení hematokritové hodnoty je důležité z mnoha klinických hledisek, mj. i pro výpočet základních hodnot červené krvinky.

Při určování HTK zjišťujeme objemové procento erytrocytů z celkového objemu centrifugované krve. Po centrifugaci jsou jednotlivé složky krve rozděleny podle hmotnosti. Nejnižší je sloupec erytrocytů, nad ním tenká vrstvička leukocytů a trombocytů a nejvýše je sloupec plazmy.

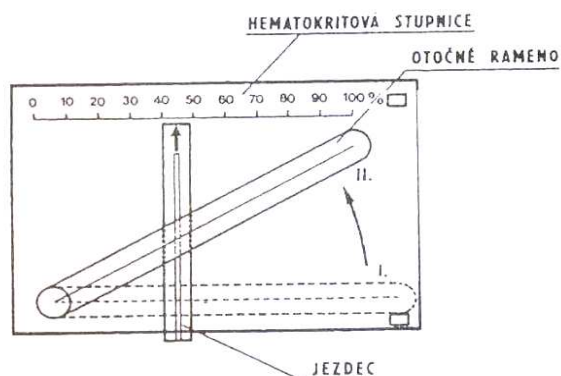
Mikrohematokritovou metodou budeme určovat HTK z krve laboratorního potkana (nebo z krve prasete), a to ze 3 různých vzorků, které byly připraveny předem:

1. část čerstvě odebrané krve představuje vzorek normocytémické krve.
2. Polycytemická krev byla připravena tak, že z jedné zkumavky centrifugované krve se odebralo cca třetinové množství plazmy.
3. Po přidání plazmy do další zkumavky s plnou krví vznikl vzorek oligocytémické krve.

Pomůcky: tři různé vzorky krve, mikrohematokritové kapiláry, speciální plastelína nebo kahan, centrifuga.

Provedení:

1. Mikrohematokritovou heparinizovanou kapiláru ponoříme do zkumavky se vzorkem krve a nakloníme do vodorovné polohy. Na principu vztlakovosti naplníme kapiláru krví asi do $\frac{3}{4}$ délky.
2. Tímto způsobem naplníme kapiláry krví ze všech 3 vzorků připravené krve (normo-, oligo-, polycytemická krev).
3. Volný konec kapiláry, kde není krev, zatavíme nad kahanem.
4. Kapiláry vložíme do centrifugy uzavřeným koncem směrem na obvod centrifugy, kterou pevně uzavřeme a odstředíme po dobu 3 min při 13 000 ot./min.
5. Na měřicím pultu (obr. 2.7.) odečteme hodnotu relativní výšky sloupce erytrocytů:
 - a) jezdce na panelu posuneme vpravo na hodnotu 100 % a otočné rameno stočíme do krajní polohy (poloha I),
 - b) kapiláru se zcentrifugovanou krví vložíme do drážky na jezdci tak, aby dolní část sloupce krve byla ohraničena dole (v uzavřeném konci kapiláry) dolní ryskou a horní část středovou ryskou otočného ramene, které do této polohy stočíme (poloha II). Tím si nastavíme celkový objem krve = 100 %,
 - c) při fixovaném otočném rameni posunujeme jezdce pomalu doleva jen tak dlouho, než středová ryska otočného ramene protne rozhraní mezi sloupcem erytrocytů a plazmy. Šipka jezdce ukáže na stupnici měřicího pultu hematokritovou hodnotu přímo v procentech,
 - d) odečtenou hodnotu násobíme korekčním faktorem 0,98, protože pro přesný výsledek je nutné si uvědomit, že ve sloupci erytrocytů zůstává malé množství plazmy, tj. 2 %. Hodnoty hematokritu zapíšeme do tabulky a můžeme je použít pro výpočet dalších hodnot (např. objem a barevná koncentrace erytrocytu – viz úkol 2.5.).



Obr. 2.7. Schéma měřicího pultu pro mikrohematokritovou metodu

Hodnocení:

Vzorek krve	HTK	Zhodnocení
1.		
2.		
3.		

Závěr:**Kontrolní otázky:**

1. Jaká je funkce hemoglobinu?
2. Jak vypadá molekula Hb? Jak a kde se váže Fe^{2+} ?
3. Jaký je klinický význam hematokritu?

2.4. Sedimentace erytrocytů (SE, FW)

Úvod

U zdravého člověka je rychlost, s jakou erytrocyty samovolně sedimentují v nesrážlivé krvi, pomalá a konstantní.

Sedimentace u mužů je 2–10 mm/h, u žen je 3–21 mm/h (u žen je vyšší obsah fibrinogenu a menší počet erytrocytů).

Čím stářejší je suspenze erytrocytů v plazmě, tím pomalejší je sedimentační rychlost. V případě tvorby erytrocytárních agregátů se sedimentace zvyšuje. Přítomností látek podporujících vrstvení erytrocytů se snižuje povrchový náboj erytrocytů, a tím se poruší jejich suspenzní stabilita. Sedimentační rychlost ovlivňují především plazmatické bílkoviny. Proto při zvýšeném množství fibrinogenu a globulinů a při tvorbě atypických bílkovin je hodnota sedimentace vysoká i přes 100 mm/h.

Vyšší hodnoty sedimentace nalézáme při sníženém počtu erytrocytů (oligocytémie, anémie), při změnách pH (alkalóza), při zvýšené lipémii a při nádorových onemocněních.

Vyšetření sedimentace je nespecifická orientační zkouška a v klinické praxi slouží jako ukazatel zdravotního stavu pacienta. Stanovuje se při podezření na zánětlivé, infekční, alergické a nádorové procesy. Sledování dynamiky sedimentačních hodnot při opakovaných vyšetřeních má větší význam než jediný, náhodný nález (kontrola úspěšnosti léčby). Výsledky vyšetření odečítáme za 1 h. Při velmi nízké SE odečítáme výsledek za 2 h nebo za 24 h. Za 2 h nemají hodnoty překročit u mužů 27 mm a u žen 48 mm. Podle jiných kritérií se udává, že hodnota za 2 h nemá překročit dvojnásobek za 1 h. Vyšetření se provádí vždy nalačno a v ranních hodinách.

Pro určování rychlosti SE se používá od 20. let 20. století metoda podle Fahraeuse a Westergrena (FW metoda) (obr. 2.8.), později byla zavedena metoda urychlené sedimentace podle Wintrobeho (obr. 2.9.).

V současné době se provádějí odběry krve a stanovení FW sterilním bezpečnostním vakuovým systémem. Uzavřený vakuový systém sloužící k odběru krve pro analýzy v laboratorní diagnostice tvoří tři části:

1. sterilní zkumavka z plastické hmoty s vakuem, která slouží k odběru krve s přesným množstvím Na^+ citrátu pro FW.
2. Držák jehly pro opakované použití, který nepřichází do kontaktu s krví.
3. Sterilní odběrová jehla, umožňující odběr krve do jedné nebo více zkumavek a zároveň k intravenózní aplikaci. Jehla má dva hroty. První hrot slouží k prakticky bezbolestné venepunkci, druhý, opatřený gumovým hemostatickým ventilem, je určen k perforaci uzávěru zkumavky z jemné gumy, a tím k nasátí požadovaného množství krve bez dřívější nutnosti manipulace s pístem stříkačky.

Poznámka: Podle nejnovějších referenčních hodnot se toleruje rozmezí 1–20 mm/h bez pohlavních rozdílů. Mimo sedimentaci se také stanovuje C-reaktivní protein (CRP), který je zařazen mezi bílkoviny akutní fáze. Jeho produkce v játrech, reakce na zvýšení IL-6 (tvoří se v makrofázích a adipocytech), stoupá při akutních zánětech (zejména při bakteriálních infekcích), ale i při tkáňovém poškození. CRP u zdravého člověka (0–9 mg/l) stoupne při zánětu během několika hodin až na hodnoty 40–200 mg/l. Stejně jako u sedimentace má význam sledování dynamiky zjištěných hodnot než hodnota jediná.

