УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

PRAKTIKUM IZ FIZIOLOGIJE 1

Doc. dr Zdenko Kanački

2

Doc. dr Zdenko Kanački

PRAKTIKUM IZ FIZIOLOGIJE 1

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Novi Sad, 2014.

EDICIJA POMOĆNI UDŽBENIK

Osnivač i izdavač edicije

Poljoprivredni fakultet, Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, 2100 Novi Sad

Godina osnivanja
1954

Glavni i odgovorni urednik edicije

Dr Milan Popović*, redovni profesor.*
Dekan poljoprivrednog fakulteta.

Članovi komisije za izdavačku delatnost

Dr Ljiljana Nešić*, vanredni profesor, - predsednik.*
Dr Branislav Vlahović*, redovni profesor, - član.*
Dr Milica Rajić*, redovni profesor, - član.*
Dr Nada Plavša*, vanredni profesor, - član.*

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Biblioteka Matice srpske, Novi Sad

591.1(075.8)

KANAČKI, Zdenko, 1977-
Praktikum iz fiziologije 1 / Zdenko Kanački. - Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2014 (Beograd : Donatgraf). - 110 str. : ilustr. ; 30 cm. - (Edicija Pomoćni udžbenik)

Tiraž 20. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7520-317-9

a) Veterinarska fiziologija
COBISS.SR-ID 291116039

Autor
Dr Zdenko Kanački, *docent*

Glavni i odgovorni urednik
Dr Milan Popović, *redovni profesor,*
Dekan poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Urednik
Dr Milenko Stevančević, *redovni profesor,*
Direktor departmana za veterinarsku medicinu.

Fotografija
Dr Zdenko Kanački, *docent*

Recenzenti
Dr Josip Krnić, *redovni profesor.*
Univerzitet u Sarajevu, Veterinarski fakultet.

Dr Slobodan Stojanović, *docent.*
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Izdavač
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Zabranjeno preštampavanje i fotokopiranje. Sva prava zadržava izdavač.

Štampa: DonatGraf

Štampanje odobrio: Komisija za izdavačku delatnost,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
Tiraž: 20
Mesto i godina štampanja: Novi Sad, 2014.

PREDGOVOR

Fiziologija spada u biološke nauke i proučava pojave i procese koji se dešavaju u živim bićima. Veterinarska fiziologija je, istovremeno, i medicinska nauka. Upoznavanjem i proučavanjem funkcija zdravih organizama ona omogućava da se otkriju i objasne poremećaji tih funkcija za vreme bolesti. Kao biološka i medicinska nauka, fiziologija je blisko povezana sa mnogim drugim prirodnim naukama, a posebno sa morfologijom (anatomijom i histologijom). U organizmu su oblici i funkcije uzajamno zavisni i čine jednu jedinstvenu morfo-funkcionalnu celinu.

Veterinarska fiziologija je od izuzetnog značaja za sve praktično-aplikativne i naučne aspekte veterinarske medicine. Pored ovoga, veterinarska fiziologija ima veliki značaj za unapređenje stočarske proizvodnje. Prvenstveno iz praktičnih i didaktičkih razloga, veterinarsku fiziologiju možemo podeliti u posebne oblasti, kao što su: hematologija, neurofiziologija itd.

Prosto posmatranje pojava i funkcija u organizmu često nije dovoljno za njihovo potpuno objašnjenje, pa je iz tog razloga fiziologija izrazito eksprimentalna nauka. Preduslov za svako uspešno bavljenje eksperimentalnim radom je dobro poznavanje kako već poznatih naučnih činjenica iz odgovarajuće oblasti, tako i metoda i tehnike kojom su one eksperimentalno proverene i dokazane. Esperimenti se izvode na oglednim životinjama ili njihovim izolovanim organima i tkivima. Međutim, od izuzetnog je značaja poštovanje etičkih i zakonskih normi pri izvođenju ovakvih ogleda. Iz ovog razloga je izvođenje ovih vežbi predviđeno uz korišćenje alternativnih metoda (modela).

Nastava iz Fiziologije, za studente veterinarske medicine, je iz didaktičkih razloga podeljena u dva predmeta Fiziologija 1 i Fiziologija 2, a podela je izvršena po organskim sistemima. Međutim, treba napomenuti da se svi procesi u organizmu međusobno integrišu u jednu, jedinstvenu celinu i samo se kao takvi mogu u potpunosti sagledati i razumeti.

Ovaj praktikum je, pre svega, namenjen studentima studijskog programa Veterinarske medicine, ali ga mogu koristiti i studenti srodnih studijskih programa. Pored njih, njega mogu koristiti i stručnjaci iz ovih oblasti, kao podsetnik u svakodnevnom radu.

Novi Sad, 2014. godine.

A u t o r

SADRŽAJ

1.0 Transport materija kroz ćelijsku membranu 1

1.1 Difuzija boje u agaru 2

1.2 Posmatranje eritrocita u rastvorima različite osmotske koncentracije 3

2.0 Fizologija krvi 5

2.1 Uzimanje krvi 6

2.2 Antikoagulansi i sprečavanje koagulacije 7

2.3 Dobijanje krvne plazme i krvnog seruma 8

2.4 Određivanje hematokritske vrednosti 9

2.5 Brojanje eritrocita 12

2.6 Brojanje retikulocita 18

2.7 Određivanje koncentracije hemoglobina 19

2.8 Hematološki indeksi 23

2.8.1 Indeks bojenja 23

2.8.2 Srednja vrednost količine hemoglobina u eritrocitu 24

2.8.3 Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu 25

2.8.4 Srednja vrednost zapremine eritrocita 26

2.9 Teichmannovi kristali (Hlorhemin kristali) 27

2.10 Sedimentacija eritrocita 28

2.11 Hemoliza 29

2.12 Određivanje osmotske rezistencije eritrocita 31

2.13 Brojanje leukocita 34

2.14 Leukocitarna formula (Diferencijalna krvna slika) 37

2.15 Brojanje trombocita 41

2.16 Vreme krvarenja 44

2.17 Vreme koagulacije 45

2.18 Dokaz značaja jona Ca za koagulaciju krvi 47

2.19 Određivanje protrombinskog vremena 47

2.20 Retrakcija koaguluma 49

2.21 Automatsko brojanje krvnih ćelija 50

3.0 Fiziologija imuniteta 51

3.1 Hemoliza izazvana uticajem seruma druge životinjske vrste (serološka hemoliza) 51

3.2 Određivanje krvnih grupa 52

3.2.1 AB0 sistem krvnih grupa 53

3.2.2 Rh sistem krvnih grupa 55

3.2.3 Sistemi krvnih grupa kod životinja 56

4.0 Fiziologija kardiovaskularnog sistema 57

4.1 Narkoza žabe 59

4.2 Posmatranje krvotoka u pokožici za plivanje i jeziku žabe 60

4.3 Priprema preparata žabljeg srca in situ 62

4.4 Uticaj temperature na frekvenciju srčanog rada 63

4.5 Stanijusove ligature 65

4.6 Uticaj draženja nervusa vagusa na rad srca 66

4.7 Refraktarnost srčanog mišića i ekstrasistola 68

4.8 Preparacija žabljeg srca na Štraubovu kanilu 69

4.9 Ispitivanje uticaja povećane koncentracije jona kalijuma i jona kalcijuma na rad izolovanog srca žabe 71

4.10 Uticaj adrenalina i acetilholina na rad izolovanog srca žabe 72

4.11 Auskultacija srčanih tonova 73

4.12 Sistolni i minutni volumen 74

4.13 Puls (bilo) 76

4.14 Merenje krvnog pritiska 79

4.15 Registrovanje bioelektričnih struja srca 81

5.0 Fiziologija respiratonog sistema 85

5.1 Uloga dijafragme u mehanici disanja (Dondersov ogled) 86

5.2 Određivanje promena interpleuralnog pritiska tokom disanja 88

5.3 Određivanje plućnih volumena i kapaciteta-spirometrija 89

5.4 Pneumografija 92

5.5 Auskultacija disajnih šumova 93

5.6 Prisustvo CO_2 u izdahnutom vazduhu 95

6.0 Fiziologija mišića i perifernih nerava 96

6.1 Preparacija galvanoskopske noge, neuromišićnog i mišićnog preparata 97

6.2 Direktno i indirektno draženje mišića 101

6.3 Prosta mišićna kontrakcija 102

6.4 Minimalna i maksimalna mišićna kontrakcija 103

6.5 Složena mišićna kontrakcija – tetanus 105

6.6 Sekundarna mišićna kontrakcija 107

6.7 Rastegljivost i elastičnost mišića 108

1.0 Transport materija kroz ćelijsku membranu

Selektivno propustljiva ćelijska membrana građena je od lipidnog dvosloja u kojem su raspoređeni veliki molekuli proteina. Prenos materija kroz ćelijsku membranu odvija se na dva osnovna načina: *pasivni transport* (difuzija i filtracija) i *aktivni transport* (primarni i sekundarni).

✓ Pasivni transport

Dva su načina pasivnog prenosa materija kroz membranu: *difuzija* i *filtracija*. Promet materija kroz polupropustljivu membranu naziva se jednostavna difuzija. Difuzija je kretanje molekula i jona sa područja veće u područje manje koncentracije, a posledica je postojanja koncentracijskog gradijenta (razlika u koncentraciji). Molekuli pasivno difunduju ako su: dovoljno mali da prođu kroz pore na ćelijskoj membrani ili ako su rastvorljivi u lipidnom dvosloju. Difuzija vode kroz polupropusnu membranu naziva se *osmoza*.

Filtracija je kretanje vode i rastvorenih materija kroz ćelijsku membranu usled dejstva hidrostatskog pritiska (razlike u hidrostatskim pritiscima sa obe strane ćelijske membrane). Na filtraciju vode utiče i koloidoosmotski pritisak (onkotski pritisak) proteina krvne plazme.

Molekuli nerastvorljivi u lipidnom dvosloju ili preveliki da bi prošli kroz pore membrane prenose se pasivnim transportom koji nazivamo *olakšana difuzija*. Olakšana difuzija se odvija uz pomoć specifičnog proteina nosača.

✓ Aktivni transport

Prenos materija s područja niže koncentracije u područje više uz pomoć energije i proteinskih nosača označava se kao aktivni transport. Aktivni transport, obzirom na izvor energije koja se upotrebljava prilikom prenosa, delimo na: *primarni* i *sekundarni aktivni transport*. U primarnom aktivnome transportu energija potiče direktno iz razgradnje ATP-a ili nekog drugog energijom bogatog fosfatnog jedinjenja (npr. Na^+/K^+ pumpa).

U sekundarnom aktivnom transportu, energija potiče od jonskog koncentracijskog gradijenta stvorenog primarnim aktivnim transportom. Na^+ i transportovana supstanca mogu da se kreću u istom pravcu ka unutrašnjosti ćelije – *kotransport*. Drugi vid transporta je da se Na^+ kreće ka unutrašnjosti ćelije, a druga supstanca se iz ćelije prebacuje u ekstracelularnu tečnost – *kontratransport*.

Makromolekuli kao što su proteini, polisaharidi, polinukleotidi ili čak čitave ćelije (npr. bakterije) ne mogu prolaziti kroz membranu ni pasivnim ni aktivnim transportom. Unošenje i izlučivanje velikih molekula obavlja se aktivnim učešćem membrane pri čemu ona obrazuje vezikule, a procesi se nazivaju *endocitoza* i *egzocitoza*. Proces unošenja

makromolekula i rastvora u ćeliju naziva se *endocitoza*, dok se izbacivanje specifičnih proizvoda ćelije ili nekih drugih materija u vanćelijsku sredinu naziva *egzocitoza*.

Unošenje krupnih čestica je *fagocitoza* (grč. *phagein* = jesti), a rastvorenih materija je *pinocitoza* (grč. *pino* = piti). Dok skoro sve vrste ćelija neprekidno unose tečnosti i rastvorene molekule pinocitozom, fagocitozu mogu da vrše samo posebne ćelije – fagociti (npr. leukociti vrše fagocitozu bakterija). Endocitoza posredovana receptorom vrši se prepoznavanjem određenog molekula i formiranjem vezikula koja u unutrašnjost ćelije propušta samo te molekule.

Procesom egzocitoze u vanćelijsku sredinu dospevaju materije koje ćelija treba da izluči (suprotno endocitozi). Primer za ovakve materije su hormoni i enzimi čija se funkcija ispoljava izvan ćelije koja ih je sintetisala, kao što npr. ćelije pankreasa izlučuju insulin. Oko materije, koja treba da se izbaci iz ćelije, se obrazuje vezikula. Vezikula se kreće ka površini ćelije, njena membrana se ujedinjuje sa ćelijskom membranom, a sadržaj vezikule biva izbačen u okolnu sredinu.

Smatra se da su mnogim vrstama ćelija endocitoza i egzocitoza međusobno povezani procesi i da na taj način ugrađivanje membrane vezikule ne dovodi do povećanja površine ćelijske membrane. Vezikule predstavljaju transportni sistem i u samoj ćeliji tako što se prenose između različitih organela.

1.1 Difuzija boje u agaru

Stepen difuzije rastvorene supstance iz jedne sredine u drugu zavisi od više parametara. Stepen difuzije je veći ukoliko je veća razlika u koncentracijama a molekulska masa i prečnik molekula manji. Brzina difuzije je, takođe, veća što je površina preseka kroz koji se difuzija odvija veća a udaljenost kraća.

Odnos između molekularne mase i brzine difuzije može se jednostavno ispitati posmatranjem difuzije molekula boje u agaru. Boje koje se koriste u ovom ogledu su metilensko plavo, čija je molekularna masa 320 g/mol, i kalijum permanganat, ljubičasta boja molekularne mase 158 g/mol. Agar sadrži 98,5% vode i omogućava slobodno kretanje i difuziju molekula boje.

ZADATAK: Odrediti brzinu difuzije boja kalijum permanganata i metilenskog plavog u 1,5% agaru.

MATERIJAL: Predmetno staklo, 1,5% agar, kalijum permanganat, metilensko plavo, laboratorijski sat, pomično merilo.

IZVOĐENJE: Na predmetno staklo izliti 1,5% agar. Sa jedne strane predmetnog stakla, centimetar od ruba, staviti kristal metilenskog plavog, a sa druge kristal kalijum permanganata i zabeležiti vreme. Nakon 30 minuta izmeriti pomičnim merilom koliko daleko je svaka boja difundirala od kristala.

Izračunati brzinu difuzije po sledećoj formuli:

Brzina difuzije (mm/min) = daljina difuzije (mm) / 30 min.

PROSTOR ZA RAD:

Daljina difuzije (metilenskog plavog) =

Brzina difuzije (metilenskog plavog) =

Daljina difuzije (kalijum permanganata) =

Brzina difuzije (kalijum permanganata) =

ZAKLJUČAK:

1.2 Posmatranje eritrocita u rastvorima različite osmotske koncentracije

Osmotska koncentracija zavisi od broja čestica u rastvoru. Na primer 1M rastvor nedisocirajućeg jedinjenja, kao što je glukoza, ima osmotsku koncentraciju od 1 Osmol. Osmotska koncentracija 1M rastvor NaCl je 2 Osmol, a 1M rastvora Na_2SO_4 je 3 Osmol. Za krvnu plazmu, odnosno intracelularnu tečnost, važe ove konstante:

Molaritet = 0,15 M

Osmotska koncentracija = 0,30 Osmol = 300 mOsmol

Osmotski pritisak = 6,72 atm = 5107 mm Hg (prema dest. vodi)

U slučaju fiziološkog rastvora (0,9%, ili preciznije 0,89% NaCl), osmotska koncentracija rastvora je 0,15 M x 2 = 0,3 Osmol. Fiziološki rastvor ima istu osmotsku koncentraciju kao krvna plazma pa se označava kao *izotonični rastvor*. Neto difuzija vode (u oba smera) kod eritrocita u izotoničnom rastvoru je jednaka 0, odnosno ista količina vode uđe i izađe iz eritrocita.

Eritrociti stavljeni u *hipertonični rastvor* (NaCl više od 0,9%) otpuštaju (gube) vodu i zapremina im se smanjuje, a membrana postaje naborana i smežurana. U *hipotoničnom rastvoru* (NaCl manje od 0,9%) voda ulazi u eritrocite koji bubre i, u zavisnosti od stepena hipotoničnosti, dolazi do pucanja membrane.

ZADATAK: Posmatrati promenu eritrocita u rastvoirima različite osmotske koncentracije.

MATERIJAL: Tri predmetna stakla, 3,6% NaCl, 0,9% NaCl (fiziološki rastvor), 0,4% NaCl, mikroskop, krv (u kojoj je sprečena koagulacija).

IZVOĐENJE: Na svako od tri predmetna stakla staviti po jednu kap 3,6%, 0,9% i 0,4% rastvora NaCl. U svaku od kapi dodati po kap krvi i promešati staklenim štapićem. Staviti pokrovno stakalce i posmatrati pod velikim uveličanjem mikroskopa (objektiv 40X). Konstatovati promenu veličine i oblika eritrocita.

PROSTOR ZA RAD:

1. predmetno staklo:
2. predmetno staklo:
3. predmetno staklo:

ZAKLJUČAK:

2.0 Fiziologija krvi

Krv je tečno vezivno tkivo koje, zahvaljujući stalnom radu srca tokom života, kruži – protiče u zatvorenom sistemu krvnih sudova. Kod domaćih životinja se uopšteno može uzeti da na zapreminu (volumen) krvi otpada od 6% do 10% od ukupne telesne mase životinje. Količina krvi varira u zavisnosti od životinjske vrste i fiziološkog stanja organizma i najčešće se izražava u zapreminskim procentima (ml/100g telesne mase). Termini kojima se opisuje variranje količine krvi u organizmu su:

- ✓ *normovolemija* – normalna količina krvi,
- ✓ *hipervolemija* – povećana količina krvi i
- ✓ *hipovolemija* (*oligemija*) – smanjena količina krvi.

Zapremina krvi u organizmu se može odrediti direktnom ili indirektnom metodoma. Direktna metoda podrazumeva iskrvarenje životinje i ispiranje krvnih sudova i usitnjenih organa fiziološkim rastvorom, te preračunavanje zapremine na osnovu poznate koncentracije hemoglobina u krvi. Indirektne metode se zasnivaju na određivanju zapremine krvne plazme ili eritrocita (na osnovu dilucione metode) i preračunavanjem na osnovu poznate hematokritske vrednosti (zapreminski procenat eritrocita u krvi).

Krv je viskozna, neprovodna telesna tečnost svetlocrvene boje (poreklom iz arterije) ili je boje trule višnje (poreklom iz venskog krvnog suda), slabo alkalne elektrohemijske reakcije (pH 7,35-7,45). Nju čine tečni i korpuskularni (ćelijski) deo. Tečni deo krvi predstavlja krvna plazma u kojoj su suspendovani uobličeni elementi (krvne ćelije) – eritrociti, leukociti i trombociti.

Ubrzo nakon povrede tkiva i oštećenja krvnog suda, ili uzimanja krvi punkcijom krvnog suda i kontakta sa stranom površinom (povređeno tkivo, staklo, vazduh i drugo), krv se zgrušava i iz tečnog stanja prelazi u želatinoznu masu. Zgrušavanje ili koagulacija krvi ima vitalan značaj i predstavlja složeni biohemijski proces u kojem učestvuje čitav niz faktora krvne plazme, oštećenog tkiva i trombocita, a krajnji rezultat je pretvaranje rastvorljive belančevine fibrinogena u nerastvorljivi fibrin, sa konačnim ciljem da se stvori krvni ugrušak koji će zatvoriti otvor na krvnom sudu. Kasnije se krvni ugrušak stabilizuje, retrahira i istiskuje se krvni serum.

Kružeći kroz sve delove organizma i dopirući do svake ćelije organizma, krv kao jedinstven organ i jedinstvena nedeljiva celina obavlja sledeće važne funkcije:

- ✓ prenosilačka (transportna) uloga,
- ✓ uloga u održavanju dinamičke ravnoteže unutrašnje srednine (homeostaze),
- ✓ uloga u humoralnoj korelaciji,
- ✓ uloga u termoregulaciji,
- ✓ odbrambena uloga.

Fizičko-hemijske osobine krvi, njen biohemijski sastav, kao i brojnost i morfološke karakteristike uobličenih elemenata krvi su kod zdravih životinja relativno

konstantni i variraju u zavisnosti od vrste životinja i funkcionalnog stanja organizma. S obzirom na veoma važne funkcije krvi i njen stalni kontakt sa svim tkivima i organima, u kliničkoj praksi se ispitivanju sastava i osobina krvi daje veliki značaj. U slučajevima kada se želi ispitati da li je životinja zdrava ili bolesna, podaci dobijeni laboratorijskom analizom krvi imaju značajan udeo o postavljanju tačne dijagnoze i izboru preventivnih i terapijskih mera.

Biohemijski sastav pune krvi kao glavne telesne tečnosti je veoma složen. To je zbir hemijskog sastava tečnog dela – krvne plazme i krvnih ćelija. Koncentracija pojedinih sastojaka nije jednaka u krvnim ćelijama i krvnoj plazmi, pa zbog toga nije svejedno da li se analize obavljaju u krvi ili krvnoj plazmi, odnosno u krvnom serumu.

Hematološke analize ukazuju na ukupan broj pojedinih ćelijskih elemenata krvi u jedinici zapremine, njihov relativan odnos kao i na pojedine njihove morfološke i strukturne karakteristike.

Uput (zahtev) za laboratorijsku analizu koju veterinar – praktičar uz uzorak krvi šalje u laboratoriju treba da sadrži:

- ✓ osnovne podatke o životinji (vrsta, ime ili broj, pol, starost, rasa),
- ✓ podatke o vlasniku životinje,
- ✓ najznačajnije podatke o kliničkom nalazu na životinji i
- ✓ vrstu analize koja se traži.

2.1 Uzimanje krvi

Uzimanje krvi kod životinja zahteva poštovanje sledećih osnovnih pravila: dobra i sigurna fiksacija životinje, dezinfekcija mesta na koži pripremljenog za ubod igle, sterilne igle i upotreba sterilnih suvih špriceva ili nekog drugog suda za prihvatanje krvi.

Krv se uzima na različitim mestima u zavisnosti od vrste životinje i planirane količine krvi koju treba uzeti, što je u vezi sa brojem i obimom analiza koje se rade. Kada su potrebne manje količine krvi (nekoliko kapi), vrši se ubod iglom ili zarezivanje ušne školjke sisara, kreste kod živine, repa kod pacova ili jagodice prsta kod čoveka. Veće količine krvi se dobijaju venepunkcijom (uvođenjem sterilne igle u venu) a kod malih životinja punkcijom srca.