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

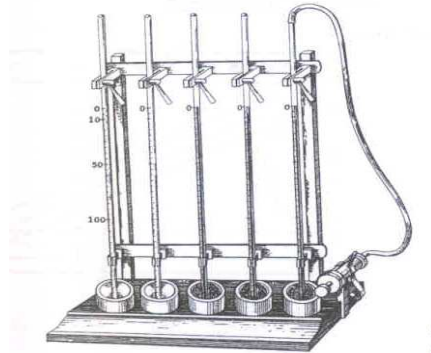
2.4.1. Stanovení SE podle Fahraeuse a Westergrena (metoda FW)

Měříme pokles sloupce erytrocytů v sedimentační pipetě, která je naplněna nesrážlivou krví a výsledek odečteme v mm za 1 h (obr. 2.8.).

Pomůcky: 2 ml injekční stříkačka, Fahraeusův-Westergrenův přístroj, 3,8% citrát sodný.

Provedení:

1. Do suché 2 ml injekční stříkačky nasajeme 0,4 ml 3,8% citrátu sodného a 1,6 ml krve laboratorního potkana (prasete), přisajeme trochu vzduchu a dobře promícháme krev s citrátem.
2. Nesrážlivou krví naplníme gumovou misku FW přístroje a pomocí gumového kloboučku nebo injekční stříkačky s hadičkou nasazenou na horní konec sedimentační pipety plynule nasajeme krev do pipety přesně po značku 0.
3. Sedimentační pipetu lehce přitlačíme ke dnu gumové misky, fixujeme ve stojanu a zaznamenáme čas. V této kolmé poloze necháme krev stát při pokojové teplotě a za 1 h (popř. i za 2 h) odečteme pokles sloupce erytrocytů v mm.



Obr. 2.8. Fahraeusův-Westergrenův sedimentační přístroj

Hodnocení:

U každé metody odečteme 2 výsledky a zapíšeme do tabulky.

Krev	FW metoda	Witrobeho metoda	Zhodnocení

Závěr:

2.5. Vypočítávané hodnoty červené krevní složky

Po stanovení hodnot hemoglobinu, hematokritu a počtu erytrocytů v krvi můžeme vypočítat následující hodnoty. Pro představu jsou uvedeny konkrétní příklady fyziologických hodnot (nikoliv jediné možné!).

1. Průměrný objem erytrocytu (MCV = mean cell volume, mean corpuscular volume):

$$MCV = \frac{\text{hematokrit}}{\text{poč}_{\text{ery}}[l^{-1}]} \qquad MCV = \frac{0.43}{5 \cdot 10^{12} l^{-1}} = 86 \text{ fl}$$

U zdravého jedince je průměrný objem erytrocytu 80–95 fl (normocyt), při makrocytárních anémiích dojde ke zvýšení nad 96 fl (makrocyt) a u mikrocytárních anémií ke snížení pod 80 fl (mikrocyt).

2. Průměrná hmotnost hemoglobinu v erytrocytu (MCH = Mean Cell Hemoglobin):

$$MCH = \frac{\text{hemoglobin}[g/l]}{\text{poč}_{\text{ery}}[l^{-1}]} \qquad MCH = \frac{140 g/l}{5 \cdot 10^{12} l^{-1}} = 28 \text{ pg}$$

Rozmezí mezi 27–32 pg je považováno za normu, nižší hodnoty bývají u hypochromních anémií, vyšší bývají u makrocytárních anémií.

3. Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC – Mean Cell Hemoglobin Concentration):

$$MCHC = \frac{\text{hemoglobin}[g/l]}{\text{hematokrit}} \qquad MCHC = \frac{140 g/l}{0.43} = 325 g/l$$

Rozmezí této hodnoty je 310–360 g Hb /l erytrocytů.

Hodnocení:

Vzorek	Hb (g/l krve)	HTK (%)	MCHC (g/l ery)
1.			
2.			
3.			

Závěr:

Jméno:

Příjmení:

Kroužek:

Skupina: A, B, C, D

.....
datum

.....
podpis vyučujícího

Jméno: **Příjmení:** **Kroužek:** **Skupina: A, B, C, D**

2.6. Hemostáza

Úvod

Hemostáza (zástava krvácení) je životně důležitý děj, který chrání organismus před ztrátou krve při poranění. Na zástavě krvácení se podílejí ve vzájemné souhře tři děje (obr. 2.11.):

1. reakce cév v místě poranění,
2. činnost krevních destiček,
3. hemokoagulace (srážení krve).

Stupeň uplatnění jednotlivých dějů a úspěšný výsledek celého komplexu závisí na druhu, místě a rozsahu poranění. Při zasažení velkých tepen nebo žil tyto mechanismy nestačí. Zde je nutné zastavit krvácení umělým zásahem (zaškrcením, chirurgicky). Ve středních a malých cévách se hemostatické děje uplatňují velmi významně. Při poranění kapilární stěny stačí k zástavě krvácení destičkový trombus.

Po těchto hemostatických dějích následuje časově oddálenější fibrinolýza, reparace a rekanalizace cévy.

1. Reakce cév v místě poranění

Velmi rychlá vazokonstrikce v místě poranění je výsledkem nejen místní reflexní činnosti poraněné cévy, ale i odpovědí na řadu humorálních faktorů, které se uvolňují z aktivovaných destiček (serotonin, adrenalin, tromboxan A_2) nebo vznikají během hemokoagulace (fibrinopeptidy). Vazokonstrikce se uplatňuje zejména ve středních artériích, arteriolách a venulách. V kapilárách vazokonstrikce nenastává, protože nemají svalovou vrstvu.

2. Činnost krevních destiček

Destičky jsou při neporušené kontinuitě cévní stěny v klidové (neaktivní) formě. Jakmile se poruší cévní stěna (poraněním, poškozením, zánětem), aktivují se odkrytým kolagenem. Trombocyty se během několika milisekund přichytí k subendoteliálnímu pojivu díky interakci mezi specifickými receptory na svém povrchu a určitými vazebnými místy molekuly kolagenu zprostředkované von Willebrandovým faktorem. Tato adheze (přilnutí) destiček k porušené cévní stěně je provázána jejich morfologickou přeměnou (nabobtnání, tvorba výběžků) a nazývá se primární agregace. Je reverzibilní. Destičky se mohou ještě uvolnit a odplynout krví. Sekundární agregace je ireverzibilní a je spojena s tzv. uvolňovací reakcí (degranulací), vedoucí k vyplavení obsahu jejich granul do okolí. Tvarově změněné destičky se shlukují, přimykají k sobě (agregace) a vytvoří ze svých těl provizorní hemostatickou zátku (trombus).

Aktivátory adheze jsou kromě kolagenu i ADP (z poškozených buněk) a trombin. Agregaci podporuje rovněž ADP, trombin a tromboxan A_2 (z aktivovaných destiček). K aktivátorům agregace patří i adrenalin, vazopresin a faktor aktivující destičky (PAF – Platelet Activating Factor), který se uvolňuje z aktivovaných neutrofilů, bazofilů, makrofágů, destiček i porušeného endotelu.

Aktivitu krevních destiček (adhezi, agregaci, degranulaci) tlumí intaktní cévní endotel a látky jím produkované (prostacyklin PGI_2 a oxid dusnatý). Z léků má antiagregační účinek kyselina acetylosalicylová, která inhibuje sekreci tromboxanu A_2 (prevence trombózy).

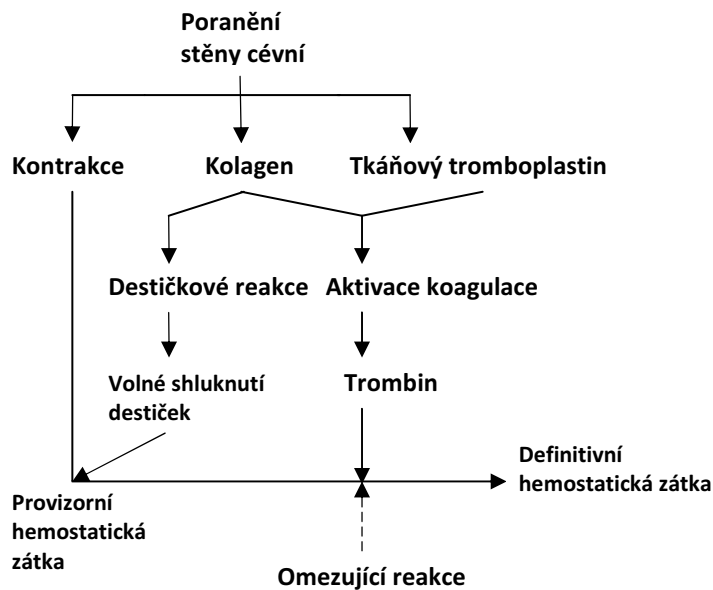
3. Hemokoagulace (srážení krve)

Srážení krve je soubor enzymatických dějů, kterých se zúčastňuje řada plazmatických faktorů, lipidy a vápenaté ionty. Výsledkem je přeměna tekuté krve v nerozpustný gel, tj. přeměna rozpustného fibrinogenu v nerozpustný fibrin. Takto vytvořené fibrinové vlákno zpevní provizorní hemostatickou zátku z aktivovaných destiček, která se tak stane mechanicky odolnější a hustší (definitivní hemostatická zátka).

Hemokoagulace se účastní koagulační faktory označené I–XIII tvořící vnitřní, zevní a společný koagulační systém. Aktivují se pouze v místě poranění a děje jsou časově omezeny. Vnitřní koagulační systém se aktivuje stykem se záporným povrchem (kolagen, bazální membrána, fosfolipidy z destiček, aktivované destičky), zevní koagulační systém aktivuje tkáňový tromboplastin uvolněný z poškozených buněk. Oba tyto systémy konvergují do jednoho společného sledu dějů (společný systém), který začíná aktivací faktoru X a končí vytvořením pevného fibrinového vlákna.

Rozsah biochemických reakcí hemokoagulace je pod kontrolou inhibičních mechanismů, omezujících srážení krve lokálně i časově. Kromě nesmáčivého cévního endotelu zabraňujícího hemokoagulaci vůbec a proudu krve, který odplavuje a ředí koagulační faktory, se na inhibici podílí řada negativních zpětných vazeb a specifické inhibitory. Příkladem negativní zpětné vazby je vliv fibrinu na inaktivaci trombinu. Nejdůležitějším specifickým inhibítozem je antitrombin III, syntezovaný v játrech, který je kofaktorem heparinu a oba společně inhibují trombin a některé další koagulační faktory (IX, X, XI, XII). Umělým antikoagulačním prostředkem je např. citrát sodný, který způsobuje dekalciifikaci plazmy, nebo kumarin a jeho deriváty, blokující účinek vitamínu K na syntézu faktorů II, VII, IX a X. Je-li v krvi přítomen antitrombin III, má silné antikoagulační účinky heparin (fyziologicky přítomný v krvi) podaný v koncentraci 5 mg/l parenterálně.

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.



Obr. 2.11. Přehled reakcí podléjících se na hemostáze

Úkol:

- 2.6.1. Určování odolnosti krevních kapilár (Rumpel-Leede)
- 2.6.2. Stanovení tromboplastinového času (Quick)
- 2.6.3. Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)
- 2.6.4. Některá další vyšetření pouze teoreticky

2.6.1. Určování odolnosti krevních kapilár (Rumpel-Leede)**Úvod**

Přechodnou změnou krevního tlaku v kapilárách (podtlak, přetlak) můžeme sledovat jejich odolnost na tuto tlakovou situaci. Při snížení odolnosti kapilární stěny vzniká drobné krvácení do kůže (hemoragická diatéza) vzhledu petechií až purpury. Petechie jsou drobné krevní výronky do kůže velikosti vpichu špendlíku, špendlíkové hlavičky nebo i větší. Nevystupují nad povrch kůže a neblednou při stlačení. Generalizovaný výskyt petechií se nazývá purpura.

Přetlaková zkouška odolnosti krevních kapilár podle Rumpela-Leede je založena na venostáze způsobené zamezením odtoku žilní krve z příslušné oblasti, a tím vytvoření zvýšeného krevního tlaku v kapilárách. Stupeň odolnosti kapilár je závislý jednak na vlastní odolnosti kapilární stěny vůči tlakové zátěži, jednak na reparační schopnosti trombocytů udržovat integritu endotelu. Na základě toho rozdělujeme hemoragické diatézy na vaskulární, způsobené poruchou cévní stěny (vrozené, toxické, imunologické, způsobené hypovitaminózou C), a diatézy provázené poruchou destiček (trombocytopenie, trombocytopenie, trombastenie).

Pomůcky: měřítko, tonometr, fonendoskop.

Provedení:

Posluchači vyšetřují sami sebe ve dvojicích.

1. Na kůži loketního ohbí (nebo na volární straně předloktí) určíme plochu 4 x 4 cm.
2. Zjistíme hodnotu krevního tlaku a manžetu tonometru, přiloženou na paži, nafoukneme na hodnotu tlaku, který odpovídá tlaku diastolickému + polovina hodnoty tlakové amplitudy (tlak zamezí žilnímu odtoku, ale arteriální přítok do předloktí a ruky zůstane zachován).
3. Tlakem působíme 5 min. Po uvolnění komprese (vypuštění manžety a její odstranění) sledujeme v určeném čtverci vznik petechií, jejichž počet odečteme až po 15 min. Na kůži loketního ohbí se může objevit maximálně 10 nově vytvořených petechií (na volární straně předloktí pouze 1–3 petechie). Pokud jejich počet přesahuje stanovený limit, jde o sníženou odolnost kapilár na zvýšení krevního tlaku a výsledek hodnotíme od + až +++ podle rozsahu postižení.

Při pokusu můžeme také sledovat změny zabarvení kůže, jak během komprese, tak i po jejím skončení a pokusíme se je vysvětlit a pojmenovat (změny pCO₂, množství redukovaného Hb, vazodilatace).

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Odolnost krevních kapilár můžeme vyšetřovat i podtlakovou metodou, kdy pomocí skleněného zvonku a tahem pístu ve stříkačce vytvoříme podtlak 100 mmHg, kterým působíme 1 min na libovolném místě na kůži. Pokud nevzniknou petechie, zvyšujeme podtlak o 25 mmHg a sledujeme zase jiné místo. Do hodnoty 150 mmHg by se petechie neměly tvořit. Sací pokus můžeme libovolně opakovat, ale přetlakovou metodu Rumpelovu-Leedeovu až po týdnů. Vyšetření je však vždy velmi orientační, pozitivní výsledky mohou být i u zdravých jedinců.

Hodnocení:

Vyšetřovaný	TK	TK v manžetě	Počet petechií		Výsledek
			Loketní ohbí	Volární strana předloktí	

Závěr:

2.6.2. Stanovení tromboplastinového času (Quickův test, TT test, INR = International Normalized Ratio)

Úvod

Určení tromboplastinového času testuje zevní koagulační systém zastoupený faktorem VII, vápenatými ionty a aktivovaný tkáňovým tromboplastinem. In vivo se tkáňový tromboplastin uvolňuje z poškozených tkání, in vitro jej podáváme v nadbytku jako kompletní tromboplastin (dříve trombokináza), což je proteinolipidový komplex získaný z lidské mozkové tkáně. K testu potřebujeme dekalifikovanou plazmu vyšetřovaného, kterou získáme vysycením vápenatých iontů citrátem sodným, přidaným k žilní krvi v poměru 1:9 (0,5 ml citrátu sodného a 4,5 ml krve) a následným odstředěním 10 min při 2 000 ot./min. Tromboplastinový čas zjistíme sledováním doby potřebné k vytvoření prvního fibrinového vlákna po smíchání dekalifikované plazmy, kompletního tromboplastinu a vápenatých iontů, a to při teplotě 37 °C. Výsledný čas závisí na koncentraci jednotlivých koagulačních faktorů zevního i společného systému (VII, V, X, II a I).