Venepunkcija kod konja, govečeta, ovce i koze se vrši na *veni jugularis* pošto se ovaj krvni sud nalazi blizu kože, velikog je prečnika i lako se pri kompresiji između mesta venepunkcije i srca puni krvlju. Kod pasa i mačaka krv se dobija iz *vene brachialis* na prednjem ekstremitetu ili *vene saphene* na zadnjem ekstremitetu. Uzimanje većih količina krvi kod svinja vrši se punkcijom venskog cefaličnog pleksusa. Venepunkcija kod živine obavlja se na krilnoj veni, a kod malih pilića krv se uzima punkcijom srca. Kod miševa i pacova veća količina krvi se, takođe, uzima punkcijom srca.

Kada je potrebno uzeti manju količinu krvi (par kapi), na primer za brojanje eritrocita, leukocita ili određivanje sadržaja hemoglobina, najbolje je uzeti je direktno u kapilarnu pipetu (melanžer) i pripremiti za dalji postupak.

ZADATAK: Uzeti uzorak kapilarne krvi čoveka.

MATERIJAL: Vata, alkohol, sterilne igle ili lancete i pipeta (melanžer).

IZVOĐENJE: Kapilarna krv se kod čoveka dobija punkcijom jagodice prsta. Pomoću alkohola i vate izvršiti dezinfekciju jagodice prsta i lancetom izvršiti punkciju. Sačekati da spontano izađe nekoliko kapi krvi, obrisati krv suvom vatom a od sledeće kapi pažljivo, bez stiskanja okolnog tkiva, uvući krv u melanžer.

ZAPAŽANJA:

2.2 Antikoagulansi i sprečavanje koagulacije

U slučaju uzimanja većih količina krvi treba voditi računa o tome da li je za analize potrebna puna krv, krvna plazma ili krvni serum. Već je rečeno da se u krvi odmah po napuštanju krvnog suda i pri kontaktu sa stranom površinom, pokreće proces koagulacije krvi pri čemu krv prelazi u gustu želatinoznu masu iz koje se vremenom istiskuje žućkasta tečnost – krvni serum. Sredstva koja sprečavaju odvijanje ovog biohemijskog procesa nazivaju se *antikoagulantna sredstva* (*antikoagulansi*). Dodavanje antikoagulantnih sredstava omogućava upotrebu krvi za transfuziju ili za analize, a da pri tome ona bude u tečnom stanju i kompletnog sastava. Postoje brojna antikoagulantna sredstva (prirodna i veštačka), a ovde ćemo opisati samo ona koja se u praksi najčešće koriste.

- ✓ **Heparin** je prirodni antikoagulans prisutan u krvi, sintetiše se u citoplazmi mnogih ćelija, a najviše u mastocitima i bazofilnim granulocitima. Heparin je visokomolekulski polisaharid i svrstava se u grupu heteroglukana. Način delovanja heparina je višestruk: 1) inhibira razvoj procesa u prvoj fazi koagulacije, 2) koči pretvaranje protrombina u trombin, 3) sprečava dejstvo trombina na fibrinogen. Količina heparina od 0,1ml je dovoljna da spreči koagulaciju 10 ml krvi.
- ✓ **Na-citrat** je so limunske kiseline. Dodat u krvi vezuje jonski kalcijum u obliku nedisosovanih soli. Uklanjanje jona kalcijuma iz krvi je razlog što se proces koagulacije ne može pokrenuti. Najčešće se koristi kao 3,8% rastvor i to u srazmeri sa krvi 1:4 (1 deo Na-citrata + 4 dela krvi).
- ✓ **Na-oksalat** sprečava koagulaciju tako što vezuje jone kalcijuma gradeći nerastvorljive soli.

U cilju sprečavanja koagulacije Na-citrat i Na-oksalat se dodaju u krv u koncentraciji od 0,2 g do 0,4 g/100ml krvi. Slično antikoagulaciono djelovanje imaju i

kalijumove i amonijeve soli citrata, oksalata i fluorida, EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kiselina).

- ✓ **Kumarin** i derivati **dikumarol** i **varfarin** inhibiraju vitamin K koji je neophodan za sintezu protrombina i drugih faktora koagulacije (VII, X, XII) u jetri.

Izbor antikoagulansa dosta zavisi od planiranih analiza za ispitivanje krvi.

ZADATAK: Uzeti uzorak venske krvi i sprečiti njenu koagulaciju.

MATERIJAL: Vata, alkohol, sterilne igle, epruvete, heparin ilidrugi antikoagulans.

IZVOĐENJE: Izvršiti venepunkciju kod neke od životinja i krv prihvatiti u epruvetu u kojoj se nalazi 1-2 kapi heparina (ili nekog drugog antikoagulansa u odgovarajućoj količini) i lagano izmešati i u epruvetu bez antikoagulansa (kontrola). Zabeležiti Zapažanja.

PROSTOR ZA RAD:

1. epruveta:

2. epruveta:

ZAKLJUČAK:

2.3 Dobijanje krvne plazme i krvnog seruma

Krvna plazma je bezbojna ili žuto obojena krvna tečnost bez uobličenih (ćelijskih) elemenata krvi. Dobija se centrifugiranjem krvi, u kojoj je prethodno sprečena koagulacija.

Krvni serum je tečnost slične boje i sastava kao krvna plazma, a razlikuje se od nje po tome što ne sadrži proteine fibrinogen, protrombin i druge faktore koagulacije. Krvni serum se može dobiti na dva načina:

1. Centrifugiranjem defibrinisane krvi (dobija se laganim mešanjem kvi staklenim ili drvenim štapićem u odgovarajućoj posudi, pri čemu se na štapić hvataju fibrinske niti koje se zatim odstrane) i
2. Spontanom koagulacijom izvađene krvi na sobnoj temperaturi; posle retrakcije koaguluma izdvojeni serum se pokupi pipetom i ako ima primese eritrocita, potrebno je centrifugiranje.

ZADATAK: Uzeti krv neke domaće životinje i pripremiti defibrinisanu krv, krvnu plazmu i krvni serum.

MATERIJAL: Vata, alkohol, sterilne igle, epruvete za centrifugiranje, centrifuga, laboratorijska čaša, stakleni ili drveni štapić, heparin, 3,8% Na-citrat i drugi antikoagulansi.

IZVOĐENJE: Izvršiti venepunkciju kod neke od životinja i krv prihvatiti u sledeće posude sa oznakama:

1. epruveta sa 1ml 3,8% Na-citrata (uzeti 4 ml krvi) i lagano izmešati,
2. epruveta u kojoj se nalazi 1-2 kapi heparina i lagano izmešati,
3. čista i suva laboratorijska čaša i mešati štapićem,
4. čista i suva epruveta bez ikakvih dodataka.

Nakon uklanjanja štapića sa fibrinskim končićima iz laboratorijske čaše (3), sadržaje prve tri posude presuti u epruvete za centrifugu i centrifugirati 10 minuta na 3000 obrtaja/minuti. Kada se završi centrifugiranje, kapaljkom ili pipetom preneti tečni deo iznad taloga u prve 3 epruvete. Konstatovati i objasniti šta se odigralo u svakoj od epruveta.

PROSTOR ZA RAD:

1. epruveta:

2. epruveta:

3. epruveta:

4. epruveta:

ZAKLJUČAK:

2.4 Određivanje hematokritske vrednosti

Hematokritska vrednost (Ht) predstavlja zapreminski procenat eritrocita u krvi koji je proporcionalan broju, veličini i sadržaju hemoglobina u njima. Određuje se centrifugiranjem (30 minuta na 3000 obrtaja/minuti) heparisane krvi u posebnim graduisanim epruvetama (sa oznakama 0 – 100) ili kapilarnim cevčicama. Pri tome se eritrociti zbog najveće specifične težine talože na dno epruvete, iznad se nalazi tanak, beli rastresit sloj prstenastog oblika kojeg čine leukociti i trombociti, a prema vrhu epruvete je izdvojena krvna plazma. Visina stuba eritrocita od dna epruvete do granice sa slojem leukocita i trombocita predstavlja hematokritsku vrednost i izražava se u procentima.

Hematokritska vrednost u proseku iznosi 40% (35-46%), odnosno 0,40 (0,35-0,46).

Određivanjem Ht može se dobiti prilično pouzdan uvid u promene broja i veličine eritrocita, volumena telesnih tečnosti, i uopšte, Ht ima veliki značaj u kliničkoj hematologiji.

Za određivanje Ht koristi se *makrohematokritska metoda*, pomoću Wintrobovih epruveta i *mikrohematokritska metoda*, pomoću kapilarnih cevčica. Mikrohematokritska metoda se češće koristi zato što su za njeno izvođenje potrebne manje količine krvi.

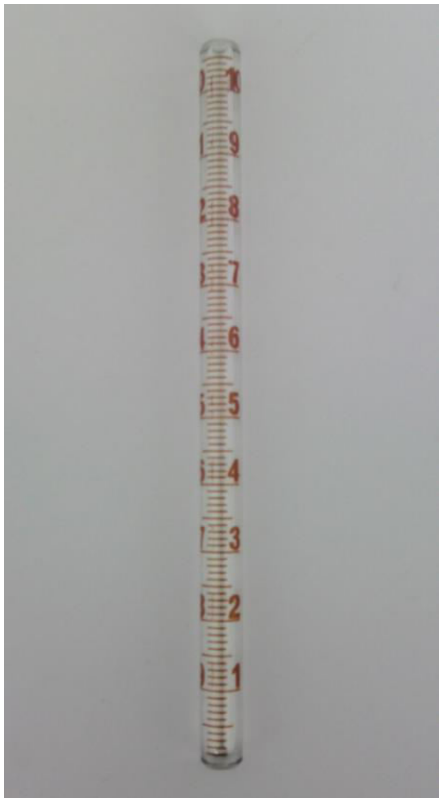
ZADATAK: Odrediti hematokritsku vrednost krvi neke domaće životinje.

MATERIJAL: Sterilne injekcione igle, vata, alkohol, brizgalica od 2ml, centrifuga, Wintrobove epruvete (110X3 mm izgraduirane od 1 do 100 mm), igla dugačka 100mm, heparisana kapilarna cevčica (dužine 6 do 8 cm), skala (čitač) za očitavanje vrednosti.

IZVOĐENJE:

Makrohematokritska metoda – venepunkcijom u heparisanu brizgalicu uzeti 2 ml krvi. Koristeći dugačku iglu istisnuti krv u Wintrobovu epruvetu do oznake 100. Potom izvršiti centrifugiranje u trajanju od 30 minuta na 3000 obrtaja/minuti. Visinu stuba istaloženih eritrocita pročitati direktno na graduisanoj skali epruvete (slika 2.1).

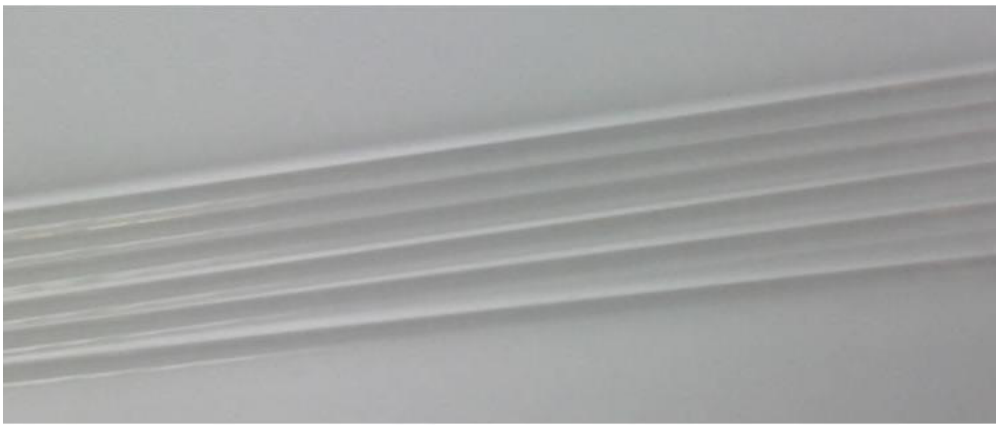
Dobijena vrednost ne predstavlja pravi hematokrit venske krvi jer posle centrifugiranja još jedan deo plazme (oko 4%) zaostaje između istaloženih eritrocita. Da bi se dobila realna vrednost, očitanu vrednost treba korigovati (pomnožiti) sa faktorom 0,96.



Slika 2.1: Wintrobova epruveta

Mikrohematokritska metoda – Krv se uzima iz jagodice prsta ili iz ušne školjke tako što se na kap krvi nasloni kapilarna cevčica (slika 2.2) u koju krv ulazi po zakonima kapilarnosti. Napuni se oko 2/3 cevčice, a deo koji je prazan zatvori se zagrevanjem na plamenu ili voskom.

Cevčice se stavljaju u centrifugu tako da je njihov otvoreni kraj okrenut ka centru i centrifugiraju 5 minuta na 15000 obrtaja/minuti. Očitavanje Ht se vrši pomoću čitača, ili tako da se izmeri u mm ukupna dužina koju u cevčici zauzimaju uobličeni elementi i plazma, a potom izračuna procenat koji otpada na uobličene elemente (uglavnom eritrocite). Primenom ove metode nije potrebna korekcija dobijene vrednosti.



Slika 2.2: Kapilarne cevčice za mikrohematokritsku metodu

PROSTOR ZA RAD:

Makrohematokritska metoda

Očitana vrednost =

Koekcioni faktor = 0,96

Ht =

Mikrohematokritska metoda

Ht =

ZAKLJUČAK:

2.5 Brojanje eritrocita

Posmatrajući pod mikroskopom neobojeni razmaz krvi sisara, uočava se da eritrociti (Er) nemaju jedro, da su okruglog bikonkavnog oblika sa zaobljenim ivicama. Središnji deo eritrocita je obojen žućkasto, a ivice su crvene. Od ovog pravila odstupaju eritrociti kamila i lama koji su ovalnog oblika ta je njihov središnji deo tamniji. Ovo je razlog što se nekada smatralo da eritrociti ovih životinja poseduju jedro. Imaju prosečan prečnik od 8 µm, a debljina im na ivicama iznosi oko 2 µm, a u sredini oko 1µm ili manje. Zapremina jednog eritrocita iznosi prosečno 80 μm^3. Eritrociti ptica i drugih vrsta koje su u filogenetskoj lestvici ostale ispod sisara imaju jedro, eliptičnog su oblika i dvogubo ispupčeni. Najvažniji funkcionalni sastojak eritrocita je hemoglobin.

Eritrociti se stvaraju procesom koji se naziva *eritropoeza*, a odvija se u koštanoj srži. Eritropoeza je stalan proces i nove ćelije se ubacuju u cirkulaciju gde eritrociti „žive“ i obavljaju svoju funkciju u krvi ptica nekoliko nedelja, a u krvi sisara prosečno 100 dana. Stari i funkcionalno istrošeni eritrociti se raspadaju (*intravitalna hemoliza*) pošto starenjem membrana postaje fragilna i pri potiskivanju eritrocita kroz kapilare lako puca. Prosečno se dnevno raspadne oko 1% eritrocita; izračunato je da se kod velikih životinja (konj, goveče) u toku svake sekunde razgradi oko 37 miliona eritrocita, a isto toliko mladih eritrocita se ubacuje u perifernu cirkulaciju. To znači da su napred navedena dva suprotna procesa (eritropoeza i intravitalna hemoliza) pod normalnim

uslovima uravnotežena, tako da je broj eritrocita u krvi zdravih organizama prilično konstantan. Stvaranje i sazrevanje Er zavisi od velikog broja faktora što je značajno da bi se ukupna masa eritrocita u cirkulaciji održavala u uskim granicama, dovoljnim za tkivnu oksigenaciju, a da ipak koncentracija ćelija nije tolika da oteža protok krvi. Svi faktori se dele na dve grupe:

1. plastične: esencijalne aminokiseline i Fe i
2. regulaciono katalitičke: Cu, Mn, Mo, Co, vitamini B-kompleksa, vitamin C, hormoni adenohipofize, tireoidee, nadbubrega, polni hormoni.

Broj eritrocita u jednom litru krvi varira unutar vrste zavisno od pola, uzrasta, mišićne aktivnosti, graviditeta, estrusa, boravka na većoj nadmorskoj visini i dr. Termini kojima se opisuje variranje broja eritrocita u jedinici zapremine krvi su:

- ✓ *normocitemija* – normalan broj eritrocita u jedinici zapremine krvi,
- ✓ *oligocitemija* - smanjen broj eritrocita u jedinici zapremine krvi i
- ✓ *policitemija* - povećan broj eritrocita u jedinici zapremine krvi.

Stepen oksigenacije tkiva je osnovni regulator produkcije eritrocita putem tkivnog hormona *eritropoetina*. Kod domaćih životinja najveći broj eritrocita u jedinici zapremine krvi (1 litar) imaju koze i ovce, a najmanji živina (tabela 2.1).

Tabela 2.1: Broj eritrocita u 1 L krvi (10^{12}/L)

Vrsta	**Broj Er**	**Vrsta**	**Broj Er**
Govedo	6-8	Kokoš	2,5-3,2
Ovca	10-13	Golub	3,5-4,5
Koza	13-15	Kunić	5,5-6,5
Konj (punokrvi)	9-12	Pacov	6-7,5
Konj (tegleći)	7-10	Zamorac	5-6,5
Svinja	6-8	Ribe	1-3,2
Pas	6-8	Čovek -muškarac	4,8-5,5
Mačka	6-8	-žena	4-4,5

Princip određivanja broja eritrocita se sastoji u tome da se mikroskopom izvrši brojanje svih crvenih krvnih zrnaca u razređenoj krvi u specijalnoj komorici određenog (poznatog) volumena. Razređenje krvi se obavlja u određenom srazmeru pomoću *Hayemovog rastvora* u staklenoj cevčici – *melanžeru za eritrocite*. Hayemov rastvor je blago hipertoničan rastvor (osmotska koncentracija mu je nešto veća nego u krvnoj plazmi) i u svom sastavu ima:

NaCl	1,0 g
Na_2SO_4	5,0 g
$HgCl_2$	0,1 g

Destilovana H_2O do 200 ml

Hipertoničnost i prisustvo Na-sulfata i merkuri-hlorida koji denaturišu proteine u membrani eritrocita doprinose lakšem uočavanju eritrocita u vidnom polju mikroskopa.

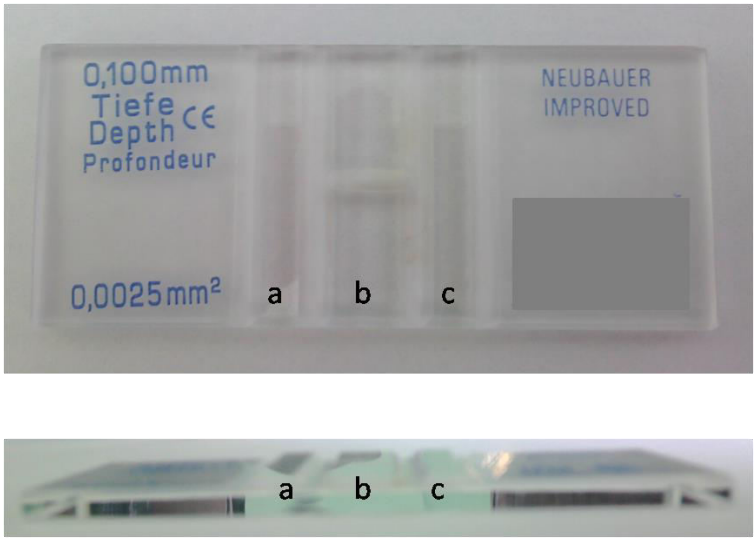
Melanžer za eritrocite (slika 2.3) se sastoji od uske kapilarne cevčice na kojoj su oznake 0,5 i 1,0; na vrhu se nalazi trbušasto proširenje u kome se nalazi plastična perla crvene boje, a proširenje se završava u kraći, uži nastavak sa oznakom 101 na kome se nalazi gumeno ili plastično crevo.

Slika 2.3: Melanžer za eritrocite

Uzimanjem krvi do podeljka 0,5 i Hayemovog rastvora do oznake 101, krv se razblažuje 200 puta i po pravilu takvo razblaženje se koristi. Ako se krv uzme u melanžer do oznake 1,0 i Hayemov rastvor do oznake 101 onda se postiže razblaženje 100 puta koje se koristi kada se unapred zna da kod ispitivane jedinke ima mali broj eritrocita u jedinici zapremine krvi.

Komora za brojanje krvnih ćelija se označava još i kao *hemocitometar*. Postoji nekoliko tipova komora za brojanje uobličenih elemenata krvi kao što su: Bürkerova,

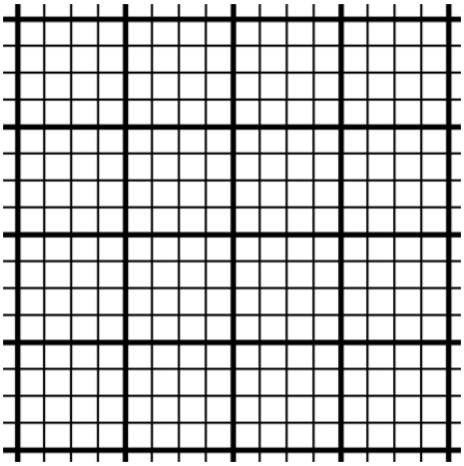
Türckova, Thoma-Zeissova, Neubauerova, Spencerova. Komora je zapravo pločica koja je veća i deblja od predmetnog stakla. U sredini debelog predmetnog stakla nalaze se poprečno paralelno postavljena 3 polja (a, b, c) ograničena sa 4 žleba. Srednje polje (b) je podeljeno poprečnim žlebom na dva dela i niže je od postranih polja (a, c) za 0,1 mm. Na svakom od ta dva dela je urezana po jedna mrežica (slika 2.4).



Slika 2.4: Komora za brojanje krvnih ćelija

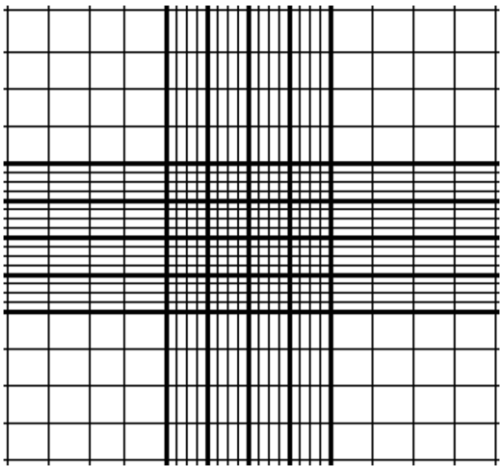
Thoma-Zeissova komora ima mrežicu dužine 1 mm i širine 1 mm; površina iznosi 1 mm^2. Postavljanjem pokrovnog stakalca na postrane pločice (a, c) obrazuje se komorica zapremine 0,1 mm^3 (1 mm X 1 mm X 0,1 mm = 0,1 mm^3). Uzdužne i poprečne linije koje su urezane na istom rastojanju dele kvadrat površine od 1 mm^2 na 400 kvadratića (površina jednog kvadratića je 1/400 mm^2).