Rozmezí fyziologických hodnot tromboplastinového času je 12–15 s. Pro standardizaci výsledku testu se používá mezinárodní normalizační poměr **INR (International Normalized Ratio) jehož fyziologické rozmezí je 0,9–1,28.** Je to poměr hodnoty TT sledovaného vzorku a TT kontrolní (standardní) plazmy. Podle hodnot INR se koriguje a monitoruje antikoagulační terapie (např. pro terapii a profylaxi tromboembolických chorob se jeho hodnota udržuje na 2,0–3,0). TT je prodloužen fyziologicky u novorozenců pro nedostatek faktoru VII, patologicky při nedostatku vitamínu K, při poruchách jaterního parenchymu, při nedostatku fibrinogenu nebo v přítomnosti antikoagulantů antitrombinové (heparinové) povahy.

Pomůcky: zkumavky, vodní lázeň, kontrolní plazma, tromboplastin, 0,025 M CaCl₂, mikropipeta, stopky, háček.

Provedení:

1. Do vodní lázně 37 °C teplé dáme do čistých zkumavek předeřít sledovanou i kontrolní plazmu, tromboplastin, 0,025 M CaCl₂ a prázdnu, čistou a suchou zkumavku.
2. Asi po 3 min nahřátí napipetujeme do předeřáté čisté zkumavky postupně jednotlivé složky po 0,1 ml tak, že nejprve napipetujeme citrátovou plazmu, pak tromboplastin a nakonec vápenaté ionty. Špičky na pipetě musí být pro každou složku zvlášť.
3. Jakmile podáme vápenaté ionty, začneme měřit čas a směsí protahovat háček (kovový nebo

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

- skleněný) a sledujeme vytvoření prvního fibrinového vlákna (bílá nitka, kterou ze směsi vytáhneme). V okamžiku jeho vytvoření odečteme čas.
4. Vyšetření provádíme se stejnou plazmou 2x a vypočítáme průměr. Pokud se hodnoty těchto dvou měření liší o více než 5 %, vyšetření opakujeme ještě jednou. Stejně postupujeme i s plazmou kontrolní, kterou testujeme aktivitu připraveného tromboplastinu.
 5. Z časů sledované a kontrolní plazmy vypočítáme INR a výsledek posoudíme.

Hodnocení:

Pokus	Čas vyšetřované plazmy	Čas kontrolní plazmy	INR

Závěr:**2.6.3. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT)****Úvod**

Test aktivovaného částečného tromboplastinového času sleduje účinnost vnitřního koagulačního systému. Set připravený pro tento test (vyrábí Sevac) obsahuje kaolin-kefalinový komplex, v němž kaolin zastupuje definovaný aktivátor kontaktu (záporný povrch), a kefalin je parciální tromboplastin, který nahrazuje destičkový fosfolipid, nutný k aktivaci faktoru X. Kefalin se získá naředěním kompletního tromboplastinu v poměru 1:100. Plazma připravená k tomuto vyšetření musí být proto nejen dekalciifikovaná, ale zbavená i destiček (odstředění aspoň 10 min při 2 000 ot./min).

Parciální tromboplastinový čas je závislý především na počátečních dějích hemokoagulace ve vnitřním systému, a to na faktorech XII, XI, IX a VIII. Teprve v druhé řadě zachycuje účinnost faktorů společného systému, tj. X, V, II a I.

Normální doba testu je 28–40 s. Čas se opět srovnává s hodnotou času standardní plazmy a jejich poměr má mít fyziologickou hodnotu 0,83–1,3 (APTTTR).

APTT je prodloužen u hemofilie A (nedostatek faktoru VIII), hemofilie B (nedostatek faktoru IX), vzácně při nedostatku faktoru XI a XII, při zvýšení hladiny štěpných produktů fibrinogenu, po podání heparinu a také v přítomnosti protilátek proti některým hemokoagulačním faktorům.

Pomůcky: APTT set, 0,025 M CaCl₂, krevní plazma, vodní lázeň, zkumavky, stopky, háček, pipeta.

Provedení:

1. Do lázně 37 °C teplé dáme předehřát na 3 min zkumavky s jednotlivými složkami potřebnými k testu (dekalciifikovaná plazma vyšetřovaná i kontrolní, kaolin-kefalinový komplex, CaCl₂) a jednu čistou, prázdnou zkumavku, do které pak budeme jednotlivé složky postupně pipetovat.
2. Připravíme si pipetu a špičky, které budou pečlivě označené pro jednotlivé složky (pozor na záměnu), stopky a háček.
3. Po nahřátí začneme do čisté předehřáté zkumavky pipetovat 0,1 ml dekalciifikované plazmy, určené pro vyšetření a 0,1 ml kaolin-kefalinového komplexu.
4. Tuto směs necháme 3 min inkubovat znovu při teplotě 37 °C (aktivace vnitřního systému po faktoru IX).
5. Pak teprve přidáme 0,1 ml 0,025 M CaCl₂, zmáčkneme stopky a háčkem protahujeme směs. Sledujeme zachycení prvního fibrinového vlákna. V tom okamžiku stopky zastavíme a odečteme čas.
6. Celý postup opakujeme 2x a vypočítáme průměrný čas. Totéž provedeme s kontrolní plazmou, abychom posoudili účinnost kaolin-kefalinového komplexu. Zde by měly být naměřené hodnoty vždy v normě, jinak je test nespolehlivý a nepřesný.

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Hodnocení:

Pokus	Čas vyšetřované plazmy	Čas kontrolní plazmy	APTTR

Závěr:*2.6.4. Některá další vyšetření (pouze teoreticky)***Určení doby krvácení (metoda Duke)**

Měříme čas kapilárního krvácení po standardním vpichu do ušního lalůčku. Výsledek testu je závislý na schopnosti krevních destiček vytvořit provizorní hemostatickou zátku. Testujeme funkci destiček.

Norma je: 2–4 min

Určení doby spontánní hemokoagulace (metoda Lee-White)

Sledujeme dobu potřebnou ke srážení krve in vitro bez spolupůsobení tkáňových faktorů. Výsledek je závislý na zdatnosti vnitřního a společného koagulačního systému.

Normální časy jsou: 5–15 min při pokojové teplotě
5–10 min při teplotě 37 °C

Kontrolní otázky:

1. Co je to hemostáza a kdy se mohou její děje v organismu uplatnit?
2. Proč nemůže v kapilárách vzniknout aktivní vazokonstrikce?
3. Kde stačí k zástavě krvácení destičkový trombus?
4. Jaká je úloha trombocytů při hemostáze?
5. Čím je aktivován vnitřní a čím zevní koagulační systém?
6. Kterým testem hodnotíme zdatnost zevního koagulačního systému?
7. Co vyšetřujeme APTT?
8. Jaký bude výsledek Quickova testu a APTT při hemofilii A?
9. Jaký bude výsledek APTT při nedostatku faktoru VII?
10. Může dojít ke krvácivým projevům při porušení střevní flóry?
11. Má porucha resorpce tuků v tenkém střevě vliv na hemokoagulaci?
12. Co je krevní sérum?
13. Které koagulační faktory potřebují pro svoji účinnost vitamín K a proč?
14. Jak působí antikoagulačně heparin?
15. Co je dekalifikovaná plazma a jak ji získáme?

2.7. Krevní skupiny

Úvod

Jestliže smísíme na podložním sklíčku krve od dvou náhodně vybraných osob, přibližně v 70 % případů se erythrocyty shluknou. Tento proces se označuje jako aglutinace. Ke stejným procesům dochází i tehdy, jestliže při krevní transfúzi přijdou do kontaktu dvě inkompatibilní krve v krevním řečišti. Následuje hemolytická reakce, která se v první fázi projeví neklidem, úzkostí, bolestí hlavy, dušností a tachykardií. Objevuje se hemoglobinémie a hemoglobinurie. Náhlý vzestup hladiny hemoglobinu může vést k těžkému poškození renálního parenchymu a k akutnímu selhání ledvin. Pacient upadá do šoku, překročením kritické srdeční frekvence a snížením minutového objemu. Po transfúzi inkompatibilní krve tak může vzniknout těžké a mnohdy ireverzibilní poškození organismu a často až smrt pacienta.

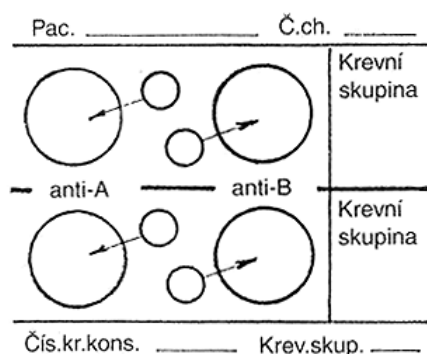
Aglutinace je důsledkem reakce antigen–protilátka. Na membráně erythrocytů jsou lokalizovány glykosfingolipidy a glykoproteiny s navázanými specifickými oligosacharidovými rezidui, které mají antigenními vlastnosti, označované jako aglutinogeny. Specifické protilátky, které s aglutinogeny membrány erythrocytů reagují, jsou přítomny v plazmě následkem předchozí imunizace daným antigenem. Patří ke γ -globulinové frakci plazmatických bílkovin (IgM a IgG) a označují se jako aglutininy. Při reakci antigen–protilátka vytvářejí protilátky můstky mezi četnými erythrocyty, což je podkladem aglutinace.

Na povrchu erythrocytů byla zjištěna řada antigenů (aglutinogenů), podle kterých se krev dělí do různých krevních skupin. Z klinického hlediska je nejvýznamnější AB0 (H) systém a Rh systém (viz učebnice). AB0 (H) systém poprvé popsal Landsteiner roku 1901, když prokázal, že podle aglutinace krvinek různými séry lze rozdělit populaci lidí do tří skupin. Jeho spolupracovníci Decastello a Sturli o rok později zjistili ještě čtvrtou krevní skupinu. Jejich nálezy nezávisle zopakovali český psychiatr Janský roku 1907 a Moss roku 1910. V rámci systému AB0 je tedy možno rozdělit populaci do čtyř skupin, přičemž frekvence výskytu jednotlivých skupin jeví značné geografické odlišnosti.

V systému AB0 (H) rozlišujeme 4 základní krevní skupiny – A, B, AB a 0 (H) podle přítomnosti aglutinogenů A a B na membráně červených krvinek. Jedinec krevní skupiny A má aglutinogen A, skupiny B má aglutinogen B, AB má oba aglutinogeny (A i B). Jedinec skupiny 0 nemá aglutinogen A ani B, ale má antigen H, což je výchozí molekula pro tvorbu antigenů A i B. Proto se skupina 0 označuje též jako H. V krevní plazmě jsou přítomny přirozené protilátky: aglutininy anti-A a anti-B. V krevní plazmě (séru) jednoho člověka nejsou aglutininy proti vlastním aglutinogenům. Protože nositel skupiny 0 nemá aglutinogen A ani B, býval označován jako „univerzální dárce“ a analogicky nositel skupiny AB jako „univerzální příjemce“. Toto označení však dnes neplatí, protože jednak působí i aglutininy dárce na krvinky příjemce, a jednak krvinky skupiny 0 (H) mají též antigenní schopnosti.

Skupina	0	A	B	AB
Frekvence v Evropě	cca 40 %	cca 40 %	cca 10 %	< 10 %

Tab. 2.7.1. Procentuální výskyt krevních skupin AB0 (H)-systému.



Obr. 2.12. Diagnostická kartička pro vyšetření krevních skupin

Vzhledem k možnému riziku přenosu infekce při práci s vlastní krví, provedeme pouze vyšetření se vzorky krve předem připravenými laborantkou.

Hodnocení:

Krevní skupina	Reakce s sérem	
	anti-A	anti-B
A		
B		
AB		
0		

Vysvětlivky: + pozitivní aglutinace, – negativní aglutinace

Závěr:

Tabulka: Srovnání vybraných hematologických parametrů u člověka, prasete a laboratorního potkana.

	Člověk	Potkan	Prase
Objem krve	7–10 ml/100 g tělesné hmotnosti (7–10 % tělesné hmotnosti)	6–7 ml/100 g tělesné hmotnosti (6–7 % tělesné hmotnosti)	7–10 ml/100 g tělesné hmotnosti (7–10 % tělesné hmotnosti)
Krevní tlak [mm Hg]	(100–140)/(70–90)	(75–120)/(60–90)	120/80
Koncentrace hemoglobinu	Muži 130–180 g/l Ženy 120–160 g/l	120–180 g/l	100–160 g/l
Hematokrit	Muži 0,39–0,51 % Ženy 0,33–0,47 %	36–54 %	32–50 %
Počet erytrocytů	Muži $(4,3–5,7) \times 10^{12}/l$ Ženy $(3,8–4,9) \times 10^{12}/l$	$5–11 \times 10^{12}/l$	$5–8 \times 10^{12}/l$
Velikost erytrocytů	7,2 μm	6,2 μm	5,4 μm
Sedimentace erytrocytů (kolmá)	Muži 2–10 mm/hod Ženy 3–21 mm/hod	0,7–1,8 mm/hod	2–5 mm/hod
MCV (fl)	82–102	48–70	50–68
MCHC (g/l)	311–350	270–370	300–360
MCH (pg)	27–31	19–23	1–24
Počet leukocytů	$(4–10) \times 10^9/l$	$(8–14) \times 10^9/l$	$(7–20) \times 10^9/l$
Neutrofilní leukocyty	50–70 %	18–36 %	25–50 %
Tyčky	2–3 %	5–11 %	0–4 %
Eozinofilní leukocyty	1–3 %	1–4 %	0–10 %
Lymfocyty	25–40 %	62–75 %	40–60 %
Monocyty	3–8 %	1–6 %	2–10 %
Počet trombocytů	$(150–300) \times 10^9/l$	$600 \times 10^9/l$	$(120–720) \times 10^9/l$
Fibrinogen	2–4 g/l	1–3g/l	1–5g/l
Tromboplastinový čas (QUICK, TT-test)	12–15 s	26 s	9–11 s
APTT		16 s	18–149 s
Spontánní koagulace (Lee-White)	5–15 min	125 s	6–7 min
Doba krvácení (Duke)	120–240 s	88 s	74 s
Krevní plasma			
Bílkoviny	65–85 g/l	60–80 g/l	60–80 g/l
Glykémie	3,5–5,6 mmol/l	5,1–8,0 mmol/l	3,3–7 mmol/l
Ca ²⁺	2,0–2,75 mmol/l	2,5 mmol/l	1,3–3 mmol/l
Fosfáty	0,65–1,61 mmol/l	3,7 mmol/l	3 mmol/l
Na ⁺	137–147 mmol/l	151 mmol/l	146–152 mmol/l
K ⁺	3,8–5,1 mmol/l	4,3–5,6 mmol/l	6,8–8,9 mmol/l
Cl ⁻	98–106 mmol/l	95–115 mmol/l	98–115 mmol/l

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Kontrolní otázky:

1. Podle čeho jsou klasifikovány základní krevní skupiny?
2. Proč je nesprávné používat termín „univerzální dárce“ a „univerzální příjemce“?
3. Jaké následky má inkompatibilita krve dárce a příjemce v AB0 (H) systému při transfúzi?
4. Co je to velká a malá křížová zkouška a proč je nutné ji provádět?
5. Může mít novorozenec protilátky anti-A a anti-B? Vysvětlete!
6. Kdy se tvoří protilátky anti-D? Jak se liší od protilátek anti-A a anti-B?
7. Proč v praxi není možno stanovit vlastní krevní skupinu?

Jméno:

Příjmení:

Kroužek:

Skupina: A, B, C, D

.....
datum.....
podpis vyučujícího

3. Membránový potenciál

(E. Kuriščák)

Cílem cvičení je demonstrovat základní neurofyziologické charakteristiky vzrušivých a dráždivých tkání. V detailu se zaměřuje především na elektrické vlastnosti neuronu a jeho jednotlivých částí, jako jsou dendritický strom, synapse a axon. Na jednoduchém a intuitivním počítačovém modelu je ilustrován *klidový membránový potenciál*, *pasivní* i *aktivní* vlastnosti neuronální membrány a další dynamické děje probíhající na buněčné membráně.