Svaki peti red kvadratića je kroz sredinu uzdužno i poprečno podeljen tako da se u mrežici uočavaju veći kvadrati oivičeni sa po tri crte koji sadrže 16 malih kvadratića (slika 2.5). Korišćenjem objektiva koji uveličava 10 puta u vidno polje mikroskopa staje čitava mreža površine 1 mm^2, a pod objektivom 30-40x u vidno polje staje grupacija od 16 malih kvadratića.



Slika 2.5: Mrežica Thoma-Zeissove komore

Neubauerova komora se sastoji od 9 kvadrata od kojih svaki ima površinu 1 mm^2. Centralni kvadrat ima mrežicu identičnu sa Thoma-Zeissovom komorom (površine 1 mm^2) i on služi za brojanje eritrocita. Četiri ugaona kvadrata su podeljena na 16 manjih kvadrata i u njima se broje leukociti (slika 2.6).



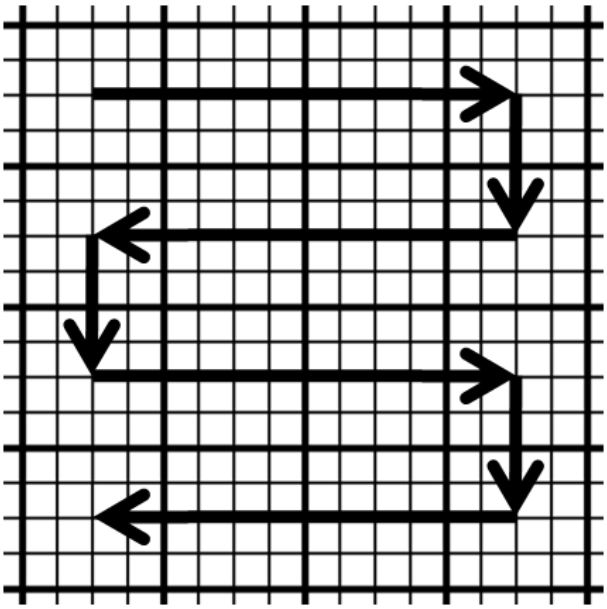
Slika 2.6: Mrežica Neubauerove komore

ZADATAK: Odrediti broj eritrocita u krvi domaće životinje i/ili čoveka.

MATERIJAL: Pribor za uzimanje krvi, melanžer za eritrocite, Neubauerova komora, pokrovna stakalca, Hayemov rastvor, mikroskop.

IZVOĐENJE: Komora i melanžer moraju biti potpuno čisti i suvi. Krv se uzima u melanžer direktno sa mesta uboda na koži (ušna školjka, rep, jagodica prsta). Sačekati da spontano izađe nekoliko kapi krvi, obrisati krv suvom vatom a od sledeće kapi pažljivo, bez stiskanja okolnog tkiva, uvući krv u melanžer do oznake 0,5. Krv se može uzeti i iz epruvete sa heparisanom krvi. Melanžer obrisati vatom od tragova krvi, a zatim iz posudice uvući Hayemov rastvor do oznake 101 (razblaženje 200 puta). Držeći melanžer između palca i kažiprsta mućkati nekoliko minuta da bi se krv i rastvor pomoću crvene perlice u trbušastom proširenju ravnomerno izmešali.

Priprema komore se obavlja na sledeći način: Navlažiti okolna uzvišenja (polja a, c) i na njih postaviti čisto i suvo pokrovno stakalce blagim pritiskom na krajeva palčevima obe ruke. Nakon protresanja napunjenog melanžera, iz njega istisnuti 1 do 2 kapi tečnosti na smotuljak vate (to je rastvor iz kapilarnog dela melanžera), odmah zatim prisloniti vrh melanžera na srednje polje komore (b) koje viri ispod pokrovnog stakla kako bi se formirana kap suspenzije eritrocita usled kapilarnosti razlila ispod pokrovnog stakla po mrežici (u komorici). Komorica je pravilno napunjena ako ispod pokrovnog stakla nema mehurića vazduha, ako se tečnost ne nalazi iznad pokrovnog stakla i ako su eritrociti, gledano pod najmanjim uveličanjem (10x), ravnomerno razasuti i raspoređeni po mrežici površine 1mm^2 (centralni kvadrat).



Slika 2.7: Smer brojanja eritrocita u mrežici komore

Sa uvećanjem objektiva 40x pronaći levu gornju ugaonu skupinu od 16 kvadratića i u njoj izbrojati sve eritrocite vodeći računa da se isti eritrocit ne bi brojao dva puta (jednom najmanjem kvadratiću pripadaju eritrociti unutar kvadratića i oni koji su na njegovoj gornjoj i desnoj liniji). Brojanje obaviti u smeru kako je prikazano na slici 2.7.

Nakon obavljenog brojanja eritrocita i upisanog broja u prvoj ugaonoj skupini od 16 kvadratića, izvršiti po istom principu i brojanje u ostale tri ugaone skupine od 16 kvadratića i u jednoj skupini unutar centralnog kvadrata. Znači, eritrociti su izbrojani u 5 kvadrata od po 16 kvadratića što je ukupno 80 kvadratića (površine 1/400 mm^2).

Izračunavanje broja eritrocita u 1mm^3 krvi se vrši po sledećoj formuli:

$$\text{Broj eritrocita u 1 mm}^3 = \frac{\text{Broj izbrojanih eritrocita}}{80} \times 4000 \times 200$$

Brojčana vrednost količnika između broja izbrojanih eritrocita razblažene krvi i 80 predstavlja prosečan broj eritrocita u jednom kvadratiću (njih je ukupno 400) i množi se sa 4000 iz razloga što je površina jednog kvadratića 1/400 mm^2 a visina 1/10 mm, onda je zapremina 1/400 X 1/10 = 1/4000 mm^3. Znači, prosečan broj eritrocita u jednom kvadratiću se množi sa 4000, pa se onda dobija broj eritrocita u 1 mm^3 razblažene krvi. Sada dobijeni broj treba pomnožiti sa još 200 (razblaženje) da bi se dobio broj eritrocita u 1 mm^3 ispitivane krvi. Ako je krv uvučena u melanžer do oznake 1,0 u tom slučaju se umesto sa 200 množi sa 100.

Broj uobličenih elemenata krvi se izražava u vrednostima koje odgovaraju jednom litru krvi. Do te vrednosti se dolazi ako se ustanovljeni broj eritrocita koji se nalazi u 1 mm^3 pomnoži sa 10^6 (1 litar ima 1 milion mm^3).

PRIMER: U 80 kvadratiča je izbrojano 480 eritrocita.

$$\text{Broj eritrocita u 1 mm}^3 = \frac{480}{80} \text{ X } 4000 \text{ X } 200 =$$

$$= 6 \text{ X } 4000 \text{ X } 200 = 4800000/\text{mm}^3 \ (4{,}8 \text{ X } 10^6/\text{mm}^3)$$

$$\text{Broj eritrocita u 1 litru} = 4{,}8 \text{ X } 10^6 \text{ X } 10^6 = 4{,}8 \text{ X } 10^{12}/\text{L}$$

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu): _____

Broj Er u 1. ugaonoj skupini od 16 kvadratića:

Broj Er u 2. ugaonoj skupini od 16 kvadratića:

Broj Er u 3. ugaonoj skupini od 16 kvadratića:

Broj Er u 4. ugaonoj skupini od 16 kvadratića:

Broj Er u centralnoj skupini od 16 kvadratića: _____

Ukupan broj eritrocita u 80 kvadratića:

Broj eritrocita u 1mm^3 =

Broj eritrocita u 1 litru =

ZAKLJUČAK (Da li je broj Er u fiziološkim granicama?):

2.6 Brojanje retikulocita

Retikulociti su nezreli eritrociti. U kostnoj srži, iz matičnih ćelija, deobom i sazrevanjem se razvijaju ćelije eritrocitne loze. Na kraju nastaju retikulociti koji se prevode u crvena krvna zrnca. Retikulociti sadrže ostatke RNK (ribonukleinske kiseline), mitohondrija i organela. Određivanje broja i zrelosti retikulocita je pokazatelj funkcije koštane srži, odnosno njene sposobnosti da formira eritrocite.

Broj retikulocita u cirkulaciji varira u zavisnosti od vrste i izražava se u procentima u odnosu na broj eritrocita. Kod pasa retikulocita ima 0-1,5%, kod mačaka 0,2-1,6%, kod svinja 0-1%, kod preživara se oni uglavnom uopšte ne zapažaju, dok ih kod konja nema u cirkulaciji.

Snižene vrednosti mogu biti posledica:

- ✓ nedostatka gvožđa, folne kiseline, vitamina B12,
- ✓ sniženog nivoa eritropoetina kod hroničnih bolesti bubrega,
- ✓ hemioterapija, radijacija,
- ✓ različitih bolesti koštane srži ili bolesti koje utiču na koštanu srž.

Povišene vrednosti mogu biti posledica:

- ✓ odgovora na terapiju anemije (terapija gvožđem, vitaminom B12, folnom kiselinom, eritropetinom, oporavak koštane srži nakon hemioterapije, transplantacija koštane srži),
- ✓ krvarenja – tada broj retikulocita raste zato što koštana srž pokušava da nadoknadi gubitak eritrocita (crvenih krvnih zrnaca),
- ✓ hemolitičke anemije – tada dolazi do destrukcije eritrocita čiji nedostatak koštana srž pokušava da kompenzuje.

ZADATAK: Odrediti broj (procenat) retikulocita u krvi psa.

MATERIJAL: Uzorak krvi psa, briljant krezil plavo, termostat, mikroskopske pločice, mikroskop sa imerzionim objektivom, kedrovo ulje.

IZVOĐENJE: Pomešati u odnosu 1:1 uzorak krvi i 1% rastvor boje briljant krezil plavo. Ostaviti 15 do 20 minuta u termostatu na 37° C. Napraviti krvni razmaz (opisano u vežbi određivanja leukocitarne formule) i ostaviti da se osuši. Pod imerzionim objektivom posmatrati i uočiti retikulocite (ostaci RNK, mitohondrija i organela su obojeni plavo). Vidno polje se pomera dok se ne izbroji 100, 200 ili 1000 eritrocita (broje se paralelno sa brojanjem retikulocita) i rezultat se izražava u % retikulocita.

PROSTOR ZA RAD:

Ukupno izbrojano retikulocita:

Ukupno izbrojano eritrocita: _____

% retikulocita:

ZAKLJUČAK:

2.7 Određivanje koncentracije hemoglobina

Hemoglobin (Hb) je složeno hemijsko jedinjenje i spada u grupu složenih proteina – hromoproteida. Sastoji se od belančevine globina i prostetične grupe – hema u čijem centru se nalazi atom dvovalentnog gvožđa. Molekul hema daje crvenu boju hemoglobinu. Hemoglobin je kvantitativno i funkcionalno najvažniji sastojak eritrocita. Izlazak hemoglobina iz eritrocita u plazmu naziva se hemoliza. Hemoglobin ima više uloga:

- ✓ transport O_2 od pluća do tkiva (*oksihemoglobin*),
- ✓ transport CO_2 od tkiva do pluća (*karbaminohemoglobin*) i
- ✓ puferska uloga.

Pošto molekul hemoglobina sadrži četiri molekula hema, a za svaki atom gvožđa u hemu labavom vezom se veže jedan molekul kiseonika, proizilazi da hemoglobin veže i transportuje četiri molekula kiseonika. Jedan gram hemoglobina može da veže 1,34 ml kiseonika, a koncentracija hemoglobina u krvi se izražava u g/L. Koncentracija hemoglobina u krvi kod pojedinih životinjskih vrsta i čoveka je data u tabeli 2.2.

Tabela 2.2: Koncentracija hemoglobina u krvi (g/L)

Vrsta	Koncentracija Hb	Vrsta	Koncentracija Hb
Pas	150 (120 - 180)	Svinja	130 (100 – 160)
Mačka	120 (80 - 140)	Konj	110 (80 – 140)
Krava	110 (80 - 140)	Živina	110 (100 – 104)
Ovca	120 (80 – 160)	Kunić	120 (80 – 150)
Koza	110 (80 – 140)	Čovek	150 (140 – 160)

Hemoglobin ne vezuje samo O_2 i CO_2 već i čitav niz hemijskih materija pri čemu mogu nastati derivati koji nisu u stanju vezivati O_2.

✓ *Karboksihemoglobin* nastaje pri vezivanju sa CO. CO se veže za Fe hema koordinativnom vezom (isto kao i O_2) ali je ta veza znatno čvršća. Afinitet hemoglobina za CO je oko 200 puta veći nego za kiseonik i u sredini sa malim procentom CO u

vazduhu (0,1%) veliki deo hemoglobina se pretvara u karboksihemoglobin. Krv koja sadrži karboksihemoglobin ima izrazito crvenu boju (kao trešnja).

- ✓ *Methemoglobin* nastaje pri oksidaciji Fe u hemoglobinu iz fero u feri oblik pri čemu se za treću valencu veže OH grupa. Hem methemoglobina se naziva hemin i nije u stanju da veže O_2. Normalno ga u krvi može biti u vrlo malim količinama (do 1% od ukupne količine hemoglobina).

- ✓ *Cijanohemoglobin* nastaje pri trovanju cijanvodonikom.

- ✓ *Sulfohemoglobin* nastaje kada se za Fe hema veže sumporvodonik (H_2S).

- ✓ *Nitrozohemoglobin* nastaje kod trovanja oksidima azota.

Određivanje koncentracije hemoglobina u krvi ima u klinici veliki značaj jer podaci o koncentraciji hemoglobina, uz podatke o vrednosti hematokrita i broju eritrocita, mogu da služe kao dobar pokazatelj procesa eritropoeze, ukazuju na prisustvo raznih oblika anemije, itd.

Koncentracija hemoglobina u krvi može se odrediti primenom više metoda:

- ✓ *kolorimetrijske* (meri se intenzitet boje hemoglobina ili nekog njegovog stvorenog derivata – hlorhemin, oksihemoglobin),

- ✓ *gasometrijske* (na osnovu merenja vezanog kiseonika u određenoj zapremini krvi) i

- ✓ *hemijske* (određivanjem koncentracije gvožđa).

U kliničkoj praksi najviše se koristi kolorimetrijska metoda po Sahliju jer je dosta jednostavna, ne zahteva skupu opremu a izvođenje kratko traje. Metoda po Sahliju se zasniva na poređenju boje kiselog hematina, nastalog delovanjem HCl na krv, sa bojom standardnog rastvora hematina koji se nalazi u cevčicama hemoglobinometra. Izgled hemoglobinometra po Sahliju prikazan je na slici 2.8.

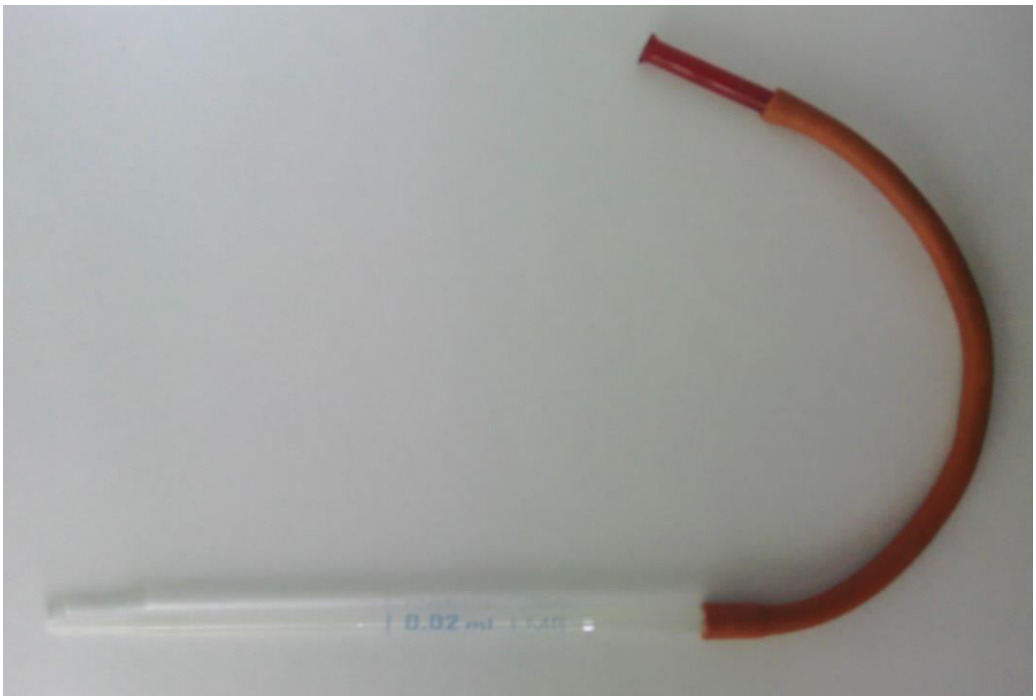
Hemoglobinometar po Sahliju je, ustvari, jedan stalak u kojem se nalaze tri cevčice. U sredini je jedna graduisana epruvetica koja na jednoj strani ima podeoke u stepenima po Sahliju (° S), a na drugoj strani su podeoci u apsolutnim količinama hemoglobina izraženi u g% (grama hemoglobina u 100 ml krvi). U hemoglobinometru se sa svake strane graduisane epruvetice nalazi po jedna zatopljena cevčica ispunjena standardom (kontrola).

Slika 2.8: Hemoglobinometar po Sahliju

ZADATAK: Odrediti koncentraciju hemoglobina u krvi metodom po Sahliju.

MATERIJAL: Hemoglobinometar po Sahliju, melanžer za hemoglobin (0,02 ml), igle, vata, alkohol, 0,1 M HCl, destilovana voda.

IZVOĐENJE: U graduisanu epruvetu hemoglobinometra uliti do oznake 10 0,1 M HCl. Kapilarnom pipetom (melanžerom) (slika 2.9), direktno sa mesta uboda ili iz epruvete sa heparinisanom krvi, uzeti 0,02 ml krvi i pažljivo je istisnuti u rastvor HCl u graduisanoj epruveti. Sadržaj epruvete pažljivo izmešati staklenim štapićem i ostaviti da stoji 3 do 5 minuta. U ovom vremenu HCl će izvršiti hemolizu eritrocita, izvršiće se oksidacija gvožđa iz hemoglobina (dvovalentno gvožđe u trovalentno gvožđe) i nastaće hemati-hlor-hidrat, jedinjenje smeđe boje čiji je intenzitet proporcionalan količini hemoglobina. Dodavanjem destilovane vode kapaljkom, uz pažljivo mešanje staklenim štapićem, treba boju rastvora nastalog hematina približiti izgledu boje standarda u cevčicama. Kada dođe do toga, rastvorom iz epruvete isprati melanžer kojim je uzeta krv i ispirke ponovo vratiti u epruvetu. Zatim, dodavati kap po kap destilovane vode i uz mešanje podesiti da se boja rastvora hematina izjednači sa bojom standarda u kontrolnim cevčicama. Očitati visinu rastvora u cevčici na skali u g% i dobivenu vrednost pomnožiti sa 10 da bi se dobila vrednost u g/L.



Slika 2.9: Melanžer za hemoglobin

Glavni nedostatak ove metode leži u subjektivnoj proceni intenziteta boje rastvora pri upoređivanju sa bojom kontrolnih cevčica, pa su moguće i greške, što se uvežbanim radom može svesti na nivo ispod 10%.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Hg = g%

Hg = g/L

ZAKLJUČAK (Da li je koncentracija Hg u fiziološkim granicama?):

2.8 Hematološki indeksi

Procenu anemičnog stanja organizma i tipa anemije u kliničkoj praksi nije moguće izvršiti pouzdano samo na osnovu podataka o broju eritrocita, ili koncentracije hemoglobina, ili podataka o hematokritskoj vrednosti.

Zbog toga se u klinici, na temelju pojedinačnih vrednosti za ova tri pokazatelja, izračunavaju hematološki indeksi (eritrocitni indeksi). To su:

- ✓ Indeks bojenja;
- ✓ Srednja vrednost količine hemoglobina u eritrocitu;
- ✓ Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu i
- ✓ Srednja vrednost zapremine eritrocita.

2.8.1 Indeks bojenja

Indeks bojenja (I.O.) je relativni pokazatelj stepena punjenosti eritrocita hemoglobinom. Indeks bojenja predstavlja količnik između koncentracije hemoglobina i broja eritrocita izraženih u procentima u odnosu na normalne vrednosti. To znači, za izračunavanje indeksa bojenja za krv ispitivane jedinke treba znati fiziološke (normalne) vrednosti broja eritrocita i koncentracije hemoglobina za datu vrstu, a nekada i rasu domaćih životinja kojoj ta jedinka pripada.

$$\text{I.O.} = \frac{\%\ \text{Hb u odnosu na normalnu vrednost}}{\%\ \text{Er u odnosu na normalnu vrednost}}$$

PRIMER: U krvi goveda je utvrđeno:

Broj eritrocita = $6{,}5 \times 10^{12}$/L; Hb = 115 g/L

Normalne vrednosti su: Broj eritrocita = 7×10^{12}/L; Hb = 110 g/L

%Hb od normalne vrednosti = (115 / 110) X 100 = 1,04 X 100 = 104%

%Er od normalne vrednosti = $(6{,}5 \times 10^{12} / 7 \times 10^{12}) \times 100 = 0{,}93 \times 100 = 93\%$

I.O. = 104 / 93 = 1,12

Ovaj nalaz govori da su eritrociti pojedinačno relativno dobro napunjeni hemoglobinom. Kada je količina hemoglobina u eritrocitima normalna, odnosno kada su eritrociti pojedinačno dovoljno ispunjeni hemoglobinom, indeks obojenja jednak je jedinici (1). Međutim, pošto postoje fiziološka variranja u vrednostima za broj eritrocita i koncentraciju hemoglobina u krvi, uzimanje srednje vrednosti povlači nastanak greške; stoga se vrednost I.O. od 0,85 do 1,15 smatra fiziološkom. Kod hipohromnih anemija vrednost I.O. je manja od 0,85, a kod hiperhromnih anemija je veća od 1,15.

ZADATAK: Na osnovu podataka utvrđenih na prethodnim vežbama o vrednostima broja eritrocita i koncentracije hemoglobina i koristeći podatke o normalnim prosečnim vrednostima, izračunati I.O.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Utvrđene vrednosti su: Broj eritrocita = /L

Hb = g/L

Normalne vrednosti su: Broj eritrocita = /L

Hb = g/L

% Hb od normalne vrednosti =

% Er od normalne vrednosti =

I.O. =

ZAKLJUČAK:

2.8.2 Srednja vrednost količine hemoglobina u eritrocitu

Srednja vrednost količine hemoglobina u eritrocitu (MCH – Mean Corpuscular Hemoglobin) predstavlja prosečnu težinu hemoglobina u eritrocitima izraženu u pikogramima (1pg = $10^{-}12$ g).