Aktivní vlastnosti membrány jsou především podmíněné dostatečně velkou hustotou napěťově řízených kanálů umožňujících vznik a šíření vzruchu formou akčních potenciálů. Tyto membrány nazýváme *vzrušivými* a patří k nim především axony, axonální iniciální segment a přilehlé části somatu, obecně jakékoliv tkáně, které jsou schopny generovat akční potenciál. Po vzrušivých membránách se signál (akční potenciály) šíří bez dekrementu. To znamená, že na rozdíl od *dráždivých* neboli *pasivních* membrán, zůstává během šíření signálů (vzruchu) zachován jeho tvar i amplituda, a to i na značné vzdálenosti (např. více než 1 m u motorických axonů).

Pasivní vlastnosti membrány podmiňují způsob šíření signálu (podráždění) po nevzrušivých, také často nazývaných dráždivých membránách. Tento typ membrány tvoří u neuronů především dendritický strom a částečně také tělo neuronu. U pasivních membrán je šíření podráždění ovlivněno především elektrickým odporem neuronální membrány – tzv. *rezistancí* membrány. Ta je závislá na aktuálním počtu otevřených iontových kanálů, daném především hustotou stále otevřených kanálů, ale i aktuálním počtem ligandem otevřených kanálů. Zmíněný odpor membrány zeslabuje vstupní signál (podnět), což zohledňuje termín šíření signálu s *dekrementem* – s útlumem. Druhým parametrem, který ovlivňuje pasivní vlastnosti membrány, je její elektrická *kapacitance*, čili elektrická „poddajnost“, umožňující membráně se krátkodobě nabít nábojem dodaným stimulací a postupně ho uvolňovat (viz analogie s mechanickým pružníkem v cévním systému). Kapacitance membrány tak mění – transformuje tvar vstupního signálu (např. náhlou změnu vodivosti postsynaptické membrány na pomalejší změnu napětí – postsynaptický potenciál) a spolu s rezistencí membrány, která zeslabuje amplitudu signálu, se výrazně podílejí na přenosových charakteristikách buněčných membrán. Z fyzikálního hlediska představuje pasivní membrána vzájemně zapojené RC obvody (složené z R-rezistorů a C-kapacitátorů – pasivních prvků), transformujících vstupní signál na signál výstupní. Aktuální hodnota rezistance a kapacitance membrány spolu s jejím prostorovým uspořádáním definují tzv. *časovou konstantu membrány*, která jednoduchým způsobem charakterizuje šíření podráždění dráždivými membránami (viz stat' 3.2). Jelikož u dráždivých membrán klesá amplituda odpovědi (napětí na membráně) se zvětšující se vzdáleností od místa podráždění, nazývá se toto šíření také elektrotonickým šířením – což dobře odpovídá představě poklesu napětí „tonusu“ od místa podráždění.

Počítačová simulace umožňuje ve značném stupni volnosti zkoumat vliv různých, v reálném biologickém preparátu často neoddělitelných faktorů podmiňujících různé elektrofyziologické fenomény, projevující se často velmi komplexní dynamikou. Umožňuje např. jednoduchým způsobem měnit iontové složení extracelulární a intracelulární tekutiny a zkoumat tak vliv rovnovážných potenciálů iontů na hodnotu membránového potenciálu nebo excitabilitu membrány. Nástroje počítačové simulace tak rozšiřují možnosti demonstrace zásadních charakteristik dráždivých (časová a prostorová sumace) a vzrušivých tkání (prahový podnět, refrakterní fáze, reobáze, chronaxie, farmaceutické blokády iontových kanálů).

Ačkoliv jsou elektrické děje na buněčné membráně podmíněné složitým vztahem mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím a ovlivňované variabilním složením a aktivitou buněčné membrány, zaměřuje se popisovaný model záměrně jenom na funkčně nejdůležitější z nich a zjednodušuje tak komplexnost modelovaného systému. I když v reálných buňkách nacházíme desítky až stovky různých typů iontových kanálů otevíraných různými podněty a působky, pracuje prezentovaný model především s K^+ a Na^+ ionty a K^+ a Na^+ iontovými kanály, které jsou v modelu řízené buď napěťově nebo chemicky. V programu je možné K^+ a Na^+ vodivosti (propustnosti), jakožto i odpovídající transmembránové iontové proudy zobrazovat ve formě grafů a v některých úkolech tyto vodivosti i experimentálně ovlivňovat. Dynamika napěťově řízených kanálů je v programu modelovaná proslulým Hodgkin-Huxleyovým matematickým formalizmem oceněným v roce 1963 Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu. V zájmu uspokojivého zjednodušení se model také nezabývá prostorovou strukturou neuronální membrány a přistupuje k ní jako k bodovému modelu, což v zásadě umožňuje selektivně izolovat roli základních elektrických vlastností membrány v transformaci neuronálního signálu.

Další simplifikací, použitou v modelu ve prospěch jednoduchého ovládní a získání vzorových odpovědí dráždivých a vzrušivých tkání, je způsob, jakým jsou modely stimulovány. Na rozdíl od komplexního

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

reálného neuronálního vstupu reprezentovaného stovkami až tisíci synaptických událostí interagujících značně složitým způsobem, představují v programu použité vstupy, tzv. základní stimuly používané k vyšetřování chování mnoha biologických dynamických systémů. Jedná se o tzv. *budící funkce*, což ve srozumitelné řeči možno popsat jako jednoduché elektrické proudové pulzy – stimuly, objevující se v uživateli zadaném okamžiku a působící na model definovaný čas. Parametry použitých stimulů, jakožto i jejich počet, je možné v programu intuitivně zadávat a měnit. Čas od počátku simulace, v němž se má stimulus objevit, se v programu mění nastavením hodnoty *delay* (od počátku simulace), jeho trvání hodnotou *width* (šířka pulsu) a jeho amplituda (zobrazená v μA) hodnotou *amplitudě*. Program použitý v praktiku je možné si volně stáhnout a odzkoušet.

<http://www2.neuroscience.umn.edu/eaweb/site/metaneuron.htm>

3.1. Klidový membránový potenciál

Zde je možné si ověřit, jakým způsobem se na výsledném klidovém membránovém potenciálu podílejí intracelulární a extracelulární koncentrace Na^+ a K^+ iontů a také vodivost (propustnost) membrány pro tyto ionty (podokno *Resting Membrane Potential*). Vertikální umístění jednotlivých barevně odlišených horizontálních čar vyjadřuje hodnotu rovnovážného potenciálu (známý také jako *reverzní potenciál*, *Nernstův potenciál* nebo *Equilibrium Potential*) pro Na^+ a K^+ ionty, který je počítán pomocí Nernstovy rovnice. Žlutá čára reprezentuje hodnotu klidového membránového potenciálu, která je, kromě intra a extracelulárních koncentrací příslušných iontů, ovlivněna také aktuální propustností membrány pro tyto ionty. Jak koncentraci, tak i propustnost uvažovaných iontů, je možné jednoduchým způsobem v programu měnit (viz. obr. 3.1.).

Na+		K+		Relative Membrane Permeabilities	
Concentration Out (mM)	120	Concentration Out (mM)	3	Na+ permeability	1
Concentration In (mM)	16.4859	Concentration In (mM)	63.7834	K+ permeability	65
Na+ Potential (mV)	50	K+ Potential (mV)	-77		
				Membrane Potential	
				Potential (mV)	
				-65.02	

weep Duration (ms) 20 Reset to Defaults Keep Previous Graphs

Obr. 3.1. Kromě koncentrace iontů a vodivosti membrány je v programu možné měnit také trvání simulace (pole *sweep duration*). Z aktuální koncentrace intra a extracelulární koncentrace iontů program vypočítá rovnovážné potenciály pro Na^+ a K^+ ionty (pole *Na+ a K+ potential*) a také klidový membránový potenciál (pole *Membrane Potential*).

Úkol:

1. Vyšetřte vliv intracelulárních a extracelulárních koncentrací Na^+ a K^+ iontů na klidový membránový potenciál a také na jednotlivé rovnovážné potenciály. Popíseme (graficky), jakým způsobem se mění rovnovážné potenciály.

Úkol:

2. Vysvětlete, proč se při zvyšující extracelulární koncentraci K^+ iontů (simulace hyperkalémie) stává klidový membránový potenciál více pozitivním (blíží se k nule), zatímco při hypernatrémii zůstává téměř nezměněn.

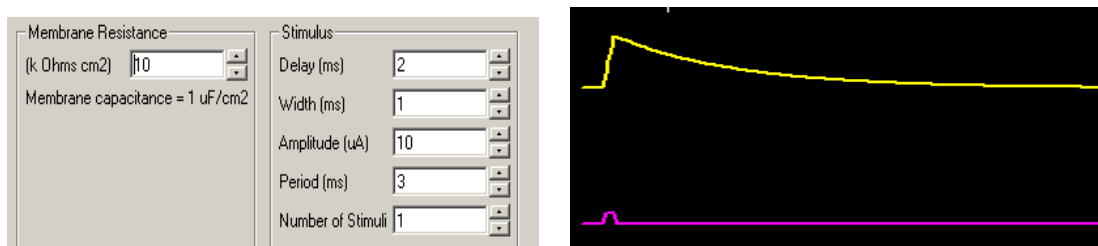
3.2. Pasivní vlastnosti membrány

Model pasivních vlastností membrány (podokno *Membrane Time Constant*) se věnuje již popsaným charakteristikám dráždivé membrány určujících její dynamiku (časový průběh napěťových změn) na daný stimulus. V našem případě je tímto stimulem pravoúhlý proudový pulz známé amplitudy a trvání, objevující se během simulace v definovaný čas. Pasivní vlastnosti membrány, jak již bylo řečeno, je možné odvodit z kapacity a rezistance membrány, které podmiňují tzv. časovou konstantu membrány.

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Tato konstanta vyjadřuje časový interval počínající odezněním předchozího stimulu a končící poklesem hodnoty membránového potenciálu na $1-1/e$ (přibližně 63 %) ze způsobené napěťové změny (pokles napětí ke klidovému membránovému potenciálu po odeznění stimulace se teoreticky blíží exponenciální funkci). Důvod postupného poklesu napětí na membráně i přes již odeznělý podnět tkví v již popsané roli kapacitance, která se během stimulace nabíjí a po odeznění stimulu postupně vybíjí, což způsobuje časovou prodlevou odpovědi membránového napětí. Uvedená dynamika membrány podmiňuje jeden z nejdůležitějších elektrofyziologických fenoménů, kterým je časová sumace stimulů (podnětů) na dráždivé membráně. Tato sumace je umožněná právě popsanou dynamikou – postupným poklesem napětí z předchozí stimulace, na kterou může nasedat (sumovat se) odpověď z následného stimulu, za předpokladu, že již membránový potenciál neklesl k výchozí hodnotě (např. ke klidovému membránovému potenciálu). Z toho vyplývá, že časová sumace se uskutečňuje jenom v případě dostatečně malé časové vzdálenosti mezi stimuly.

V této úloze je možné měnit pasivní vlastnosti membrány prostřednictvím parametru membránové rezistance (pole Membrane Resistance na obr. 3.2.). Druhý parametr ovlivňující časovou konstantu membrány, totiž její kapacitance, je pro nemyelinizované membrány parametr neměnný, což přímo souvisí s konstantní tloušťkou fosfolipidové vrstvy (buněčné membrány) separující intracelulární a extracelulární prostředí. Napěťová odpověď na stimulaci pasivní membrány jednoduchou budící funkcí – pravoúhlým proudovým pulzem je zobrazená na obr. 3.2.



Obr. 3.2. Vlevo, nastavení rezistence pasivní membrány. Vpravo, budící puls (fialově) a příslušná napěťová odpověď membrány (žlutě).

Úkol:

3. Vyšetříme, jakým způsobem ovlivňuje časová konstanta membrány (především ji podmiňující parametr membránové rezistance) průběh napěťové odpovědi membrány na proudovou stimulaci. Výsledek znázorníme graficky.

Úkol:

4. Časová sumace. Ověříme, jak závisí časová sumace stimulů na časové konstantě membrány. Vyzkoušíme různé stimulační protokoly – měníme trvání jednotlivých pulsů (*width* [ms]), jejich amplitudy (*amplitude* [μA]), počet (*number of stimuli*) a jejich frekvenci (*period*).

Model pasivních vlastností membrány ilustruje, jak pasivní propustnosti membrány pro K^+ a Na^+ přispívají ke vzniku klidového membránového potenciálu v neuronu. Z fyzikálního hlediska je pasivní membrána představována obvodem (tzv. RC obvodem) složeným pouze z pasivních prvků: rezistorů o neproměnném odporu a kapacitorů o neproměnné kapacitě. Pasivní membrána nezahrnuje proměnné vodivosti ani negeneruje akční potenciál. Cílem je ozřejmit pojmy: elektrochemický rovnovážný potenciál pro ionty Na^+ , elektrochemický rovnovážný potenciál pro ionty K^+ , rovnovážný potenciál, časová konstanta membrány, časová sumace.

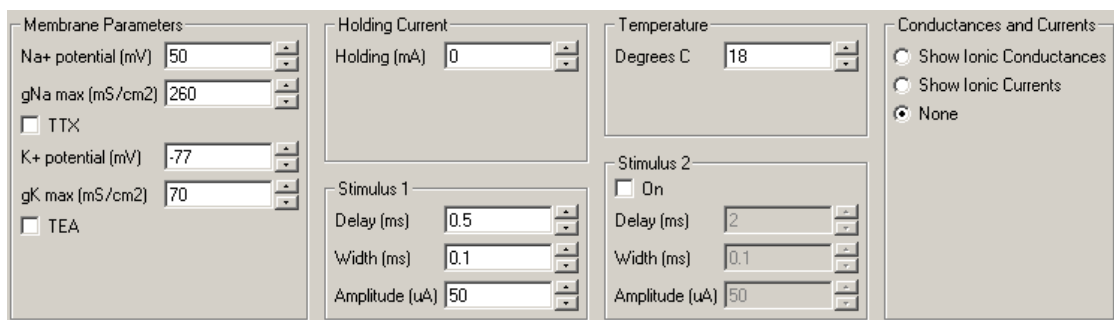
3.3. Akční potenciál, aktivní vlastnosti membrány

Akční potenciál je funkčním projevem **aktivní membrány neboli vzrušivé membrány**. Ke vzniku a šíření akčních potenciálů je nutná dostatečně vysoká hustota napěťově řízených kanálů na membráně. Jak již bylo řečeno, akční potenciál se způsobem svého šíření zásadně liší od postsynaptického nebo např. receptorového potenciálu, jenž se šíří s dekrementem. Akční potenciál se šíří bez dekrementu. Tvar, trvání a rychlost propagace (šíření) akčních potenciálů závisí na časové dynamice, napěťové závislosti a hustotě iontových kanálů. K simulaci dynamiky napěťově závislých Na^+ a K^+ kanálů jsou v modelu použity diferenciální rovnice odvozené Hodgkinem a Huxleym na základě elektrofyziologických studií membrány obrovských axonů sépie. Tyto vodivosti a jimi protékající proud je možné v modelu

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

jednoduchým způsobem zobrazit a zkoumat (viz obr. 3.3.).

V této úloze (podokno *Axon Action Potential*) si ověříme následující jevy a charakteristiky aktivní membrány: prahový podnět, refrakterní fáze, reobáze, chronaxie, podprahová časová sumace, spontánní vznik akčního potenciálu.



Obr. 3.3. Nastavení parametru v úloze Akční potenciál. Vlevo, rovnovážné potenciály a na napětí závislé vodivosti pro Na^+ a K^+ . Uprostřed, parametry stimulace a teplota simulovaného prostředí. Vpravo, modus zobrazení časového průběhu hodnoty napěťově závislých vodivostí a příslušných iontových proudů.