MCH se izračunava po sledećoj formuli:

$$MCH = \frac{Hb\ (g/L)}{Er\ (/L)}$$

PRIMER: Broj Er u krvi psa je 6 X 10^{12}/L, Hb = 150 g/L (150 X 10^{12} pg/L)

$$MCH = 150 \times 10^{12} / 6 \times 10^{12} = 150 / 6 = 25 \text{ pg Hb u eritrocitu}$$

ZADATAK: Na osnovu podataka utvrđenih na prethodnim vežbama o vrednostima broja eritrocita i koncentracije hemoglobina izračunati MCV.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Utvrđene vrednosti su: Broj eritrocita = /L

Hb = g/L

MCH =

ZAKLJUČAK:

2.8.3 Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu

Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u eritrocitu (MCHC – Mean Cellular Hemoglobin Concentration) izračunava se iz odnosa koncentracije hemoglobina u g/L krvi i hematokritske vrednosti (Ht), a izražava se u procentima. Normalne vrednosti MCHC iznose oko 33%. MCHC se izračunava po sledećoj formuli:

$$MCHC = \frac{Hb\ (g/L)}{Ht\ (\%)} X\ 10$$

PRIMER: Hb = 150 g/L; Ht = 45%

MCHC = (150 / 45) / X 10= 33%

ZADATAK: Na osnovu podataka utvrđenih na prethodnim vežbama o vrednostima koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti izračunati MCH.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Utvrđene vrednosti su: Hb = g/L

Ht = %

MCHC =

ZAKLJUČAK:

2.8.4 Srednja vrednost zapremine eritrocita

Srednja vrednost zapremine eritrocita (MCV – Mean Cellular Volume) se izražava u μm^3 (kubnim mikrometrima). Zapremina eritrocita sisara i ptica je obrnuto srazmerna broju eritrocita u litru krvi. U krvi zdrave jedinke eritrociti su uglavnom približno ujednačenog prečnika i oblika (normocitoza). Kod raznih tipova anemija veličina eritrocita u cirkulaciji često je promenjena, pa se stoga izračunava prosečna vrednost njihove zapremine koristeći utvrđene vrednosti o broju eritrocita i hematokritske vrednosti sledećom formulom:

$$MCV = \frac{Ht\ (\%)}{Er\ (u\ 1L)} \times 10$$

PRIMER: Ht = 48%, Er = 6×10^{12}/L

$$MCV = \frac{48\%}{6 \times 10^{12}/L} \times 10 = 80 \times 10^{-12}\ mm^3 = 80\ \mu m^3$$

ZADATAK: Na osnovu podataka utvrđenih na prethodnim vežbama o vrednostima broja eritrocita i hematokritske vrednosti izračunati MCHC.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Utvrđene vrednosti su: Ht = %

Er = /L

MCV =

ZAKLJUČAK:

2.9 Teichmannovi kristali (Hlorhemin kristali)

Hlorhemin je derivat protoporfirina koji ima vezan atom trovalentnog gvožđa (feri), a na taj atom još i jon Cl^-. Hem za razliku od hemina ima dvovalentno gvožđe (fero). Kristali hlorhemina su smeđe boje i imaju karakterističan oblik. Obično se nazivaju Teichmannovim kristalima, po autoru koji ih je otkrio 1852. godine. Dobijanje Teichmannovih kristala može poslužiti kao reakcija za dokazivanje krvi (npr. u sudskoj analizi). Krv različitih vrsta daje iste kristale hlorhemina jer njihovi hemoglobini imaju iste hem grupe (ne može se tvrditi da li je krv poreklom od čoveka ili životinje).

ZADATAK: Izvesti Taichmannovu probu za dokaz krvi. Zabeležiti zapažanja i dati zaključak.

MATERIJAL: Mikroskop, predmetna stakla, pokrovna stakla, NaCl, sirćetna kiselina, plamenik, kapaljka, krv.

IZVOĐENJE: Na predmetno staklo staviti manju kap krvi i pomoću drugog predmetnog stakla napraviti razmaz. Razmazu dodati nekoliko kristala NaCl. Kad se krv osuši, pokriti je pokrovnim staklom i oprezno, uz rub pokrovnog stakla, dodati kap CH_3COOH, koja će se kapilaritetom proširiti ispod pokrovnog stakla. Nakon toga preparat blago zagrevati 30 do 60 sekundi na plameniku. Paziti da kiselina ne provri, a ukoliko kiselina ispari dokapati još jednu kap kiseline. Nakon zagrevanja preparat pustiti da se ohladi, a zatim pod mikroskopom promatrati kristale. Teichmannovi kristali vide se kao smeđe iglice koso odrezanih krajeva.

ZAPAŽANJA:

ZAKLJUČAK:

2.10 Sedimentacija eritrocita

Kada se krv, kojoj je dodat neki od antikoagulanasa, ostavi da stoji u nekoj posudi, zapaža se da se eritrociti talože prema dnu, plazma se istiskuje i ostaje u gornjim slojevima, a leukociti zauzmu prostor između njih. Eritrociti imaju veću specifičnu težinu od plazme pa je i to već razlog da se oni spontano talože. Brzina kojom će se proces taloženja eritrocita (*sedimentacija eritrocita* – SE) odvijati zavisi i od mnogih drugih faktora koji utiču na stabilnost suspenzije eritrocita, kao što su: vrsta životinje, broj eritrocita, odnos između sadržaja albumina i globulina u krvnoj plazmi (A/G količnik), sadržaj gamaglobulina i fibrinogena, temperatura, koncentracija holesterola i lecitina u krvi.

Brzina kojom se sedimentacija eritrocita odigrava u kliničkoj praksi je merilo za procenu zdravstvenog stanja organizma. Dokazano je da kod mnogih akutnih i hroničnih oboljenja (gnojne infekcije, tuberkuloza, anemije, leukemija, tumori i dr.) dolazi do ubrzane sedimentacije eritrocita, pa se stoga njeno određivanje koristi kao nespecifična dijagnostička proba, tj. ubrzana sedimentacija eritrocita ne ukazuje na određeno oboljenje, ali ukazuje na to da nešto sa zdravstvenim stanjem nije u redu (nije patognomonični simptom). Iz tog razloga, svako hematološko ispitivanje krvi obavezno uključuje i određivanje brzine sedimentacije eritrocita. U tabeli 2.3 su prikazane fiziološke vrednosti brzine sedimentacije eritrocita kod pojedinih vrsta domaćih životinja i čoveka u toku 1, 2 i 24 sata.

Tabela 2.3: Brzina sedimentacije eritrocita

Vrsta	**Za 1 sat**	**Za 2 sata**	**Za 24 sata**
Konj	69	71	74
Goveče	1	2	12
Ovca	1 - 4	3 - 8	6 – 15
Koza	1 - 4	3 - 10	9 – 24
Svinja	2 - 8	5 - 25	8 – 50
Pas	0,5 - 8	1 - 26	7 – 54
Čovek -muškarac	3 - 5	6 - 9	-
-žena	4 - 9	8 - 15	-

Sedimentacija eritrocita se u klinici određuje metodom po Westergreenu uzimanjem krvi u specijalne graduisane pipete i njihovim postavljanjem u određeni stalak. Merilo brzine taloženja eritrocita predstavlja visina stuba krvne plazme izdvojene u pipeti posle 1, 2 i 24 sata. Pipeta po Westergreenu je dužine 300 mm, prečnika 2 mm, sa oznakama od 0 do 200 mm. Pipeta se postavlja uspravno u odgovarajući stalak i fiksira specijalnim držačem sa gumenom podlogom.

ZADATAK: Odrediti sedimentaciju eritrocita u krvi psa, govečeta i konja metodom po Westergreenu.

MATERIJAL: Stalak sa pipetama po Westergreenu, špric od 2 ml, igle, vata, alkohol, 3,8% Na-citrat, epruvete, laboratorijski sat.

IZVOĐENJE: U špric od 2 ml uvući 0,4ml 3,8% Na-citrata, izvršiti venepunkciju i uzeti krv do oznake 2 ml. Krv iz šprica lagano, niz zid, usuti u epruvetu. Pažljivo izmešati i zatim uvući u Westergreenovu pipetu do oznake 0 (podeljci na pipeti su od 0 do 200). Pipetu postaviti uspravno u stalak, ostaviti na sobnoj temperaturi i odmah uključiti laboratorijski sat. Podeljci do kojih se spušta stub istaloženih eritrocita se očitavaju nakon 1 i 2 sata.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Sedimentacija Er nakon 1 sata:

Sedimentacija Er nakon 2 sata:

ZAKLJUČAK:

2.11 Hemoliza

Razaranje i pucanje membrane eritrocita i izlazak hemoglobina iz njega u okolnu sredinu naziva se *hemoliza*. Hemoliza se u *in vivo* i *in vitro* uslovima može izazvati različitim sredstvima, kao što su:

- ✓ mehanička (snažno protresanje i mućkanje krvi u posudi, višekratno zamrzavanje i odmrzavanje),
- ✓ fizička (rentgenski i ultraljubičasti zraci, električna struja),
- ✓ hemijska (razređivači masti: etar, hloroform, aceton, benzin, deterdženti i dr.),
- ✓ biološka (razni životinjski otrovi, toksini mikroorganizama i parazita) i dr.

Hemolizirana krv promeni izgled – od neprovidne postaje providna, svetlocrvena i sjajna.

U organizmu se neprekidno odigrava proces tzv. Intravitalne hemolize eritrocita (stari i istrošeni eritrociti). Međutim, proces hemolize može biti znatno intenziviran kod raznih patoloških stanja (parazitske invazije, imunološke reakcije, bakterijske infekcije, virusne bolesti i dr.), kada se hemoglobin pojavljuje i u mokraći (hemoglobinurija).

ZADATAK: Utvrditi pojavu hemolize u različitim uslovima nastajanja.

MATERIJAL: Citratna krv (0,4 ml Na-citrata + 1,6 ml krvi), stalak sa epruvetama, pipete, fiziološki rastvor (0,9% NaCl), destilovana voda, rastvor uree u destilovanoj vodi (3,83 mol/L), rastvor uree u fiziološkom rastvoru (3,83 mol/L), etar.

IZVOĐENJE: Obeležiti pet epruveta brojevima od 1 do 5 i u svaku uliti po pet kapi citratne krvi. Zatim u epruvete dodavati:

1. 18 ml fiziološkog rastvora,
2. 18 ml destilovane vode,
3. 18 ml 3,83 mol/L vodenog rastvora uree,
4. 18 ml 3,83mol/L rastvora uree u fiziološkom rastvoru,
5. 16 ml fiziološkog rastvora i 2 ml etra.

Sadržaj u svim epruvetama lagano izmešati, razmotriti i objasniti dobijene rezultate u svih pet epruveta.

PROSTOR ZA RAD:

1. epruveta:
2. epruveta:
3. epruveta:
4. epruveta:
5. epruveta:

ZAKLJUČAK:

2.12 Određivanje osmotske rezistencije eritrocita

Stepen otpornosti (rezistencije) eritrocita prema hemolitičkim sredstvima nije isti kod svih vrsta domaćih životinja. Otpornost je različita i između jedinki iste vrste, a nije ista ni za sve eritrocite krvi jedne jedinke. Ove činjenice, kao i činjenica da se u izvesnim patološkim stanjima otpornost eritrocita prema hemolitičkim sredstvima menja, dovele su do uvođenja veoma rasprostranjene metode ispitivanja otpornosti eritrocita prema hipotoničnim rastvorima NaCl (*osmotska rezistencija eritrocita* – ORE).

Metoda se zasniva na principu da eritrociti, stavljeni u rastvor NaCl koji po svom osmotskom pritisku odgovara osmotskom pritisku krvne plazme, ne pokazuju nikakve promene. Takav rastvor nazivamo izotoničnim rastvorom i odgovara koncentraciji NaCl od 8,9 g/L (0,89%).

Eritrociti stavljeni u hipertonični rastvor (NaCl više od 8,9 g/L, odnosno 0,89%) otpuštaju (gube) vodu i zapremina im se smanjuje, a membrana postaje naborana i smežurana. U hipotoničnom rastvoru (NaCl manje od 8,9 g/L, odnosno 0,89%) voda ulazi u eritrocite koji bubre, poprimaju kritičan volumen, i u zavisnosti od stepena hipotoničnosti dolazi do pucanja membrane i hemolize (osmotska hemoliza).

Obzirom da svi eritrociti ne pokazuju isti stepen otpornosti prema hipotoniji, prskanje membrane neće nastupiti istovremeno kod svih eritrocita. Ona koncentracija hipotoničnog rastvora NaCl u kojoj hemoliziraju najmanje otporni eritrociti označava se kao *koncentracija minimalne osmotske rezistencije*, a granična koncentracija u kojoj nastupa hemoliza i najotpornijih eritrocita, tj. u kojoj se javlja potpuna hemoliza označava se kao *koncentracija maksimalne osmotske rezistencije*. Opseg između minimalne i maksimalne rezistencije označava se kao *širina osmotske rezistencije*. Prosečne vrednosti minimalne i maksimalne osmotske rezistencije eritrocita, kod domaćih životinja i čoveka, prikazane su u tabeli 2.4.

Mladi eritrociti, a posebno retikulociti (nezreli eritrociti) mnogo su otporniji prema hipotoničnoj sredini od starijih eritrocita koji se duže vremena nalaze u cirkulaciji. Prema tome, određivanje osmotske rezistencije eritrocita daje podatke o starosnoj strukturi eritrocita u perifernoj krvi što je od koristi kod utvrđivanja postojanja raznih oblika anemija.

Tabela 2.4: Prosečne vrednosti minimalne i maksimalne osmotske rezistencije eritrocita

Vrsta	Koncentracija minimalne ORE	Koncentracija maksimalne ORE
Konj	0,59	0,39
Goveče	0,59	0,42
Ovca	0,62	0,48
Koza	0,62	0,48
Svinja	0,74	0,45
Pas	0,45	0,36
Mačka	0,69	0,50
Kokoš	0,41	0,28
Čovek	0,44	0,32

Za određivanje osmotske rezistencije eritrocita u kliničke svrhe obično se koristi hipotonični rastvor NaCl različitih opadajućih koncentracija i to do 7-3 g/L (0,7-0,3%), sa razlikama od 0,2 g/L (0,02%), što znači da se koristi 20 rastvora različitih koncentracija. Na taj način se dobijaju precizni podaci o osmotskoj rezistenciji eritrocita.

Moguće je uraditi i skraćeni postupak sa šest hipotoničnih rastvora NaCl gde međusobna razlika u koncentraciji iznosi 1 g/L (0,1%, 0,8-0,3%).

ZADATAK: Odrediti osmotsku rezistenciju eritrocita prema hipotoničnim rastvorima NaCl u rasponu 0,8-0,3%.

MATERIJAL: Citratna krv, centrifuga, epruvete, serološke epruvete sa stalkom, rastvor NaCl u koncentraciji 10 g/L (1%), destilovana voda, pipete.

IZVOĐENJE: Centrifugirati citratnu krv, odliti krvnu plazmu i eritrocite izmešati sa 1-2 ml fiziološkog rastvora (suspenzija eritrocita). U stalak poređati šest seroloških epruveta i u njima od 1% rastvora NaCl pripremiti hipotonične koncentracije po šemi prikazanoj u tabeli 2.5.

U svaku epruvetu dodati po dve kapi suspenzije eritrocita, lagano izmešati, ostaviti na sobnoj temperaturi jedan sat i očitati rezultat.

Prva epruveta u kojoj se zapazi crvenkasta boja tečnosti iznad taloga eritrocita predstavlja koncentraciju minimalne osmotske rezistencije (raspali su se eritrociti koji su najmanje otporni prema hipotoniji). Posmatrajući sadržaj epruveta dalje, prema većoj hipotoniji, treba uočiti epruvetu sa graničnom koncentracijom NaCl u kojoj nema taloga eritrocita i u kojoj je tečnost sa najviše izraženom crvenom bojom i providna; ta koncentracija NaCl odgovara koncentraciji maksimalne osmotske rezistencije eritrocita. Raspon između minimalne i maksimalne osmotske rezistencije predstavlja širinu osmotske rezistencije eritrocita.

Tabela 2.5: Priprema hipotoničnih rastvora NaCl

Epruveta	**1% NaCl (ml)**	**Destilovana voda (ml)**	**Dobijena koncentracija NaCl (%)**
1.	8	2	0,8
2.	7	3	0,7
3.	6	4	0,6
4.	5	5	0,5
5.	4	6	0,4
6.	3	7	0,3

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Koncentracija minimalne ORE:

Koncentracija maksimalne ORE:

Širina ORE:

ZAKLJUČAK:

2.13 Brojanje leukocita

Na obojenom krvnom razmazu leukociti (Le) predstavljaju heterogenu populaciju ćelija. Za razliku od crvenih krvnih zranaca, leukociti (bela krvna zrnca) su ćelije koje poseduju jedro. Okruglastog su oblika, prečnika 5 do preko 20 μm, sa jedrom različitog oblika i citoplazmom koja može biti homogena ili sadržati granule. Prema tome da li u citoplazmi sadrže granule ili ne, leukociti se dele na *agranulocite* (nemaju granule – limfociti i monociti) i *granulocite* (imaju granule – neutrofilni, eozinofili i bazofili). Broj leukocita u 1L krvi kod domaćih životinja i čoveka prikazan je u tabeli 2.6.

Tabela 2.6: Broj leukocita u 1L krvi (10^9/L)

Vrsta	**Broj leukocita**	**Vrsta**	**Broj leukocita**
Goveče	8 (6 - 10)	Pas	12 (8 – 18)
Ovca	7,5 (6 – 10)	Mačka	10 (9 – 15)
Koza	10 (8 – 12)	Kokoš	14 (5 – 25)
Svinja	9 (8 – 11)	Čovek	7 (6 - 8)
Konj	12 (8 – 12)		

Normalno, pod fiziološkim uslovima u toku dana broj leukocita u perifernoj krvi znatno varira. Do znatnog variranja broja leukocita u krvi dolazi i kod raznih patoloških stanja i to u pravcu povećanja broja leukocita u 1L krvi ili u pravcu smanjivanja broja. Termini kojima se označava povećanje, odnosno smanjnje, ukupnog broja leukocita u jedinici zapremine krvi su:

- ✓ *leukocitoza* – povećanje broja leukocita (javlja se kod raznih infektivnih bolesti, gnojnih procesa, zapaljenja, tumora, itd.) i
- ✓ *leukopenija* – smanjenje broja leukocita (prisutna je kod oštećenja koštane srži jonizujućim zračenjem i teškim metalima, kao što su živa i olovo, kod uzimanja nekih lekova, metastaze malignih tumora, itd.).

U kliničkoj praksi nije dovoljno izvršiti samo brojanje leukocita jer utvrđena leukocitoza ili leukopenija ne znači da je do toga došlo ravnomernim povećanjem ili smanjivanjem broja svih vrsta leukocita. Zbog toga je, pored poznavanja broja leukocita u 1L krvi, potrebno znati i koja vrsta leukocita je prouzrokovala leukocitozu ili leukopeniju i zato je potrebno odrediti i leukocitarnu formulu (diferencijalnu krvnu sliku) koja

označava kvantitativni (procentualni) odnos pojedinih vrsta leukocita (o tome će biti reči na jednoj od narednih vežbi).

Opšta uloga leukocita je u zaštiti organizma od stranih i štetnih agenasa. Ovu ulogu mogu obavljati zahvaljujući opštim funkcionalnim osobinama kao što su:

- ✓ fagocitoza („proždiranje“ bakterija, izumrlih ćelija, stranih materija i čestica, antigen-antitelo kompleksa i dr.),
- ✓ dijapedeza (prolazak kroz zid kapilara u okolno tkivo),
- ✓ hemotaksa (kretanje prema mestu gde se nalaze materije koje ih privlače),
- ✓ posedovanje enzima.

Princip određivanja broja leukocita sastoji se u tome da se pod mikroskopom u komorici u zapremini od $1mm^3$ izvrši brojanje leukocita u razblaženoj krvi u kojoj su eritrociti hemolizirani. Krv se razblažuje pomoću Türckovog rastvora u melanžeru za leukocite.

Türckov rastvor ima sledeći sastav:

Koncentrovana sirćetna kiselina	2 ml
1% rastvor boje gencijana-violet	3 ml
Destilovana voda	do 300 ml

Melanžer za leukocite je sličan melanžeru za eritrocite, samo što je trbušasto proširenje manje (u njemu se nalazi plastična perla bele boje) i iznad proširenja se nalazi oznaka 11 (slika 2.9).

Slika 2.9: Melanžer za leukocite

Izgled komore za brojanje ćelijskih elemenata krvi (Neubauerove komore) je dat u okrviru vežbe brojanja eritrocita.

ZADATAK: Odrediti broj leukocita u krvi neke domaće životinje i/ili čoveka.

MATERIJAL: Vata, alkohol, igle, mikroskop, Türckov rastvor, melanžer za leukocite, Neubauerova komora.

IZVOĐENJE: U melanžer do oznake 0,5 uzeti krv iz jagodice prsta čoveka ili iz epruvete sa heparisanom krvi psa, a zatim Türckov rastvor do oznake 11 (razblaženje je 20 puta). Tokom protresanja i mešanja krvi i rastvora došlo je do razaranja eritrocita (hemoliza) usled delovanja sirćetne kiseline, a gencijana-violet boji jedra leukocita. Priprema i punjenje Neubauerove komorice isti su kao kod brojanja eritrocita.

Na malom uveličanju objektiva (10X) naći celu centralnu mrežicu od $1mm^2$ i u njoj, što znači u svih 400 kvadratića, izbrojati sve leukocite i zabeležiti njihov broj. Zatim u vidno polje dovesti redom sva četiri ugaona kvadrata od $1mm^2$ (koji imaju 16 manjih kvadrata) i u njima izbrojati leukocite. Isti postupak ponoviti i na mrežici sa suprotne strane polja. Na taj način su izbrojani svi leukociti razblažene krvi u 10 kvadrata površine $1mm^2$ i pojedinačne zapremine 0,1 mm^3. Znači, dobijen je broj leukocita u zapremini od $1mm^3$ (10 X 0,1 mm^3 = 1 mm^3) razblažene krvi. Broj eritrocita u $1mm^3$ krvi se dobija po sledećoj formuli:

Broj leukocita u $1mm^3$ krvi = broj izbrojanih leukocita X 20 (razblaženje)

Broj uobličenih elemenata krvi se izražava u vrednostima koje odgovaraju jednom litru krvi. Do te vrednosti se dolazi ako se ustanovljeni broj leukocita u $1mm^3$ pomnoži sa 10^6.

PRIMER: U 10 kvadrata je izbrojano ukupno 300 leukocita.

$300 \times 20 = 6000$ Le u 1 $mm^3 = 6 \times 10^3$ Le u 1 mm^3

$6 \times 10^3 \times 10^6 = 6 \times 10^9$ u 1 L

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Broj Le u kvadratima

1. kvadrat:	6. kvadrat:
2. kvadrat:	7. kvadrat:
3. kvadrat:	8. kvadrat:
4. kvadrat:	9. kvadrat:
5. kvadrat:	10. kvadrat:

Ukupan broj Le u 10 kvadrata:

Broj Le u 1 mm^3 = Broj Le u 1 L =

ZAKLJUČAK (Da li je broj Le u fiziološkim granicama za vrstu?):

2.14 Leukocitarna formula (Diferencijalna krvna slika)

Pojedine vrste leukocita u perifernoj krvi se međusobno razlikuju po građi, izgledu i veličini, kao i funkciji koju vrše u organizmu. Prema sastavu i izgledu citoplazme dele se na *granulocite* (sadrže specifične granule) i *agranulocite* (nemaju granule i njihova citoplazma je homogena). Prema afinitetu granula za boje, granulociti se dele na *neutrofilne*, *eozinofilne* i *bazofilne granulocote*. U agranulocite spadaju *limfociti* i *monociti*. U krvnom razmazu, obojenom smešom kiselih i baznih boja, pojedine vrste leukocita se razlikuju, identifikuju i registruju, a njihov procentualni odnos se označava kao *leukocitarna formula* (diferencijalna slika – DKS) (tabela 2.7).

Tabela 2.7: Leukocitarna formula

Vrsta	**% od ukupnog broja leukocita**				
	neutrofili	**eozinofili**	**bazofili**	**limfociti**	**monociti**
Čovek	60 -70	2 - 4	0,5	25 - 30	6 – 8
Goveče	25 - 35	2 - 5	1	60 - 65	5
Ovca	25 - 35	2 - 5	1	60 - 65	5
Koza	34 - 40	2 - 5	1	50 - 55	5
Svinja	35 - 50	2 - 5	1	45 - 55	5 – 6
Konj	50 - 60	2 - 5	1	3, - 40	5 - 6
Pas	60 - 70	2 - 5	1	20 – 25	5
Mačka	55 - 60	2 - 5	1	30 – 35	5
Kokoš	25 - 30	3 - 8	1 - 4	55 – 60	10
Pacov	20 – 25	2 - 5	1	70 – 75	2 - 3

Iz utvrđene leukocitarne formule za dati uzorak krvi i broja leukocita može se za svaku vrstu leukocita izračunati stvarni broj u 1L krvi.

Određivanje leukocitarne formule temelji se na prepoznavanju i identifikovanju pojedinih vrsta leukocita u krvnom razmazu obojenom smešom kiselih i baznih boja. To zahteva poznavanje osnovnih morfoloških karakteristika pojedinih vrsta leukocita. Granulociti se od agranulocita razlikuju po tome što u svojoj citoplazmi poseduju specifične granule.

- ✓ **Granulociti:**

Neutrofilni granulociti (neutrofili) su nešto većeg prečnika od eritrocita (9-15 µm) i imaju bledo ružičastu, gotovo bezbojnu citoplazmu posutu sitnim neutrofilnim zrncima. Jedro neutrofila je obično podeljeno u 1–5 segmenata (polimorfonuklearni leukocit).

Mladi neutrofili, tek dospeli u cirkulaciju, imaju manji broj segmenata u jedru (1–2) i oni se u većem broju javljaju u krvi kod svih gnojnih infekcija i u početnoj fazi infektivnih oboljenja. Kada u krvnom razmazu dominiraju takvi neutrofili, govori se o pojavi „skretanja u levo“, ako preovladavaju neutrofili sa većim brojem segmenata u jedru (4-5 i više), onda se govori o pojavi „skretanja u desno“. Ovaj nalaz ukazuje da se neutrofili u cirkulaciji ne obnavljaju, njihovo stvaranje je smanjeno što je prisutno kod nekih oštećenja koštane srži raznim zračenjem i hemijskim materijama.

Povećan procenat neutrofila se označava kao *neutrofilija*, dok se smanjen procenat neutrofila označava kao *neutropenija*.

Eozinofilni granulociti (eozinofili) imaju prečnik 12-18 µm. U citoplazmi se nalaze specifične granule koje imaju afinitet prema kiselim bojama (acidofilni granulocit) što im daje crvenu boju koja je najkarakteristična u eozinofilima kod konja. Granule su veličine 0,5 µm, a kod konja oko 3 µm. Jedro eozinofila ima najčešće do 2 segmenta koja su postavljena tako da potsećajuna bisage. Normalno u cirkulaciji ima 2-5% eozinofila. Međutim, kod jedinki zahvaćenih parazitarnim invazijama ili alergijskim procesom, procenat eozinofila može biti 10-15%.

Povećan broj eoziofilnih granulocita se označava kao *eozinofilija*. Smanjen broj eozinofila – *eozinopenija*, nastaje kod stanja stresa i kod parenteralnog davanja hormona prednjeg režnja hipofize – ACTH.

Bazofilni granulociti (bazofili) su najmanje zastupljeni leukociti u perifernoj krvi (0,5-1%) i imaju samo uzak prečnik koji se kreće od 9-12 µm. U obojenom razmazu jedro bazofila je obojeno svetlo ljubičastom bojom, obično ima 2 segmenta. U citoplazmi se nalazi veći broj tamno plavo obojenih granula veličine 0,5-1 µm. Bazofili histološki dosta liče na mastocite koji predstavljaju tkivne fiksne makrofage (mastociti nastaju od monocita).

Povećan broj bazofilnih granulocita se označava kao *bazofilija*, a smanjen broj – *bazopenija*.

✓ **Agranulociti:**

Limfociti - zreli limfocit je veličine 5-10 µm, premda ima i većih, dijametara 10-17 µm. Limfociti imaju masivno jedro koje ispunjava skoro celu ćeliju, oko jedra je samo uzak pojas na periferiji ćelije svetloplavo obojene citolazme. U krvi pojedinih vrsta životinja (preživara, kokoši, pacova) limfociti su brojno najzastupljeniji leukociti (55-65%).

Postoje dve populacije limfocita: T-limfociti koji su nosioci celularnog i B-limfociti humoralnog imuniteta.

Povećan procenat limfocita se označava kao *limfocitoza*, dok se smanjen procenat limfocitaoznačava kao *limfopenija*.

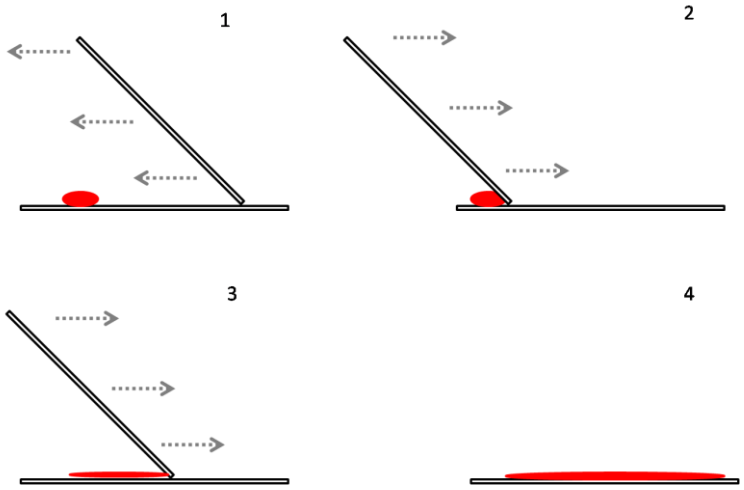
Monociti su najveće ćelije koje se nalaze u krvnom razmazu (oko 20 µm) i oko 3 puta su veći od eritrocita. Imaju jasno izraženu membranu, veliko jedro bubrežastog ili pasuljastog oblika oko koga se nalazi prilično velika količina negranulirane ili slabo granulirane citoplazme sivoplave boje.

Monocitoza označava povećan broj monocita, dok *monocitopenija* označava smanjen broj monocita.

ZADATAK: Odrediti leukocitarnu formulu u uzorku krvi domaće životinje i/ili čoveka.

MATERIJAL: Mikroskop sa imerzionim objektivom, predmetna stakla, May-Grünwald rastvor, Giemsa, voda, stalak za sušenje i bojenje krvnih razmaza, kedrovo ulje, destilovana voda. (Boje se nabavljaju kao gotove za upotrebu.)

IZVOĐENJE: Na jedan kraj potpuno čistog i suvog predmetnog stakla staviti kap krvi. Držeći predmetno staklo između palca i kažiprsta jedne ruke, drugom rukom prisloniti uz kap krvi užu ivicu drugog predmetnog stakla položenog pod uglom od 45°. Kada se kap krvi razlije, umerenom brzinom pokretanja ruke u jednom potezu povuče se gornje staklo po donjem i krv se razvuče po donjem staklu (slika 2.10). Treba nastojati da se krvni razmaz napravi pravilno, a ako ima više uzoraka krvi, treba ih označiti.



Slika 2.10: Pravljenje krvnog razmaza

Napravljeni krvni razmaz ostaviti da se dobro osuši i bojiti ga. Od mnogih načina bojenja najčešće se koristi bojenje po Pappenheimu.

Osušeni razmaz krvi postaviti na staklene prečke iznad posude tako da jedan preparat ne dotiče drugi. Na razmaz pipetom naneti oko 2 ml May-Grünwald boje. Sačekati 3 minute i ne sklanjajući boju dodati istu količinu destilovane vode i ostaviti da stoji 1 minutu. Odliti boju sa preparata i preliti ga sveže pripremljenim rastvorom Giemse (1-2 kapi na 1 ml destilovane vode). Posle stajanja 15-20 minuta odliti rastvor Giemse, isprati destilovanom vodom i preparat osušiti. Osušeni obojeni krvni razmaz staviti pod mikroskop i pregledati pod objektivom koji uvećava 10 puta.

Uočiti da u preparatu dominiraju eritrociti koji imaju ružičastu boju sa slabije obojenim centralnim delom. Na ovaj način je moguće zapaziti različita odstupanja u veličini i obliku eritrocita. Ako su eritrociti međusobno uočljivo različiti po veličini, tu pojavu nazivamo *anizocitoza*, ako dominiraju veliki eritrociti – *makrocitoza* ili mali - *mikrocitoza*. Pojava većeg broja sitnih i kruškolikih eritrocita naziva se *pojkilocitoza*.

Determinacija i identifikacija pojedinih vrsta leukocita vrši se pomoću većeg uvećanja korišćenjem imerzionog objektiva. Staviti jednu kap kedrovog ulja na preparat i polako mičući preparat, u vidnim poljima razlikpovati i prepoznavati pojedine leukocite i unositi brojčane podatke u već pripremljenu tabelu (tabela 2.8) sve dok se ne pregleda i identifikuje ukupno 100 leukocita.

U svakoj koloni treba da bude uneseno po 10 leukocita (najbolje za svaki leukocit po jedna uspravna crta) – 10 kolona po 10 leukocita = ukupno 100 leukocita. Izbrojati broj crtica po redovima za svaku vrstu leukocita i broj upisati u poslednjoj koloni (%).

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Tabela 2.8: Tabela za određivanje leukocitarne formule

Neutrofili											%
Eozinofili											
Bazofili											
Limfociti											
Monociti											

ZAKLJUČAK:

ZADATAK: Izračunati stvarni broj pojedinih vrsta leukocita u 1 L krvi.

IZVOĐENJE: Iz utvrđene leukocitarne formule i ukupnog broja leukocita može se izračunati stvarni broj pojedinih vrsta leukocita u 1L krvi. Izračunavanje se obavlja po sledećoj formuli:

Broj određene vrste leukocita = (ukupan broj leukocita X procentualno učešće) / 100

PROSTOR ZA RAD:

Ukupan broj Le =		/L	
Neutrofili =	/L	Limfociti =	/L
Eozinofili =	/L	Monociti =	/L
Bazofili =	/L		

ZAKLJUČAK:

2.15 Brojanje trombocita

Trombociti (Tr) ili krvne pločice su korpuskularni elementi krvi, prečnika 2-4 µm, nemaju jedro. U razmazima periferne krvi, posmatrani svetlosnim mikroskopom, trombociti imaju okrugao, ovalan, a nekad i štapićast oblik. Kada se aktiviraju, ispuštaju pseudopode i poprimaju oblik morske zvezde. Nastaju u koštanoj srži fragmentacijom velike džinovske ćelije – megakariocita i u cirkulaciji žive 7-11 dana. Membrana trombocita je nežna i krhka, brzo se raspada u dodiru trombocita sa stranom površinom (zid staklenog suda, vezivo ispod oštećene intime krvnog suda). Nagomilavanje trombocita na mestu oštećenog zida krvnog suda prouzrokuje nastanak promena na njima, a na kraju i raspadanje i oslobadjanje nekoliko bioloških aktivnih sastojaka, što je u neposrednoj vezi sa njihovom ulogom u procesu hemostaze (zaustavljanje krvarenja).

Broj trombocita varira u zavisnosti od vrste i može se bitno razlikovati i između jedinki iste vrste (tabela 2.9).

Tabela 2.9: Broj trombocita (10^9/L)

Vrsta	Broj trombocita	Vrsta	Broj trombocita
Čovek	200 – 500	Konj	200 – 500
Goveče	260 – 700	Svinja	150 – 500
Ovca	170 – 980	Pas	200 – 600
Koza	300 – 330	Mačka	170 - 370

Pojmovi kojima se opisuje odstupanje broja trombocita izvan fizioloških granica su:

- ✓ *trombocitoza* – povećanje broja trombocita u L krvi i
- ✓ *trombocitopenija* – smanjenje broja trombocita u L krvi.

ZADATAK: Odrediti broj trombocita u krvi neke domaće životinje i/ili čoveka.

MATERIJAL: Mikroskop, Neubauerova komorica, melanžer za leukocite, vata, alkohol, igla, rastvor za razblaženje, filter papir, Petrijeve šolje. Rastvor za razblaženje krvi za brojanje trombocita se priprema od 2 rastvora: A i B:

Rastvor A:	Na-citrat	1,0 g
	HgCl2	0,002 g
	Briljantkrezil plavo	0,2 g
	Destilovana voda	do 100 ml
Rastvor B:	3,33 molarni rastvor uree	

IZVOĐENJE: Pripremiti rastvor za razblaženje - uzeti po 5 ml rastvora A i rastvora B, izmešati i proceditи kroz filter papir. Posle uboda iglom na koži, uvući u melanžer pripremljeni rastvor za razblaženje do oznake 0,5, a zatim do oznake 1,0 uvući krv i na kraju do oznake 11 uvući ponovo rastvor za razblaženje krvi i mešati nekoliko minuta. Pripremiti i napuniti komoru za brojanje krvnih ćelija na način kako je to urađeno i pri brojanju eritrocita i leukocita. Komoru pažljivo prebaciti u vlažnu komoru – Petrijeva šolja, čiji su zidovi obloženi filter papirom natopljenim destilovanom vodom i ostaviti da stoji 30-60 minuta. Za to vreme će doći do hemolize eritrocita i bojenja trombocita. Pod velikim uvećanjem mikroskopa trombociti izgledaju kao tvorevine bledoplave boje. Trombociti se broje na isti način kao i eritrociti u 80 malih kvadratića, a broj izbrojanih trombocita pomnožen sa 10^9 predstavlja broj trombocita u 1 L krvi.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Broj Tr = /L

Pored direktnog brojanja trombocita, kako je napred opisano, postoji i indirektna metoda po Foniu. Po ovoj tehnici uporedo se na obojenom razmazu krvi pod imerzionim objektivom boje trombociti i eritrociti (potrebno je izbrojati trombocite na hiljadu eritrocita). Ako se prethodno odredi broj eritrocita u jednoj litri krvi, onda se može izračunati i broj trombocita po litri krvi.

ZADATAK: Odrediti broj trombocita u krvi domaće životinje i/ili čoveka indirektnom metodom.

MATERIJAL: Sve što je potrebno za brojanje eritrocita i za pravljenje i bojenje krvnih razmaza, sterilna igla, vata, alkohol i 14% rastvor $MgSO_4$.

IZVOĐENJE: Dezinfikovati mesto uboda (jagodica prsta, ušna školjka). Na mesto uboda staviti jednu kap 14% rastvora $MgSO_4$ (sprečava agregaciju trombocita). Kroz ovu kap izvršiti ubod iglom (lancetom). Istekla kap krvi se izmeša sa $MgSO_4$ i štapićem prenese na predmetno staklo. Napravi se tanak razmaz koji se ostavlja da se osuši. Bojenje osušenog razmaza vrši se metodom po Pappenheimu (kao i za diferencijalnu krvnu sliku, s tim što rastvor Giemse treba da stoji 50-60 minuta). Na kraju se preparat ispere destilovanom vodom i suši na vazduhu. Za to vreme se izvrši brojanje eritrocita istog uzorka krvi kako je ranije opisano. Paralelno brojanje trombocita i eritrocita obavlja se pod imerzionim objektivom, koristeći suženo vidno polje (u okular se umetne okrugli komadić filter papira na čijoj sredini je otvor veličine 5 X 8 mm). Preparat se postepeno pomera sve dok se ne izbroje trombociti i 1000 eritrocita (zapisivati uporedo u pripremljenu tabelu broj trombocita i eritrocita za svako vidno polje).

Broj trombocita u 1L krvi izračunava se po formuli:

$$Tr/L = \frac{Er/L \text{ X } Tr \text{ u razmazu}}{1000}$$

PRIMER: Uzeta je krv iz jagodice prsta čoveka i utvrđeno je:

Broj Er = $5 \text{ X } 10^{12}/L$

Broj TR u razmazu na 1000 Er = 80

$$Tr/L = \frac{5 \text{ X } 10^{12} \text{ X } 80}{1000}$$

$Tr = 400 X 10^9/L$

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je krv (navesti vrstu):

Broj Er = /L

Broj TR u razmazu na 1000 Er =

Broj Tr = /L

ZAKLJUČAK:

2.16 Vreme krvarenja

Odmah posle izazvane povrede – presecanja ili pucanja krvnog suda pokreće se proces hemostaze koji omogućava da se oštećenje na krvnom sudu zatvori i tako spreči daljnje krvarenje, isticanje i gubljenje krvi. Hemostaza se može podeliti na:

- ✓ Primarnu hemostazu (lokalna vazokonstrikcija i stvaranje hemostatskog čepa) i
- ✓ Sekundarnu hemostazu (koagulacija krvi).

Prva reakcija po oštećenju zida krvnog suda je lokalna vazokonstrikcija (suženje krvnog suda), na to se nadovezuje stvaranje hemostatskog čepa od agregiranih trombocita (beli koagulum), a na kraju se aktivira biohemijski proces koagulacije krvi sa stvaranjem koaguluma koji začepi oštećenje na krvnom sudu i spreči isticanje krvi. Nakon procesa koagulacije može doći do urastanja vezivnog tkiva u krvni ugrušak, što trajno zatvara otvor na krvnom sudu.

Velika važnost ove funkcije i brojni poremećaji koji mogu biti urođeni ili se javljaju tokom života kod čitavog niza bolesti, doveli su do uvođenja velikog broja proba koje imaju zadatak da ukažu na eventualne poremećaje u procesu koagulacije i uopšte hemostaze.

Vreme krvarenja označava vreme potrebno da se zaustavi spontano isticanje krvi iz namerno izazvane povrede tkiva i krvnog suda određene veličine. Koliko će vremena proći do zaustavljanja krvarenja zavisi od veličine uboda u tkivo, osobina kapilara, krvnog pritiska, broja i kvaliteta trombocita, količine tkivne trombokinaze, itd.

Vreme krvarenja kod čoveka iznosi oko 3 minute, kod domaćih životinja varira od 2-3 minute.

ZADATAK: Odrediti vreme krvarenja kod kunića i/ili čoveka.

MATERIJAL: Sterilne igle, vata, alkohol, dugačke trake filter papira, laboratorijski sat.

IZVOĐENJE: Dezinfikovati mesto uboda na ušnoj školjki kunića ili jagodici prsta čoveka i iglom izvršiti ubod dubine 3 mm. Prvu kap, koja spontano izađe iz mesta uboda, upiti filter papirom, a zatim svakih 15 sekundi upijati na drugom mestu papira stvorenu kap. Kada na ivicama filter papira više ne ostaje otisak krvi, znači da je prestalo isticanje krvi. Izbrojati broj otisaka na filter papiru i podeliti sa 4 da bi se dobilo vreme krvarenja u minutima.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivano je vreme krvarenja kod:

Vreme krvarenja iznosi:

ZAKLJUČAK:

2.17 Vreme koagulacije

Koagulacija krvi je biohemijski mehanizam homeostaze i predstavlja skup reakcija kaskadnog tipa u koje su uključeni sastojci krvne plazme (faktori koagulacije) proteinske prirode, joni Ca i fosfolipidi iz tkiva i trombocita. Krajnji rezultat ovog procesa je pretvaranje rastvorljive belančevine fibrinogena u nerastvorljivi fibrin koji se polimerizuje i stvara fibrinsku mrežu. Fibrinska mreža grupiše ćelijske elemente krvi, stvara se krvni ugrušak koji se stabilizuje, retrahuje i istiskuje krvni serum. Do sada je otkriveno i opisano 13 faktora koagulacije, mada se smatra da u krvi i u tkivima postoji najmanje 30 različitih sastojaka koji učestvuju u aktivaciji koagulacije krvi, a neki inhibiraju odvijanje ovog procesa. Koagulacija se odvija u tri faze:

1. faza: stvaranje aktivatora protrombina - protrombinaze (traje 5 - 8 mininuta),
2. faza: prevođenje neaktivnog protrombina u aktivni trombin pod dejstvom aktivatora protrombina (traje 10 do 20 sekundi) i

3. faza pretvaranje fibrinogena u fibrin pod dejstvom trombina (fibrin se polimerizuje, nastaju fibrinske niti koje zatvaraju mrežu u kojoj se zadržavaju uobličeni elementi i tako se formira krvni ugrušak – koagulum).

Podatak o određivanju vremena zgrušavanja krvi, ili vremena koagulacije, pokazuje koliko je vremena proteklo od momenta uzimanja (vađenja) krvi iz krvnog suda do početka njene koagulacije. Normalno, vreme koagulacije je duže od vremena krvarenja, jer u procesu zaustavljanja krvarenja učestvuje tkivni tromboplastin, a skraćivanju vremena krvarenja doprinosi i vazokonstrikcija krvnog suda.

Vreme koagulacije se po pravilu određuje kod pacijenata pre hirurških zahvata. Za određivanje vremena koagulacije postoji nekoliko metoda za koje se kao uzorak za ispitivanje koristi kapilarna ili venska krv.

ZADATAK: Odrediti vreme koagulacije krvi na predmetnom staklu (kapilarna krv).

MATERIJAL: Sterilne igle, vata, alkohol, predmetna stakla, laboratorijski sat.