Úkol:

5. Prahový podnět. Zjistíme, jak velká amplituda $100\mu\text{s}$ trvajícího podnětu již vyvolá akční potenciál. Zjistíme hodnotu prahu (spouštěcí úroveň [mV]) pro akční potenciál. Odvodíme závislost mezi amplitudou a trváním stimulu ve smyslu dosažení prahového podnětu. Řešení vyjádříme graficky.

Úkol:

6. Podprahové a nadprahové stimuly, hyperpolarizující stimuly. Měníme amplitudu, nebo trvání stimulu tak, abychom ověřili chování membrány v podprahové a nadprahové oblasti. Ověříme chování membrány pro hyperpolarizující stimuly.

Úkol:

7. Latence akčního potenciálu. Zjistíme závislost časové separace mezi stimulem (jeho počátkem) a akčním potenciálem (jeho vznikem) na amplitudě stimulu (trvání stimulu neměníme, $width = 0.1$ ms).

Úkol:

8. Podprahová časová sumace. Zjistíme rozdílné chování aktivní membrány na časovou sumaci dvou podprahových a dvou nadprahových podnětů. Výsledek znázorníme graficky.

Úkol:

9. Refrakterní fáze. Aplikací dvou nadprahových, na časové ose vhodně umístěných stimulů, zjistíte trvání absolutní a relativní refrakterní fáze. Parametry prvního stimulu neměníme. Parametry druhého stimulu iterujeme (především čas jeho výskytu a amplitudu) tak, abychom odhadli obě refrakterní fáze. Ověřte, zda je možné vyvolat druhý akční potenciál i podprahovým stimulem, výsledek se pokuste zdůvodnit.

3.3.1. Farmakologické blokády iontových kanálů

Iontové kanály, a to nejenom napěťově závislé, mohou být blokovány různými substancemi, ovlivňujícími jejich chování i vodivost. Těto vlastnosti se s velkým úspěchem používá v mnoha oblastech medicíny. Jedním z příkladů je mechanismus účinků některých anestetik (především lokálních), které přímo působí na napěťově řízené kanály axonů přenášejících bolestivé podněty. Obdobným způsobem působí některé léky ze skupiny antiarytmik, působící přímo na vzrušivé membrány kardiomyocitů a upravující srdeční rytmus (některá anestetika proto mohou zásadním způsobem narušovat srdeční rytmus). Dalším příkladem může být použití psychoaktivních látek benzodiazepinového typu (např. diazepam), působících na iontové kanály postsynaptické membrány.

V případě našeho počítačového modelu (podokno *Axon Action Potential*) simulujeme účinek látek

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

blokujících napětově řízené Na^+ kanály (látka tetrodotoxin – TTX) a K^+ kanály (látka tetraethylamonium – TEA).

Úkol:

10. Vyšetřete vliv farmakologické blokády (zaškrtnutí políčka TTX) napětově řízených Na^+ kanálů na vzrušivost buněčné membrány, především pak na její hrotový potenciál. Najděte hodnotu účinného stimulu, který je schopný vyvolat akční potenciál se zablockovanými Na^+ kanály. Zjištění popište slovně i graficky.

Úkol:

11. Vyšetřete vliv farmakologické blokády (zaškrtnutí políčka TEA) napětově řízených K^+ kanálů na vzrušivost buněčné membrány, především pak na fázi repolarizace (změňte vhodným způsobem pole *Holding Current* k dosažení běžné hodnoty klidového membránového potenciálu). Popište, případně vysvětlete zjištěné chování.

3.3.2. Reobáze, chronaxie

Reobáze a chronaxie patří k nejdůležitějším charakteristikám vzrušivých membrán. Umožňují určovat vztah mezi intenzitou a trváním podnětu (stimulu), který vyvolá akční potenciál (vzruch). Reobáze je nejmenší potřebná intenzita podnětu působící maximální užitečný čas, která vyvolá akční potenciál. Chronaxie je délka trvání podnětu o dvojnásobné intenzitě reobáze, jenž vyvolá akční potenciál.

Úkol:

12. Upravte dobu a trvání stimulu tak, abyste zjistili hodnoty reobáze a chronaxie u prezentovaného modelu. Výsledek popište graficky.

3.3.3. Spontánní akční potenciál

Akční potenciály může membrána generovat i spontánně bez zjevné stimulace. Tento mechanismus se uplatňuje např. v srdci v SA a AV uzlech, které tak mohou generovat spontánní rytmickou aktivitu.

Úkol:

13. Ujistěte se, že na membránu nepůsobí žádné stimuly. Dále upravujte původní rovnovážný potenciál pro K^+ ionty tak, aby se vybavil akční potenciál. Pokračujte ve zvyšování K^+ potenciálu (vedoucí ke zvýšení frekvence spontánních akčních potenciálů), až do vymizení spontánních akčních potenciálů. Popište graficky zjištěné fenomény.

3.3.4. Synaptický potenciál

Jednou z nejdůležitějších funkcí dráždivé membrány je integrace vstupních signálů, které v nejběžnějším případě představují synaptické vstupy na neuronální membráně (nejčastěji na dendritickém stromě – až 95 % plochy receptivní plochy neuronu). Vylití mediátoru do synaptické štěrbině vyvolá lokální změnu propustnosti a následně pak změnu napětí na postsynaptické membráně – postsynaptický potenciál (PSP). Polarita a tvar PSP závisí na typu mediátoru (ligandu), dále na propustnosti otevíraných postsynaptických kanálů pro příslušné ionty, na transmembránových koncentračních gradientech těchto iontů a v neposlední řadě také na pasivních vlastnostech postsynaptické membrány. Jelikož je většina ligandem otevíraných kanálů propustná pro více než jeden typ iontů, zavádí se pro charakteristiku koncentračních gradientů iontů procházejících příslušným kanálem pojem **synaptický rovnovážný potenciál**, neboli *synaptický reverzní potenciál*, sdružující jednotlivé rovnovážné potenciály zúčastněných iontů (viz dále). Po vybavení se postsynaptický potenciál šíří dále elektrotonicky buněčnou membránou k tělu neuronu a podléhá tvarovým i napětovým změnám (viz Pasivní vlastnosti membrány), což souhrnně označujeme jako šíření s dekrementem.

V této úloze (podokno *Synaptic Potential and Current*) je cílem měnit propustnosti synapse pro Na^+ a K^+ ionty a všimnout si, jakým způsobem se mění synaptický rovnovážný potenciál (pole *Reversal Potential*) a příslušná napětová odpověď synaptické membrány.

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.

Úkol:

14. Vhodným nastavením synaptické vodivosti pro Na^+ , K^+ a Cl^- ionty vytvořte excitační a inhibiční typ synapse, sledujte změny hodnoty synaptického rovnovážného potenciálu (pole *Reversal Potential*).

Kontrolní otázky:

1. U jakých buněk naměříme nenulový membránový potenciál?
2. Jak se podílí vodivost membrány na klidovém membránovém potenciálu?
3. Jaký je rozdíl mezi vzrušivými a dráždivými membránami?
4. Co znamená šíření signálu s dekrementem a šíření bez dekrementu? Nakreslíme elektrické schéma buněčné membrány.
5. Jaký význam má Nernstova rovnice?
6. Jak se liší Goldmanova rovnice od Nernstovy rovnice?
7. Co limituje maximální a minimální napětí na membráně během akčního potenciálu?
8. Jakým způsobem se pasivní vlastnosti membrány podílejí na časové sumaci podnětů?
9. Které tkáně mají charakteristiky vzrušivých membrán?
10. Jaké je trvání akčního potenciálu u axonů, příčně-pruhovaného svalu a kardiomyocytů?
11. Co určuje excitační nebo inhibiční typ synapse?
12. Ovlivňuje teplota membránové charakteristiky? Jakým způsobem?

Výsledky a závěry:

Jméno:

Příjmení:

Kroužek:

Skupina: A, B, C, D

.....
datum.....
podpis vyučujícího

Své připomínky a náměty nám můžete sdělit také prostřednictvím web fóra na stránce ústavu.