IZVOĐENJE: Nakon uboda sterilnom iglom na koži ušne školjke ili jagodice prsta prvu iscurelu kap krvi ukloniti suvom vatom, a sledeću kap preneti na čisto predmetno staklo i odmah uključiti laboratorijski sat. Svakih 15 sekundi laganim izvrtanjem (naginjanjem) predmetnog stakla proveriti da li kap krvi klizi niz površinu stakla. Onog momenta kada kap prestane da se pomera zaustaviti sat, a proteklo vreme predstavlja vreme koagulacije krvi.

Vreme koagulacije određeno ovom metodom kod čoveka iznosi 4-5, psa 2-4, a konja 7-8 minuta.

ZADATAK: Odrediti vreme koagulacije krvi u kapilarnoj cevčici.

MATERIJAL: Žilet, vata, alkohol, staklene kapilare, laboratorijski sat, laboratorijski miš.

IZVOĐENJE: Miša zagrejati pod lampom i rep lagano zarezati žiletom. Čim se pojavi prva kap krvi zabeležiti vreme. Dve ili tri kapilarne cevčice džine oko 7 cm napunite krvlju i odložiti na stranu. Nakon dve minute, nežno odlomiti 1 cm cjevčice. Postupak ponavljati svakih 30 sekundi do trenutka kad se između dva odlomljena dela cevčice uoči formirana fibrinska nit. Zabeležiti vreme kao vreme zgrušavanja.

PROSTOR ZA RAD

Vreme koagulacije na predmetnom staklu:

Vreme koagulacije u kapilarnoj cevčici:

ZAKLJUČAK:

2.18 Dokaz značaja jona Ca za koagulaciju krvi

Joni Ca predstavljaju četvrti faktor koagulacije krvi (faktor IV) i neizostavan su činilac skoro u svakoj fazi koagulacije. Bez jona Ca nema procesa koagulacije i mnoga antikoagulantna sredstva sprečavaju koagulaciju na taj način što vezuju jone Ca (citrati, oksalati, fluoridi, EDTA).

ZADATAK: Izvesti zgrušavanje citratne krvi dodavanjem jona Ca.

MATERIJAL: Citratna krv, epruvete, pipeta, vodeno kupatilo, rastvor 0,25 mol $CaCl_2$ (5%).

IZVOĐENJE: Ispitivanje obaviti u dve epruvete:

1. epruveta: 3 ml citratne krvi + 0,3 ml $CaCl_2$ (5%)

2. epruveta: 3 ml citratne krvi (kontrola)

Obe epruvete staviti u vodeno kupatilo na 39°C i posle nekoliko minuta konstatovati u kojoj epruveti je došlo do zgrušavanja krvi.

PROSTOR ZA RAD:

1. epruveta:

2. epruveta:

ZAKLJUČAK:

2.19 Određivanje protrombinskog vremena

Protrombin je belančevina krvne plazme koja se sintetiše u jetri. Koncentracija protrombina iznosi oko 200 mg/L i održava se u fiziološkim granicama, što zavisi od funkcionalnog stanja i sposobnosti ćelija jetre i prisustva dovoljne količine vitamina K. Aktivacija protrombina u trombin odigrava se u drugoj fazi koagulacije krvi pod dejstvom tkivnog i krvnog tromboplastina, jona Ca i pod dejstvom već stvorenog trombina. Trombin je proteolitički enzim i deluje na molekul fibrinogena prevodeći ga u fibrin. Brzina zgrušavanja krvi direktno zavisi od količine stvorenog trombina.

Razna oštećenja i oboljenja jetre, avitaminoza K, poremećaji u varenju i resorpciji masti dovode do smanjenja koncentracije protrombina u krvi, što ima za posledicu poremećaje u procesu koagulacije krvi i pojavu sklonosti ka krvarenjima.

Odredjivanjem protrombinskog vremena, kao laboratorijske metode, određuje se vreme izraženo u sekundama koje protekne od momenta dodavanja tkivnog tromboplastina i jona Ca dekalcificiranoj (citratnoj) plazmi, do momenta početka njenog zgrušavanja. Ovo vreme je obrnuto proporcionalno koncentraciji protrombina u krvnoj plazmi.

Protrombinsko vreme se određuje kod sumnji postojanja avitaminoze K i kod ispitivanja funkcionalnog stanja jetre neke jedinke.

ZADATAK: Odrediti protrombinsko vreme metodom po Quicku.

MATERIJAL: Špric sa iglom, vata, alkohol, 3,8% Na-citrat, tkivni tromboplastin (slani ekstrakt mozga kunića osušenog u acetonu), vodeno kupatilo, epruvete, eza, centrifuga, štoperica.

IZVOĐENJE: U špric od 2 ml sa 0,4 ml Na-citrata uzeti do 2 ml krvi, izmešati i usuti u epruvetu za centrifugiranje (15 minuta na 1.500 obrtaja/minuti), izdvojiti plazmu u posebnu epruvetu i staviti u vodeno kupatilo na 37° C . U posebnoj epruveti usitniti tabletu tromboplastina sa Ca, dodati 2 kapi destilovane vode i dobro izmešati, a onda na to dodati 2,5 ml destilovane vode i ponovo dobro izmešati i ostaviti u vodeno kupatilo (15minuta).

U čistu epruvetu, koja se nalazi u staklenoj čaši sa toplom vodom (37° C), dodati 0,1 ml pripremljenog tromboplastina i odmah pokrenuti štopericu. Sadržaj epruvete stalno mešati ezom do pojave fibrinskih končića (znak da je proces zgrušavanja počeo) i tada zaustaviti štopericu, pročItati i zapisati vreme.

Protrombinsko vreme mereno ovom metodom prosečno iznosi kod konja 18 sekundi, govečeta 28, svinje 16, ovce 15, koze 17, psa 10 sekundi, itd.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivano je protrombinsko vreme kod:

Protrombinsko vreme iznosi:

ZAKLJUČAK:

2.20 Retrakcija koaguluma

Nakon procesa koagulacije dolazi do promena u samom koagulumu u tzv. postfazi procesa koagulacije. Promene koje se dešavaju u koagulumu su sledeće:

- ✓ retrakcija koaguluma i
- ✓ fibrinoliza (razgradnja fibrinskih niti pod dejstvom plazmina koji je nastao aktivacijom plazminogena).

Krvni ugrušak koji se tokom procesa koagulacije formira na rubovima oštećenog tkiva, ili *in vitro* u epruveti i sl., nakon oko jednog sata skoro u potpunosti se retrahuje, tj. stegne i istiskuje serum. Od pravilnosti odvijanja ovog završnog stadijuma veoma mnogo zavisi efikanost čitavog procesa koagulacije, a naročito ako je u pitanju povreda većeg krvnog suda. Tok i obim retrakcije zavisi od:

- ✓ broja trombocita i
- ✓ funkcionalne sposobnosti trombocita.

Dezintegracijom trombocita oslobađa se kontraktilni protein trombastenin, koji je vrlo sličan aktomiozinu mišića. Njegovom kontrakcijom uz razlaganje ATP-a dolazi do retrakcije fibrinskih konaca, oni se skupljaju, a ugrušak se tako retrahira i istiskuje krvni serum. Niža temperatura smanjuje obim retrakcije.

Retrakcija koaguluma kao dijagnostička metoda, znači merenje jačine stiskanja ugruška krvi *in vitro*, a izražava se volumenom istisnutog seruma u procentima.

ZADATAK: Odrediti procenat retrakcije koaguluma.

MATERIJAL: Sterilne igle, špricevi od 10 ml, epruvete graduisane do 5ml, vodeno kupatilo, stakleni štapić sa mrežicom na kraju.

IZVOĐENJE: Iglom u suv i prazan špric od 10 ml venepunkcijom uzeti krv i odmah usuti u dve graduisane epruvete do oznake 5 ml. Odmah u uzorak staviti stakleni štapić sa mrežom. Kada se krv u epruveti zgruša, epruvete staviti u vodeno kupatilo (37° C). Nakon dva sata stajanja, stakleni štapić sa koagulumom se malo izdigne, epruveta malo ukosi narednih 5-10 minuta da bi se iz koaguluma iscedio preostali serum. Potom se stakleni štapić sa koagulumom izvadi, a na graduisanoj epruveti se očita nivo istisnutog seruma.

Iz podataka o volumenu uzete krvi (5 ml) i volumena istisnutog seruma izračuna se retrakcija koaguluma u procentima po formuli:

$$\% \text{ retrakcije} = \frac{\text{volumen istisnutog seruma}}{\text{volumen uzete krvi}} \times 100$$

Kod čoveka procenat retrakcije koaguluma se kreće u rasponu 49-63%, govečeta 25-40%, psa 15-25%.

PROSTOR ZA RAD:

Ispitivana je retrakcija koaguluma kod:

% retrakcije = %

ZAKLJUČAK:

2.21 Automatsko brojanje krvnih ćelija

U kliničkoj praksi sa aspekta hematološke pretrage krvi danas je nezamisliv rad bez automatskih brojača uobličenih elemenata krvi – hematoloških analajzera koji, zavisno od tipa, određuju uži ili širi spektar hematoloških parametara (broj uobličenih elemenata krvi, hematološke indekse, diferencijalnu krvnu sliku...).

Elektronski (automatski) brojači uobličenih elemenata krvi rade na principu dve metode:

- ✓ metoda impedancije i
- ✓ optička metoda.

3.0 Fiziologija imuniteta

Imunitet (od lat. *immunitas* – oloboćen od službe, poreza) je medicinski pojam kojim se označava sposobnost organizma da se odupre i odbrani od infekcija, bolesti ili neke druge biološke ili hemijske opasnosti. Imunitet funkcioniše poput mehanizma čija je uloga uspostavljanje barijera protiv patogena (virusi, bakterije, parazita), kancerogenih ćelija, štetnih molekula i otrova (npr. zmijski). Sveukupni mehanizam odbrane organizma zovemo imuni sistem.

Kad govorimo o imunitetu treba pomenuti njegove specifične i nespecifične komponente. Ne-specifične komponente se ponašaju kao barijere ili eliminatori velikog broja patogena bez obzira na njihovu antigenu sposobnost. Ostale komponente imunog sistema prilagođavaju se (adaptacija) prema svakoj novoj nepoznatoj zarazi, znači, imaju (potencijalnu) sposobnost stvaranja imuniteta za svaku pojedinu vrstu patogena.

Adaptivni imunitet se često deli u dva glavna tipa, u zavisnosti od toga na koji način je uspostavljen imunitet. Prirodno stečeni imunitet se uspostavlja kontaktom sa izazivačem zaraze (odnosi se na "slučajan" kontakt). Veštačko stečeni imunitet se stiče isključivo namernim intervencijama, npr. putem vakcinacije. Dalje, i ova dva tipa se mogu razvrstavati još i prema načinu sticanja imuniteta na imunitet koji je stvoren u samom organizmu (aktivni) i imunitet je prenešen u dati organizam iz već imunog organizma (pasivni).

3.1 Hemoliza izazvana uticajem seruma druge životinjske vrste (serološka hemoliza)

Hemolizu, pored sredstava koja su navedena ranije, mogu izazvati i posebna antitela iz grupe lizina (*hemolizini*) koja se nalaze u krvnom serumu. Hemolizini mogu da se stvaraju u organizmu kao odgovor na unošenje stranih eritrocita i nazivaju se *imunolizini*. Međutim, kod nekih vrsta u serumu postoje hemolizini koje jedinka poseduje već od rođenja. Takva antitela se nazivaju *normolizini*. Poznato je da se u krvnom serumu govečeta nalaze normolizini koji su u stanju da hemoliziraju eritrocite kunića. Ova antitela su složena i sastoje se iz dve komponente: *amboceptor* i *komplement*. Amboceptor je stvarno antitelo, termostabilan je i specifičan (hemolizira samo eritrocite kunića). Komplement je termolabilan (inaktivira ga temperatura od 57° C), nespecifičan je i potreban da bi amboceptor mogao obaviti hemolizu, a nalazi se u svakom svežem serumu. Ako se svež serum sa hemolizinima drži 10-20 minuta na temperaturi od 57° C, komplement će kao termolabilan biti razoren, a termostabilni amboceptor će na toj temperaturi ostati nepromenjen. Takav serum se označava kao inaktiviran, tj. nesposoban da deluje hemolitički. Međutim, on postaje opet sposoban za hemolizu (aktivira se) ako mu se doda malo svežeg normalnog seruma, pošto ovaj sadrži komplement, tj. došlo je do »kompletiranja« antitela.

ZADATAK: Dokazati napred navedene tvrdnje.

MATERIJAL: Suspenzija eritrocita kunića u 1% rastvoru NaCl, svež goveđi serum, inaktiviran goveđi serum (zagrevanjem 20 minuta na 57° C), svež serum kunića ili neke druge vrste, stalak sa tri epruvete, pipete, kapaljka, vodeno kupatilo.

IZVOĐENJE: U tri epruvete usuti po 5ml 1% rastvora NaCl, a zatim po sledećem protokolu dodati:

1. epruveta: 2 ml svežeg goveđeg seruma,
2. epruveta: 2 ml inaktivisanog goveđeg seruma
3. epruveta: 2 ml inaktivisanog goveđeg seruma + 2 ml svežeg seruma kunića (ili neke druge vrste)

Svakoj epruveti dodati po tri kapi suspenzije eritrocita kunića, promešati i staviti pola sata u vodeno kupatilo (38° C). Zabeležiti i prokomentarisati dobijene rezultate.

PROSTOR ZA RAD:

1. epruveta:
2. epruveta:
3. epruveta:

ZAKLJUČAK:

3.2 Određivanje krvnih grupa

Krvne grupe su najbolje proučene kod ljudi s obzirom na njihov značaj u medicinskoj praksi i kliničkim, genetskim i sudsko-medicinskim istraživanjima. Međutim, u poslednje vreme učinjen je veliki napredak u istraživanju krvnih grupa kod domaćih životinja, ne samo zbog primene transfuzije krvi u veterinarskoj medicini, nego još mnogo više zbog činjenice da krvne grupe imaju veliki značaj za izučavanje teorijskih i praktičnih problema genetike i selekcije domaćih životinja.

Već odavno je zapaženo da životinje najčešće uginu ako se za transfuziju koristi krv druge vrste (heterologa transfuzija). Slični incidenti mogu da se dese i prilikom transfuzije krvi iste vrste (homologa transfuzija). Objašnjenja za ove pojave dao je 1900. godine Landsteiner. Zapazio je da krvni serumi nekih njegovih kolega aglutiniraju eritrocite krvi drugih kolega. Proučavajući ovu pojavu utvrdio je postojanje kod ljudi

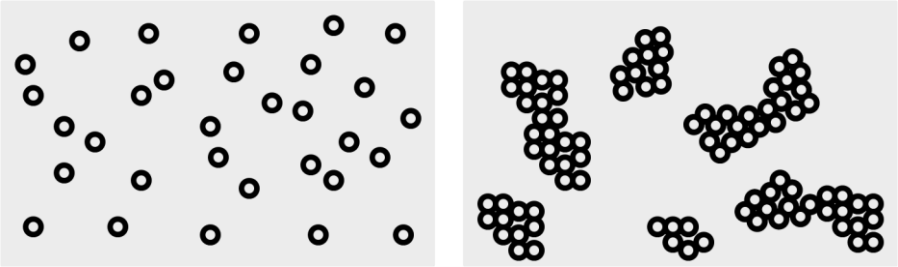
AB0 krvnih grupa (0 = nulta krvna grupa) i normalno prisustvo u krvi anti-A i anti-B antitela. Obim saznanja o krvnim grupama kod čoveka i domaćih životinja je do danas znatno uvećan, a savremeni aspekti njihovog izučavanja su bitno prošireni.

Membrana eritrocita kod čoveka sadrži mnoštvo proteinskih molekula među kojima se njih oko 30 odlikuje velikom antigenošću i imunogenošću. Dve skupine antigena u membrani eritrocita mnogo češće izazivaju transfuzijske reakcije od ostalih i nazivaju se AB0 sistem i Rh sistem. Kod domaćih životinja postoji više sistema krvnih grupa što njihovo izučavanje i određivanje čini mnogo složenijim nego kod ljudi.

3.2.1 AB0 sistem krvnih grupa

Prisustvo antigena A i antigena B na membrani eritrocita čini eritrocite pogodnim za aglutinaciju i označavaju se kao *aglutinogen A* i *aglutinogen B*. Antitela koja izazivaju aglutinaciju dobila su naziv *aglutinini* (*normoaglutinini*) i pripadaju klasi M imunoglobulina.

Aglutinacija je manifestacija antigen-antitelo reakcije, koja se karakteriše sakupljanjem ćelija u aglomerate koji se talože zbog slabljenja stabilnosti suspenzije. Aglomerati se mogu videti pod mikroskopom, a nekada i golim okom (slika 3.1).



Slika 3.1: Reakcija aglutinacije eritrocita

(levo – negativna, desno – pozitivna)

U sistemu AB0 krvnih grupa ljudi naziv krvne grupe daje aglutinogen prisutan na membrani eritrocita. Eritrociti jedne osobe mogu imati jedan od dva aglutinogena (krvna grupa A, krvna grupa B), oba (krvna grupa AB) ili nijedan (krvna grupa 0). U krvnom sistemu se nalaze antitela, odnosno aglutinini anti-A i/ili anti-B, ali kod jedne osobe nikad zajedno sa odgovarajućim aglutinogenom. Krvne grupe AB0 sistema su različito zastupljene u populaciji.

Određivanje krvnih grupa kod ljudi temelji se na principu aglutinacije eritrocita sa poznatim aglutininima u test serumima. Koriste se test serumi krvne grupe A (anti-B aglutinini), krvne grupe B (anti-A aglutinini) i kao kontrola test serum krvne grupe 0 (anti-A i anti-B aglutinini).

Test aglutinacije se vrši na posebnoj porcelanskoj pločici sa tri udubljenja sa oznakama krvnih grupa iznad udubljenja (s leva na desno: A, B, 0) ili na običnom predmetnom staklu. Mešanjem eritrocita ispitivane krvi sa test serumima krvnih grupa A, B i 0 ustanovljava se kojoj krvnoj grupi pripada ispitivana krv.

ZADATAK: Odrediti krvnu grupu AB0 sistema.

MATERIJAL: Vata, alkohol, sterilne igle ili lancete, porcelanske pločice ili predmetna stakla, mikroskop, test serumi krvnih grupa A, B i 0.

IZVOĐENJE: U udubljenja pločice kapaljkom staviti po dve kapi odgovarajućeg test-seruma po sledećem protokolu:

- ✓ udubljenje A - test serum krvne grupe A (anti-B),
- ✓ udubljenje B - test serum krvne grupe B (anti-A) i
- ✓ udubljenje 0 - test serum krvne grupe 0 (anti-A i anti-B).

Dezinfikovati jagodicu prsta, sterilnom iglom (ili lancetom) izvršiti ubod i sa tri različita ugla čistog i suvog predmetnog stakla preneti po malo krvi posebno u svako udubljenje na pločici.

Laganim pomicanjem i naginanjem pločice izmešati uzorak krvi i test-serume, sačekati 3 do 5 minuta i osmotriti u kojim udubljenjima postoji aglutinacija, uočljiva čak i golim okom.

Za kontrolu je dobro uzeti na predmetno staklo po jednu kap sadržaja iz svakog udubljenja pločice pa pod mikroskopom potvrditi nalaz aglutinacije. U zavisnosti od toga kojoj krvnoj grupi pripada krv ispitanika, moguća su četiri rezultata.

Univerzalni davaoc je termin koji se koristi za osobe koje imaju 0 krvnu grupu, zato što eritrociti ove krvne grupe nemaju aglutinogene na membrani svojih eritrocita.

Univerzalnim primaocem se označavaju osobe AB krvne grupe, zato što se u krvi ovih jedinki ne nalaze aglutinini anti-A i anti-B.

PROSTOR ZA RAD:

Reakcija sa serumom krvne grupe A:

Reakcija sa serumom krvne grupe B:

Reakcija sa serumom krvne grupe 0:

Ispitivana krv je krvne grupe:

3.2.2 Rh sistem krvnih grupa

Pored podele na AB0 grupe, postoji i rezus faktor (Rh faktor), koji je dobio naziv po Rezus majmunu kod koga je i prvi put otkriven. Svi ljudi se dele na Rh^+ (*rh pozitivne*) i Rh^- (*rh negativne*). Ljudi sa Rh^+ krvlju stvaraju rezus protein, dok ga ljudi sa Rh^- krvlju ne stvaraju. Postoji više ovih antigena (C, D, E, c, d, e), a najveću antigenost i imunogenost posjeduje D-antigen.

Pri transfuziji, pored AB0 sistema krvnih grupa, pazi se i na ovaj faktor. Krvna grupa 0^- je univerzalni davalac jer, pored toga što ne sadrži ni jedan od dva aglutinogena, ona ne sadrži ni rezus protein. Shodno tome, AB^+ krvna grupa je univerzalni primalac jer sadrži sva tri antigena, a ne sadrži antitela protiv ovih antigena.

U sistemu AB0, aglutinini koji izazivaju transfuzione reakcije stvaraju se spontano, dok se u Rh sistemu aglutinini gotovo nikada ne stvaraju spontano. Umesto toga, osoba mora biti jako izložena Rh-antigenima, obično transfuzijom krvi ili kada buduća Rh-negativna majka nosi plod sa tim antigenom. Kod trudnoće, Rh faktor se nasleđuje po sistemu dominantno-recesivnog nasleđivanja. Ako je majka Rh^-, postoji šansa od 50% do 100% da će dete biti Rh^+ (pod uslovom da je otac Rh^+). Tokom porođaja, fetusna krv može da dođe u kontakt sa krvlju iz placente i kada reaguju, može da se pokrene stvaranje imunog odgovora kod majke. Majka će posle porođaja neminovno stvoriti antitela (imunoglobulini klase G) i trajno će doći do promene imuniteta. Ova antitela mogu proći kroz placentu i ugroziti plod u narednim trudnoćama. U veterinarskoj medicini ovaj problem nije izražen zato što, zbog građe placente, imunoglobulini ne mogu proći u krvotok fetusa već se unose putem kolostruma.

ZADATAK: Odrediti Rh faktor.

MATERIJAL: Vata, alkohol, sterilne igle ili lancete, porcelanske pločice ili predmetna stakla, mikroskop, test serum Rh^- krvne grupe (anti-D).

IZVOĐENJE: Izvođenje i tumačenje rezultata kao i kod određivanja krvnih grupa u AB0 sistemu.

PROSTOR ZA RAD:

Reakcija sa serumom Rh^- krvne grupe: _____

Ispitivana krv je Rh:

ZAKLJUČAK:

3.2.3 Sistemi krvnih grupa kod životinja

Zna se da postoji visoka korelacija između pripadnosti jedinke jednom tipu krvne grupe i nekih osobina značajnih za selekciju. Zbog toga se određivanje krvnih grupa kod domaćih životinja, pored izbegavanja transfuzijskih reakcija, koristi za isključivanje roditeljstva (ne za dokazivanje) i u selekciji životinja na plodnost, određene proizvodne osobine, otpornost prema bolestima (mastitis, leukoza i dr.). Zbog velikog broja sistema krvnih grupa kod pojedinih vrsta domaćih životinja, moguće je izvršiti testiranje kompatibilnosti krvnih grupa davaoca i primaoca krvi – unakrsni test. U ovom slučaju se ne određuje sama krvna grupa već samo da li će doći do transfuzijske reakcije. Ovaj test se koristi i u humanoj medicini, nakon određivanja krvnih grupa, u cilju utvrđivanja postojanja prisustva drugih antigena koji mogu izazvati transfuzijsku reakciju. Unakrsni test se izvodi tako što se mala količina krvnog seruma primaoca pomeša sa malom količinom eritrocita davaoca, a zatim se pod mikroskopom posmatra da li je došlo do aglutinacije.

ZADATAK: Izvršiti testiranje kompatibilnosti krvnih grupa (unakrsni test) kod pasa.

MATERIJAL: Pribor za uzimanje krvi, centrifuga, pipete, epruvete, kapaljka, porcelanske pločice ili predmetna stakla, mikroskop.

IZVOĐENJE: Venepunkcijom uzeti krv od psa i izdvojiti krvni serum (postupak je opisan vežbi dobijanja krvne plazme i seruma). Na porcelansku pločicu ili predmetno staklo preneti dve kapi krvnog seruma. U serum dodati malo krvi ili suspenzije eritrocita drugog psa. Sačekati 3 do 5 minuta i osmotriti u kojim udubljenjima postoji aglutinacija, uočljiva čak i golim okom. Za kontrolu uzeti na predmetno staklo jednu kap sadržaja i pod mikroskopom potvrditi nalaz aglutinacije. Prisustvo aglutinacije ukazuje na nekompatibilnost krvnih grupa.

PROSTOR ZA RAD:

Reakcija sa serumom:

ZAKLJUČAK:

4.0 Fiziologija kardiovaskularnog sistema

Srce sa krvnim sudovima – arterijama, kapilarima i venama – predstavlja zsatvoreni sistem u kome neprekidno kruži krv potiskivana snagom srčanih kontrakcija. Cirkulatorni sistem se može posmatrati kao transportni sistem koji, putem krvi, kontinuirano doprema kiseonik i hranljive materije do tkiva i svih ćelija organizma, odvodi CO_2 i druge produkte metabolizma do pluća i bubrega, raznosi po organizmu hormone i druga biološki aktivna jedinjenja koja regulišu funkcionalnu aktivnost ćelija.

Kretanje krvi u zatvorenom sistemu krvnih sudova (hemodinamika) determinisano je sa tri osnovne veličine ili parametra:

- ✓ protok,
- ✓ pritisak i
- ✓ otpor.

Protok predstavlja količinu krvi koja prođe kroz neko mesto u cirkulaciji izraženu u ml/minuti ili L/sat. Ukupni protok krvi u cirkulatornom sistemu u toku jednog minuta naziva se minutni volumen srca. Protok krvi određuju druga dva parametra: razlika pritisaka između početnog i završnog dela krvnog suda (gradijent pritiska) i otpor proticanju krvi.

Krvni pritisak je sila kojom krv deluje na jedinicu površine zida krvnog suda i izražava se u milimetrima živinog stuba (mmHg), odnosno u kilopaskalima (kPa).

Otpor je sila koja se protivi toku krvi i zavisi od dužine i prečnika krvnog suda, kao i od viskoznosti krvi.

Na osnovu morfoloških i funkcionalnih karakteristika cirkulacija se deli na *sistemsku cirkulaciju* (*veliki krvotok*) i *plućnu cirkulaciju* (*mali krvotok*).

Srce snažnim ritmičkim kontrakcijama pod znatnim pritiskom ubacuje arterijsku krv u početni deo aorte, a vensku u plućnu arteriju, čime se ostvaruje dovoljno veliki gradijent pritiska između početnog i završnog dela velikog i malog krvotoka. Zahvaljujući gradijentu pritiska, krv neprekidno kruži kroz sistem krvnih sudova krećući se iz dela krvotoka sa višim pritiskom ka segmentima sa nižim pritiskom. Srčani zalisci (atrioventrikularni i semilunarni), kao i zalisci u nekim venama, obezbeđuju jednosmerno kretanje krvi u kardiovaskularnom sistemu. Srce predstavlja centralni, motorni deo kardiovaskularnog sistema. Leva i desna srčana komora za vreme sistole istisnu prispelu krv u aortu, odnosno plućnu arteriju, puneći se iznova za vreme dijastole. Za kontrakcije srčanog mišića i pravilnu funkciju srca kao pumpe veoma su važne fiziološke osobine srca:

- ✓ ponašanje po zakonu „sve ili ništa“ (na pražni nadražaj srčani mišić reaguje maksimalno),
- ✓ refraktarnost u toku cele sistole (miokard je nepodražljiv na ekstra nadražaje),
- ✓ Franck-Starlingov zakon (snaga i veličina kontrakcije miokarda proporcionalna je početnoj dužini mišićnih vlakana, odnosno stepenu punjenosti komora krvlju),
- ✓ automatizam rada je posebna fiziološka karakteristika srca koja se ogleda u sposobnosti srca da se kontrahuje i u uslovima kada se nalazi van organizma.

Nosilac automatizma srčanog rada je sistem za stvaranje i sprovođenje impulsa (SSSI) koji se nalazi u strukturama srčanog mišića a sastoji se od specijalizovanih mišićnih vlakana (Purkinijeva vlakna).

Sinoatrijumski (SA, Keith-Flackov) čvor kod sisara predstavlja malu skupinu Purkinijevih vlakana u zidu desne predkomore ispod i medijalno od ušća gornje šuplje vene. Kod žabe se nalazi u proširenju vene pri predkomorama (venozni sinus). Glavna karakteristika ovih ćelija je da im se membrana spontano depolariše bez nadražaja van srca i iz tog razloga ova skupina se još naziva biološki pesmejker jer sa ovog mesta počinje širenje talasa depolarizacije kroz čitav sistem srčanog mišića nakon čega sledi kontrakcija miokarda. Dakle, SA čvor je predvodnik srčanog ritma ili primarni centar automatizma.

Atrioventrikularni (AV, Aschoff-Tawarin) čvor ili sekundarni centar automatizma srca nalazi se u zidu desne komore sasvim blizu fibrozne pregrade koja razdvaja predkomore od komora. Uloga AV čvora je dvostruka: provođenje impulsa sa predkomora na komore i usporavanje (kočenje) prenošenja impulsa u trajanju od 0,1 sekunde što omogućava da se sistola predkomora završi pre nego što počne sistola komora. Treća,moguća uloga AV čvora je preuzimanje predvodnika ritma u slučajevima prestanka aktivnosti SA čvora.

Hisov snop predstavlja masivan snop Purkinijevih ćelija (vlakana) koji se pruža od AV čvora i odmah na početku međukomorne pregrade grana se na levu i desnu granu sve do vrha srca, a zatim se nastavljaju u razgranat sistem Purkinijevih vlakana koja se završavaju na mišićnim vlaknima miokarda zida komora.

U normalnim uslovima ritmičke kontrakcije srčanog mišića odvijaju se pod dejstvom električnih nadražaja koji spontano nastaju u SA čvoru. Ovaj sopstveni automatizam i ukupni rad srca prilagođava se potrebama organizma. U protivnom, srce će uvek raditi približno istom frekvencom, bez obzira da li je organizam u stanju mirovanja ili nekog fizičkog naprezanja.

Srce sisara izolovano iz organizma može da nastavi da se kontrahuje dugo vremena ako se postavi u komoru sa posebnim uslovima u pogledu temperature, koncentracije kiseonika kao i stalnog protoka fiziološkog rastvora složenog sastava kroz velike koronarne krvne sudove. Izolovano srce žabe ne zahteva neke posebne uslove;

dovoljno je obezbediti stalnu perfuziju fiziološkog rastvora jednostavnog sastava – Ringerov rastvor za žabe (sastav je dat u tabeli 4.1) da bi srce nastavilo sa kontrakcijama i više od jedn og sata nakon izolacije (to će biti zapaženo tokom narednih vežbi). Ova fiziološka osobina je posledica sposobnosti srca da samo stvara impulse za svoj rad.

Žaba predstavlja pogodan objekat za izvođenje ogleda na srcu, što će tokom narednih vežbi omogućiti demonstraciju i dokazivanje određenih fizioloških svojstava srca. Budući da se ogledi izvode na izolovanom žabljem srcu *in situ* ili potpuno izolovanom srcu, potrebno je poznavati osnovne morfološke karakteristike srca žabe. Srce žabe se sastoji iz dve pretkomore i jedne komore; SA čvor se nalazi u zidu sinus venosus-a (sjedinjenje vena u proširenje pre ulaska u desnu predkomoru).

Tabela 4.1: Ringerov rastvor za žabe

Sastojak	**Procentualo učešće**
NaCl	0,65%
KCl	0,02%
$CaCl_2$	0,02%
Destilovana voda	do 100%

4.1 Narkoza žabe

Humani rad sa laboratorijskim životinjama je jedan od osnovnih postulata u radu sa njima, a ujedno predstavlja i moralnu i zakonsku obavezu. Ovo podrazumeva primenu narkoze u cilju sprečavanja izlaganja nepotrebnoj patnji, bolu i stresu. Ova procedura ujedno omogućava i lakši rad i manipulaciju sa laboratorijskim životinjama.

Po završetku ogleda, ukoliko je telesni integritet trajno narušen ili to zahteva protokol ogleda potrebno je izvršiti eutnaziju laboratorijske životinje.

ZADATAK: Izvršiti narkozu žabe.

MATERIJAL: Žaba, etar, vata, tegla, 10% rastvor uretana, špric sa iglom, laboratorijski sat.

IZVOĐENJE: Staviti žabu u običnu staklenu teglu, ubaciti vatu dobro natopljenu etrom, a zatim poklopiti. Kada je žaba postala nepokretna (adinamija ekstremiteta) znači da je narkotisana. Konstatovati koliko je vremena bilo potrebno da se žaba uvede u narkozu.

Narkoza se može izvesti i ubrizgavanjem 1ml 10% rastvora uretana u dorzalnu limfnu kesu.

Skicirati postupak sa modela:

PROSTOR ZA RAD:

Narkoza je izvršena pomoću:

Vreme potrebno za narkozu žabe:

ZAPAŽANJA:

4.2 Posmatranje krvotoka u pokožici za plivanje i jeziku žabe

Metoda mikroskopskog posmatranja mikrocirkulacije *in vivo* ima veliki značaj u proučavanju funkcije ovog važnog područja cirkulacije. Na ovaj način je moguće pratiti promene lumena malih krvnih sudova (arteriola, kapilara, venula) pod uticajem različitih faktora (humoralni i nervni uticaji, lokalno delovanje toplote, itd.).

ZADATAK: Posmatrati mikroskopom krvotok u pokožici za plivanje i jeziku žabe.

MATERIJAL: Žaba, etar, vata, tegla, daščica (ploča) za fiksiranje i prepariranje, konci za fiksiranje, mikroskop, metalni stativ sa držačem, predmetno staklo sa prstenom od plute, čiode, Ringerov rastvor, kapaljka.

IZVOĐENJE: Etrom lagano narkotisanu žabu fiksirati na pločicu u trbušnom položaju tako da je jedan zadnji ekstremitet slobodan. Pokožicu za plivanje između dva prsta slobodnog ekstremiteta razapeti čiodama na prsten od plute prilepljen na predmetno staklo i posmatrati pod mikroskopom sa uvećanjem objektiva 10X. U slučaju da se strujanje krvi u krvnim sudovima ne uočava, treba pokožicu malo olabaviti. Tokom posmatranja povremeno pokožicu navlažiti nakapavanjem Ringerovog rastvora sobne temperature.

Sva Zapažanja u toku posmatranja potrebno je opisati i to u pogledu razlikovanja pojedinih krvnih sudova, brzine kretanja krvi u središnjim delovima krvnog suda u odnosu na periferne delove (uz zid suda), razlikovati eritrocite od krvne plazme, itd.

PROSTOR ZA RAD:

Skicirati sa modela i obležiti:

ZAPAŽANJA:

ZADATAK: Posmatrati mikroskopom krvotok u jeziku žabe.

MATERIJAL: Žaba, etar, vata, tegla, daščica (ploča) za fiksiranje i prepariranje, konci za fiksiranje, mikroskop, metalni stativ sa držačem, predmetno staklo sa prstenom od plute, čiode, Ringerov rastvor, kapaljka.

IZVOĐENJE: Skinuti pokožicu za plivanje i pincetom izvući jezik (koren jezika se kod žabe nalazi na prednjem kraju usne šupljine) i razapeti ga na prsten od plute i ponoviti posmatranje. Zatim na preparat staviti 2-3 kapi Ringerovog rastvora zagrejanog na temperaturu od oko 40°C i pratiti koje promene se dešavaju na posmatranim krvnim sudovima.

PROSTOR ZA RAD:

Skicirati sa modela i obležiti:

ZAPAŽANJA:

4.3 Priprema preparata žabljeg srca in situ

Srčani rad može biti modifikovan mnogobrojnim faktorima (lekovi, temperatura, dejstvo pojedinih jona, itd.) čiji se efekat najčešće ispoljava promenom srčane frekvencije ili snage kontrakcije. Ove promene najjednostavnije je registrovati na kimografu, na koji se pokreti srca prenose pomoću specijalne poluge za registrovanje.

Isprepariranti neki organ *in situ* (u ovom slučaju radi se o srcu žabe) znači izvršiti određene hirurške zahvate da bi se pristupilo organu i pripremti ga za izvođenje određenog ogleda, a da pritom taj organ (srce) i dalje bude u svom anatomskom položaju i morfološko-funkcionalnoj vezi sa organizmom.

ZADATAK: Pripremiti preparat žabljeg srca *in situ*. Razlikovati osnovne morfološke karakteristike i odrediti srčanu frekvenciju.

MATERIJAL: Žaba, etar, vata, tegla, ploča i konci za fiksiranje, pincete, makaze (manje i veće), Ringerov rastvor, kapaljka.

IZVOĐENJE: Narkotisati žabu i fiksirati je u leđni položaj na ploču za fiksiranje. U predelu ksifoidnog završetka na grudnoj kosti pincetom podići kožu i makazama je proseći. Zatim rez proširiti ka spoljašnjim uglovima donje vilice i tako isečeni trouglasti deo kože prebaciti preko donje vilice i otseći. Pre nastavka rada potrebno je dobro oprati ruke i instrumente jer sekret kože deluje štetno na tkiva.

Skicirati postupak sa modela:

Zatim se na isti način odstrane i mišići i kosti na tom delu (ključne kosti moraju se preseći jer otvor treba da ide preko njih). Kroz tako načinjen otvor videće se srce

obavijeno perikardom. Perikard se pažljivo uhvati pincetom, preseče makazicama i skloni sa srca, pazeći da se srce ne ošteti. Da bi se srce potpuno oslobodilo, potrebno je preseći frenulum (*plica pro bulbi*) koja se uočava kad se vrh srca pincetom malo podigne. Frenulum treba podvezati končićem blizu srca i preseći tako da ligatura ostane uz srce. Tako oslobođeno srce posmatrati: razlikovati venski sinus, pretkomore, komoru, truncus arteriozus koji izlazi iz komore, ritmički rad srca. Broj srčanih kontrakcija u minuti obično se kraće i jednostavnije naziva *srčana frekvencija* (srčana frekvencija žabe je oko 40 otkucaja u minuti).

Skicirati postupak sa modela:

Povremeno po srcu nakapati nekoliko kapi Ringerovog rastvora. Preparat pripremljen na ovaj način će biti korišćen za izvodjenje nekoliko ogleda na vežbama.

PROSTOR ZA RAD:

Frekvencija srčanog rada je: /min

ZAPAŽANJA:

4.4 Uticaj temperature na frekvenciju srčanog rada

Srčana frekvencija znatno varira, kako obzirom na životinjsku vrstu, tako i individualno. Poznato je da promena temperature organizma dovodi do promene srčane frekvencije. Povišena temperatura ubrzava enzimske procese i difuziju jona, pri čemu se skraćuje vreme nastanka impulsa u SA čvoru i ubrzava prostiranje impulsa kroz provodni sistem. Sa tim u vezi, povišena telesna temperatura izaziva *tahikardiju* (povećanje srčane frekvencije), a snižena temperatura izaziva *bradikardiju* (smanjenje frekvencije).

ZADATAK: Na žabljem srcu *in situ* prikazati uticaj hladnog i toplog Ringerovog rastvora na srčanu frekvenciju.

MATERIJAL: Žaba, vata, etar, tegla, ploča i konci za fiksiranje, makaze, pincete, Ringerov rastvor zagrejan na oko 40°C, rashlađen Ringerov rastvor (bočica sa Ringerovim rastvorom u posudi sa ledom), filter papir, kapaljke, poluga za registrovanje, stativ, kimograf.

Kimograf je uređaj pomoću kojeg se može vršiti registrovanje mehaničkih događaja (srčani rad, mišićna kontrakcija i sl.). Mehanički događaji se registruju na valjku kimografa (nagaravljeni valjak ili obložen papirom) pomoću poluge sa pisačem. Valjak se okreće (brzina se može podešavati) pomoću elektro-motora ili navijanjem opruge pa se zapis može praviti tokom određenog vremenskog perioda.

IZVOĐENJE: Ispreparirati žablje srce *in situ*. Na vršak srca ubosti udicu ili staviti metalnu štipaljku sa koncem koji je u vezi sa polugom za registrovanje koju treba prisloniti uz doboš kimografa (obezbediti sporo obrtanje doboša).

Skicirati postupak sa modela:

Pre ispitivanja uticaja hladnog i toplog Ringerovog rastvora na srčanu frekvenciju potrebno je izvršiti registrovanje normalnog rada srca i odrediti srčanu frekvenciju. Zatim kapaljkom naneti po 2-3 kapi prvo hladnog a zatim toplog Ringerovog rastvora na komoru (pre ogleda postaviti oko srca na granici izmedju pretkomora i komore filter papir u cilju sprečavanja kontakta Ringerovog rastvora sa venoznim sinusom). Izvršiti zapis i brojanje frekvencije, te sve ponoviti delujući hladnim i toplim Ringerovim rastvorom na venozni sinus.

PROSTOR ZA RAD:

Srčana frekvencija pre aplikacije hladnog i toplog Ringerovog rastvora:

Srčana frekvencija nakon aplikacije hladnog Ringerovog rastvora na komoru:

Srčana frekvencija nakon aplikacije toplog Ringerovog rastvora na komoru:

Srčana frekvencija nakon aplikacije hladnog Ringerovog rastvora na venozni sinus:

Srčana frekvencija nakon aplikacije toplog Ringerovog rastvora na venozni sinus:

ZAKLJUČAK:

4.5 Stanijusove ligature

Automatizam srčanog rada ispitivao je Stanijus postavljajući podveze (ligature) na srcu žabe. Ako se na prelazu venoznog sinusa u desnu pretkomoru postavi i zategne ligatura (*prva Stanijusova ligatura*) sprečava se širenje impulsa iz venoznog sinusa (SA čvor) u ostale delove srca; pretkomore i komora prestaju sa radom izvesno vreme, a zatim započinje sa kontrakcijama, ali manjom frekvencijom. Ukoliko se odmah posle prve postavi i druga ligatura na atrioventikularnoj granici (*druga Stanijusova ligatura*), pretkomore i dalje miruju u dijastoli, a komora započinje sa radom ali sa manjom frekvencijom. Sa obe ligature venozni sinus i komora srca se kontrahuju različitom frekvencijom, dok pretkomore miruju jer je mehanički sprečeno širenje impulsa.

Prvom Stanijusovom ligaturom se izoluje primarni centar (SA čvor) od ostalog dela srca, a drugom ligaturom mehanički se draži sekundarni centar (AV čvor). Dakle, ovim ogledom se dokazuje lokalizacija i hijerarhijski poredak elemenata sistema za stvaranje i provođenje impulsa u srcu.

ZADATAK: Prvom i drugom Stanijusovom ligaturom dokazati mesta u srcu u kojima se nalaze centri za stvaranje impulsa.

MATERIJAL: Sav pribor potreban za preparaciju žabljeg srca *in situ*, kimograf, poluga za registrovanje, Ringerov rastvor, kapaljka, konac.

IZVOĐENJE: Žablje srce *in situ* spojiti sa polugom za registrovnje kao u prethodnoj vežbi. Registrovati normlne kontrakcije i zapisati frekvenciju.

Provući konac oko venoznog sinusa uz samu granicu sa desnom pretkomorom i zategnuti ligaturu (prva Stanijusova ligatura): pretkomore i komora prestaju sa kontrakcijama, mada sinus i dalje pulsira. Na dobošu kimografa ocrtava se ravna linija.

Za dokaz da srce nije izgubilo sposobnost kontrahovnja, nego je samo prestalo da dobija impulse, nadražiti ga mehanički (bocnuti ga vrhom igle) pri čemu odmah reaguje

jednom sistolom. Već je rečeno da će srce nakon izvesnog vremena početi ponovo da se kontrahuje, što znači da pored sinusa postoji i neko ponovo drugo mesto koje je sedište centra za automatski rad srca.

Da bi se odredilo gde se to mesto nalazi, posle prve ligature postaviti drugu ligaturu na atrioventikularnoj granici u spoljašnjem žlebu koji se uočava. Druga Stanijusova ligatura se zateže postepeno do onog momenta kada srce počinje ponovo da radi jer je mehanički nadražen AV čvor. Odrediti broj kontrakcija u minutu i zapisati rezultate.

Skicirati postupak sa modela:

PROSTOR ZA RAD:

Zapažanja nakon postavljanja prve Stanijusove ligature:

Zapažanja nakon postavljanja druge Stanijusove ligature:

ZAKLJUČAK:

4.6 Uticaj draženja nervusa vagusa na rad srca

Prilikom preparacije izolovanog žabljeg srca dokazano je da je srce automatski organ tj. da ono stvara vlastite impulse za kontrakciju. Međutim, u organizmu postoji niz mehanizama (humoralnih i nervnih) pomoću kojih se vrši stalno regulisanje frekvencije i snage kontrakcije srčanog mišića. Zadatak ovih mehanizama sastoji se u tome da oni osiguraju pravilnu koordinaciju i podešavanje rada srca prema potrebama organizma kao celine i pojedinih njegovih delova.

Nervnu kontrolu rada srca vrši vegetativni nervni sistem putem nervnih vlakana simpatikusa (*nervi accelerantes cordis* – potiču najvećim delom iz *gangliona stelatuma*) i parasimpatikusa (grane vagusnog nerva – *rami cardiaci nervi vagi*). Nervni centri za vršenje ovih funkcija smešteni su u produženoj moždini: *kardioakceleratorni* i *kardioinhibitorni centri*.

Srčani mišić, kao i drugi unutrašnji organi, dobro je inervisan od strane simpatikusa i parasimpatikusa. Simpatikusna nervna vlakna inervišu sve strukture srčanog mišića, počevši od centara za stvaranje i provođenje impulsa, pa do svake ćelije miokarda pretkomora i komora. Parasimpatikusna nervna vlakna inervišu određene strukture u srcu: ogranci desnog vagusa inervišu ćelije SA čvora, a ogranci levog vagusa AV čvor i miokard pretkomora, dok u strukturama miokarda komora nema ogranaka vagusnih nerava. Mehanizam regulacije se sastoji u simulaciji (simpatikus) ili inhibiciji (parasimpatikus) biofizičkih, odnosno biohemijskih procesa u miokardu koji su odgovorni za rad srca.

Stimulativno dejstvo simpatikusa na srce, kao rezultat draženja simpatikusnih vlakana, ispoljava se u sledećim efektima:

- ✓ ubrzava se stvaranje impulsa u centrima srčanog automatizma, naročito u SA čvoru, usled čega se povećava frekvencija srčanog rada – tahikardija (*pozitivno hronotropno dejstvo*),
- ✓ pojačava se snaga kontrakcija miokarda pretkomora i komora (*pozitivno inotropno dejstvo*),
- ✓ povećava se razdražljivost miokarda *(pozitivno batmotropno dejstvo*) i
- ✓ povećava se brzina provođenja impulsa i skraćuje vremenski razmak između kontrakcija pretkomora i komora (*pozitivno dromotropno dejstvo*).

Podražavanjem vagusa dobijaju se suprotni efekti: *negativno hronotropno, inotropno, batmotropno i dromotropno dejstvo*.

U uslovima koje je moguće obezbediti na vežbama moguće je uočiti i registrovati efekte draženja vagusa na rad srca kao negativno hronotropno dejstvo (bradikardija) i donekle kao negativno inotropno dejstvo (smanjivanj snage srčane kontrakcije – manja amplituda zapisa na kimografu). Podražavanje vagusa je moguće izvesti refleksnim draženjem (Goltzov ogled) i direktnom stimulacijom vagusa učestalim nadražajima - pomoću elektrostimulatora.

ZADATAK: Izvesti Goltzov ogled i direktno draženje *n. vagusa* na žabljem srcu *in situ*.

MATERIJAL: Sve što je potrebno za preparaciju žabljeg srca *in situ*, kimograf, poluga za registrovanje, elektrostimulator ili indukcioni aparat za učestale podražaje, iglaste elektrode (čiode), stakleni štapić.

Elektrostimulator je uređaj kojim se može vršiti nadraživanje različitih struktura (mišićno tkivo, nervi). Elektrostimulatorom se mogu aplikovati električni impulsi različitog intenziteta (voltaže) i učestalosti (pojedinačni, frekventni).

IZVOĐENJE: Žablje srce *in situ* spojiti sa polugom za registrovanje, pri sporom okretanju doboša kimografa registrovati i zapisati broj kontrakcija u minuti. Zatim izvršiti nekoliko kratkih i oštrih udaraca staklenim štapićem po zidu abdomena žabe (Goltzov ogled) i konstatovati smanjenje frekvencije srčanog rada usled refleksnog podražavanja *n. vagusa*. U ovom ogledu mehanički se nadražuju receptori u peritoneumu sa kojih se simpatikusnim vlaknima nastali impulsi prenose na kardioinhibitorni centar, a zatim preko vagusa do srca.

Drugi deo vežbe izvodi se direktnim draženjem ogranka vagusa frekventnim nadražajima pomoću elektrostimulatora ili indukcionog aparata sa tankim provodnicima, a kao elektrode mogu poslužiti dve obične čiode. Jednu čiodu ubosti u tkivo iznad luka aorte, a drugu sa desne strane – lateralno i iznad *sinus venozusa*. Pri sporom okretanju kimografa registrovati normalan rad srca, odrediti frekvenciju i izvršiti podraživanje frekventnim nadražajima. Treba konstatovati smanjenje frekvencije srčanog rada ili, potpuno zaustavljanje rada srca. Nakon prekidanja draženja, inhibitorni efekat draženja vagusa (negativno hronotropno dejstvo) traje još izvesno vreme, posle čega srce počinje ponovo da se kontrahuje, ali u početku smanjenim ritmom. Nekad se može desiti da se ovim postupkom draženja postigne suprotan efekat. U tom slučaju treba promeniti položaj elektroda i ponoviti ogled.

PROSTOR ZA RAD:

Zapažanja pri indirektnom draženju *n. vagusa*:

Zapažanja pri direktnom draženju *n. vagusa*:

ZAKLJUČAK:

4.7 Refraktarnost srčanog mišića i ekstrasistola

U normalnim uslovima srce se kontrahuje ritmički pod uticajem impulsa iz primarnog centra (SA čvor). Ukoliko u toku njegove kontrakcije (sistole) u srce dospe vanredni nadražaj (ekstranadražaj), ono neće reagovati kontrakcijom, što ga razlikuje od skeletnog mišića. Prema tome, srčani mišić je refraktaran (nenadražljiv na ekstra nadražaj) u toku trajanja cele faze sistole. Ovaj period napodražljivosti naziva se period apsolutne refraktarnosti srčanog mišića. Međutim, ako se na srčani mišić u fazi opuštanja srca (dijastola), deluje ekstra nadražajima nekoliko puta jačeg intenziteta od onih koji nastaju u srcu tokom normalnog podražavanja, može se proizvesti ponovna kontrakcija srca ili ekstrasistola. Ovaj period se naziva period relativne refraktarnosti. Ekstrasistola je

ili manja od prethodne spontane sistole, ili ravna njoj, ali nije veća. Pauza nakon ekstrasistole obično je duža (kompenzatorna pauza). Prva naredna spontana sistola posle ekstrasistole obično je veća nego prethodna spontana, a usled punjenja komore krvlju zbog duže pauze (Franck-Starlingov zakon rada srca).

Opisane osobine srčanog mišića ukazuju na to da kod srca nema mogućnosti nastanka složenih kontrakcija-tetanusa ili grča mišića, što je moguće kod skeletnog mišića. Skeletni mišić je refraktaran samo u toku trajanja akcionog potencijala za vreme latentne faze koja traje svega 3,5 milisekundi. Nakon toga, u fazi skraćivanja mišića, sposoban je da reaguje na naredni nadražaj (opisano u vežbi iz fiziologije mišića).

Ponašanje srčanog mišića u skladu sa napred navedenim činjenicama od velike je važnosti da bi srce moglo obavljati funkciju koja mu je namenjena.

ZADATAK: Dokazati postojanje apsolutne refraktarnosti i izazvati ekstrasistolu na žabljem srcu *in situ*.

MATERIJAL: Koristiti isti mterijal koji je korišćen u prethodnoj vežbi.

IZVOĐENJE: Pripremiti preparat žabljeg srca *in situ*, srce spojiti s sistemom za registrovanje srčanih kontrakcija. Za podražavanje srca se koristi elektrostimulator sa pojedinačnim nadražajima sa tankim provodnicima kao elektrodama. Slobodan kraj jednog provodnika zakači se za kukicu kojom je srce vezano za polugu za registrovanje, a drugi provodnik pažljivo se omota oko baze srca. Podesiti brzinu kretanja kimografa da se jasno vide krive kontrakcije, registrovati nekoliko spontanih kontrakcija, a zatim početi podražavati srce pojedinačnim nadražajima iz elektrostimulatora supramaksimalnim intenzitetom, po jedanput za vreme sistole, dijastole i pauze. Skicirati dobijeni zapis i označiti ga (sistole, ekstrasistolu, kompenzatornu pauzu, postekstrasistolu).

PROSTOR ZA RAD:

Skicica zapisa sa valjka kimografa:

ZAKLJUČAK:

4.8 Preparacija žabljeg srca na Štraubovu kanilu

Kod ovog preparata žablje srce se potpuno izoluje iz organizma, odnosno prekida se i anatomska i fiziološka veza sa organizmom. Već je ranije rečeno da srce izolovano iz

organizma može da se kontrahuje nekoliko sati ako se obezbede posebni uslovi. Srce žabe obično se izoluje na Štraubovu kanilu ispunjenu Ringerovim rastvorom za žabe.

ZADATAK: Izolovati srce iz tela žabe na Štraubovu kanilu.

MATERIJAL: Sav pribor koji je potreban za preparisanje žabljeg srca *in situ* i Štraubova kanila.

IZVOĐENJE: Preparacija je potpuno ista kao i kod preparacije žabljeg srca *in situ*, tj. preparacija se nastavlja na tu preparaciju. Nakon preparacije žabljeg srca *in situ* pincetom provući konac ispod početnog dela oba kraka *truncus arteriozusa* i pripremiti omču (ligatru) oko arterija. Podići malo u vis *truncus arteriozus* i pažljivo odvojiti vezivno tkivo koje povezuje lukove arterija. Okrenuti ploču sa žabom tako da je glava žabe sada okrenuta prema operatoru, malim finim makazama zaseći levi ogranak aorte i zatim u otvor pažljivo uvesti vrh kanile koja je prethodno napunjena do 1/3 Ringerovim rastvorom. Vršak kanile polako i pažljivo potiskivati prema komori dok konačno ne uđe u šupljinu komore.

Da je vrh kanile u šupljini komore prepoznaje se po tome što se komora naglo smanji i krv koja je ušla u kanilu pokazuje pulzacije sinhrone sa sistolom komore. Sada se ranije pripremljena ligatura (omča) čvrsto stegne oko aorte i uskog dela kanile, načini još jedan čvor i kanila time fiksira u aorti. Pomoću kapaljke se izvuče krv iz kanile i kanila nekoliko puta ispere Ringerovim rastvorom. Iza ligature i mesta uvođenja kanile izvršiti presecanje oba kraka aorte, srce na kanili malo podignuti i oko venoznog sinusa na granici prema venama pripremiti ligaturu, čvrsto je podvezati pazeći da sinus ostane u vezi sa ostalim delom srca. Ako je ligatura dobro postavljena, srce zadržava svoju normalnu funkciju. Na kraju je još potrebno izvršiti presecanje iza ligature na sinusu i podići kanilu sa potpuno izolovanim srcem iz organizma, postaviti u stalak i pripremiti za dalje oglede.

Skicirati postupak sa modela:

Da bi srce moglo da se normalno kontrahuje, potrebno je često menjati Ringerov rastvor u kanili i povremeno po spoljašnjoj površini srca nakapavati Ringerov rastvor.

ZAPAŽANJA:

4.9 Ispitivanje uticaja povećane koncentracije jona kalijuma i jona kalcijuma na rad izolovanog srca žabe

Za normalno funkcionisanje ćelija svih tkiva u organizmu neophodno je održavanje homeostaze, tj. dinamičke ravnoteže stalnosti koncentracija različitih supstancija u ekstracelularnoj tečnosti. Promene u koncentraciji pojedinih elemenata van fizioloških varijacija i/ili narušavanje njihovog međusobnog odnosa, odraziće se manje ili više štetno na ćelije ili čak može dovesti do njihove smrti. Srce je naročito osetljivo na promene koncentracije mineralnih jona i to prvenstveno jona kalijuma i kalcijuma.

Ako ekstracelularna tečnost sadrži previše jona K (ili normalno, ali bez jona Ca), srce se ekstremno opusti, a frekvencija i amplituda kontrakcija se smanjuju. Vrlo visoke koncentracije K jona mogu prouzrokovati potpunu blokadu provođenja impulsa kroz srce i zaustavljanje rada u maksimalnoj relaksaciji (zaustavljanje u fazi dijastole). Objašnjenje za ovo je činjenica da višak jona K u ekstracelularnoj tečnosti uzrokuje smanjenje membranskog potencijala svih ćelija pa tako i Purkinijevih ćelija u SA čvoru.

Povećanje koncentracije jona Ca u ekstracelularnoj tečnosti pojačava kontraktilnost srca; u početku kontrakcije postaju znatno duže i snažnije, a zatim se srce zaustavi u stanju maksimalne kontrakcije (u sistoli). Ovo je rezultat direktnog stimulacijskog efekta jona Ca na kontrakciju mišićnih vlakana srca.

Ispitivanje dejstva ovih katjona u visokim koncentracijama moguće je izvesti na izolovanom srcu sisara pri čemu je potrebno obezbediti mnogo složenije uslove za rad nego ako se ogled izvodi na izolovanom srcu žabe. Već je ranije konstatovano da srce žabe, da bi normalno funkcionisalo u izolovanim uslovima, treba često prelivati Ringerovim rastvorom koji, pored 0,65% NaCl, sadrži 0,02% rastvore KCl i $CaCl_2$. U toku rada na ovoj vežbi utvrdiće se da izolovano srce žabe ne može normalno da se kontrahuje ako u fiziološkom rastvoru nedostaju K i Ca; odnosno, da je za normalan rad srca neophodno prisustvo sva tri katjona.

ZADATAK: Ispitati uticaj nepotpunog Ringerovog rastvora (samo 0,65% NaCl) i jona K i Ca u višku u Ringerovom rastvoru na rad izolovanog žabljeg srca na Štraubovoj kanili.

MATERIJAL: Kao i u vežbi izolacije žabljeg srca na Štraubovu kanilu, normalan Ringerov rastvor, 0,65% rastvor NaCl, 0,1% KCl u Ringerovom rastvoru, 0,2% $CaCl_2$ u Ringerovom rastvoru, kapaljke, kimograf, poluga za registrovanje.

IZVOĐENJE: Izolovati žablje srce na Štraubovu kanilu. Kanilu sa izolovanim žabljim srcem staviti u poseban stalak i spojiti srce sa polugom za registrovanje. Dobro isprati srce i kanilu normalnim Ringerovim rastvorom (da ne bude tragova krvi u kanili),

registrovati nekoliko spontanih kontrakcija i odrediti frekvenciju srčanog rada. Pomoću kapaljke odstraniti iz kanile Ringerov rastvor i drugom kapaljkom dodati oko 1ml 0,65% NaCl, registrovati kontrakcije i kada se postigne izrazito smanjenje amplitude kontrakcija, kanilu isprati nekoliko puta normalnim Ringerovim rastvorom. Nakon što se srce oporavilo, na isti način kao i prethodno, Ringerov rastvor u kanili zameniti, prvo sa 0,1% KCl u Ringerovom rastvoru, a zatim sa 0,2% $CaCl_2$ u Ringerovom rastvoru. Između svakog dodavanja rastvora isprati kanilu i srce normalnim Ringerovim rastvorom. Ispod svakog zapisa na papiru kimografa označiti tretman koji je izvršen.

Pri izvođenju ovih ogleda potrebno je voditi računa da se za svaki rastvor koristi posebna kapaljka.

PROSTOR ZA RAD:

Skicirati zapis sa kimografa:

ZAKLJUČAK:

4.10 Uticaj adrenalina i acetilholina na rad izolovanog srca žabe

Vegetativni nervni sistem deluje na srce posredstvom hemijskih supstancija – medijatora, koji se oslobađaju na nervnim završecima u trenutku kada do njih dospe impuls. Pošto izazove efekat, medijator se brzo razlaže i nervni završetak postaje ponovno sposoban da novi impuls preko medijatora prenese na srce. Hemijski medijatori simpatikusa su noradrenalin i adrenalin, a parasimpatikusa – acetilholin.

Adrenalin ima dejstvo na rad srca isto kao i kada je nadražen simpatikus, a acetilholin kao parasimpatikus, bez obzira da li su do srca dospeli putem krvi ili su oslobođeni impulsima nervnih završetaka na efektoru. Slične efekte izazivaju i u *in vitro* uslovima.

ZADATAK: Ispitati uticaj adrenalina i acetilholina na rad izolovanog srca žabe.

MATERIJAL: Kao i u vežbi izolacije žabljeg srca na Štraubovu kanilu, kimograf, poluga za registrovanje, Ringerov rastvor, osnovni rastvor adrenalina 1:1000, osnovni rastvor acetilholina 1:10000, kapaljke.

IZVOĐENJE: Izvršiti sve pripreme kao i u vežbi ispitivanja uticaja povećane koncentracije jona kalijuma i jona kalcijuma, registrovati spontane kontrakcije srca i odrediti frekvenciju srčanog rada. Odstraniti Ringerov rastvor iz kanile i dodati rastvor adrenalina (0,2ml osnovnog rastvora adrenalina u 10ml Ringerovog rastvora).

Konstatovati povećanje frekvencije i amplitude srčanih kontrakcija (pozitivno hronotropno i inotropno delovanje). Nakon ispiranja kanile i srca normalnim Ringerovim rastvorom i posle normalizacije srčanog ritma, dodati u kanilu Ringerov rastvor sa acetilholinom (nekoliko kapi osnovnog rastvora u 10ml Ringerovog rastvora). Uočiti usporenje ritma i smanjenje snage kontrakcije (visina amplitude na zapisu se smanjuje) ili zaustavljanje rada srca u dijastoli (negativno hronotropno i inotropno delovanje).

PROSTOR ZA RAD:

Skicirati zapis sa kimografa:

ZAKLJUČAK:

4.11 Auskultacija srčanih tonova

Srčani tonovi su zvučne pojave koje prate rad srca. Iako u fizičkom i muzičkom smislu oni nisu pravi muzički tonovi sa pravilnim i konstantnim vibracijama, već nepravilni tonovi – šumovi, označavaju se srčanim tonovima da bi se razlikovali od patoloških pojava pri promenama na srčanim zaliscima ili suženjima srčanih otvora koji se nazivaju srčani šumovi. Normalni srčani tonovi su kratkotrajni, a šumovi predstavljaju prolongirane zvučne pojave koje se čuju u normalno nečujnim intervalima srčane revolucije. Srčani tonovi se najbolje mogu čuti na zidu grudnog koša u međurebarnim prostorima i ta mesta gde se ove zvučne pojave najbolje čuju nazivaju se *puncta optima* ili *puncta maxima*. To su, ustvari, mesta projekcije srčanih zalistaka i otvora srčanih šupljina na površini grudnog koša. Ona su određena za svaku vrstu životinja i u veterinarskoj praksi se koriste za auskultaciju (osluškivanje) srčanih tonova kod uobičajenih pregleda srca.

Srčani tonovi se, osim metodom auskultacije, mogu registrovati i metodom fonokardiografije. Ova metoda se izvodi pomoću osetljivog aparata – fonokardiografa, a dobijeni zapis se naziva fonokardiogram.

Tokom aktivnosti srca javljaju se četiri srčana tona. Prvi i drugi srčani tonovi su glavni i mogu se auskultirati kod čoveka i životinje prislanjanjem uha ili slušalica (fonedoskop, stetoskop) na grudni koš u predelu srca. Treći i četvrti srčani tonovi su sporedni i mogu se registrovati pomoću metode fonokardiografije.

Prvi srčani ton (sistolni ton) je sinhron sa sistolom komora i nastaje u toku izometrijske kontrakcije miokarda komora. Po kvalitetu je dubok, manje ograničen i produžen (razvučen). Najvažnija komponenta u njegovom stvaranju je zatvaranje i zatezanje atrioventrikularnih zalistaka na samom početku sistole komora, kada pritisak

usled izometrijske kontrakcije miokarda počne da raste i prenese se na krv u komorama. Pored toga, u nastanku prvog srčanog tona učestvuju zatezanje i vibracija miokarda komora u izometrijskoj fazi kontrakcije, kao i otvaranje semilunarnih zalistaka na kraju izometrijske i na početku izotonusne faze kontrakcije komora. Na fonokardiogramu prvi srčani ton ima 6-11 oscilacija. Pri auskultaciji se čuje kao glas „LAB“.

Drugi srčani ton (dijastolični ton) je sinhron sa dijastolom komora – nastaje na samom početku dijastole. U njegovom nastajanju učestvuju samo semilunarni zalisci i to njihovo zatvaranje, zatezanje i vibracija, što se događa na samom početku dijastole komora kada pritisak u aorti i *a. pulmonalis* bude veći od pritiska u komorama, odnosno kada su stečeni uslovi da se krv vrati nazad prema srcu (što se normalno ne dešava). Drugi srčani ton je rezak (oštar), jasan, dobro ograničen i kratko traje, a na fonokardiogramu ima 4-6 oscilacija. Pri auskultaciji podseća na izgovaranje „TAB“.

Treći srčani ton (mezodijastolični ton) nastaje na početku srednje trećine dijastole komora. Posledica je oscilatornog kretanja krvi između zidova komora podstaknuto prilivom krvi iz pretkomora. Ne može se čuti, osim pri većem fizičkom naporu, ali se može registrovati. Kada se pri većem fizičkom naporu, uz glavne srčane tonove, čuje i treći srčani ton ta pojava se označava kao „galopni ritam“.

Četvrti srčani ton (presistolični ton) nastaje kada kontrakcijom pretkomore potisnuta krv izazove vibracije komore slične onima kao kod trećeg srčanog tona. Takođe se ne može se čuti, ali se može registrovati.

ZADATAK: Auskultirati prvi i drugi srčani ton na psu i/ili čoveku.

MATERIJAL: Fonedoskop, vata, alkohol.

IZVOĐENJE: Dezinfikovati krajeve fonedoskopa koji se stavljaju u slušni kanal uha. Uočiti i palpacijom pronaći mesto na levoj strani grudnog koša gde se najbolje palpira udar srčanog vrha – *ictus cordis* (kod konja u 4.-6. interkostalnom prostoru, kod goveda i svinja 3.-5., kod mesojeda 4.-7., kod svih u donjoj trećini toraksa, blizu sternuma, sa leve strane). Levak fonedoskopa staviti na to mesto i izbegavati svako trenje koje može da ometa pravilnu auskultaciju. Prema napred datom opisu treba razlikovati prvi i drugi srčani ton.

PROSTOR ZA RAD:

Srčani tonovi su auskultirani kod (navesti vrstu):

ZAPAŽANJA:

4.12 Sistolni i minutni volumen

Sistolni volumen (SV) je količina krvi koja se tokom jedne kontrakcije (sistole) srca istisne u aortu, odnosno *a.pulmonalis*. Sistolni volumen leve komore je približno jednak sistolnom volumenu desne komore (manje razlike postoje zbog fiziološkog šanta). Ovaj volumen ne predstavlja svu količinu krvi koja se u komorama zatekla na kraju dijastole ili početku sistole - *presistolni volumen*. Sistolom se u arterijski sistem istisne oko 43% presistolnog volumena. Nakon sistole u komori ostaje oko 57% krvi - *postsistolni volumen*. Veći deo ove krvi može se jačom kontrakcijom istisnuti iz komore i tako povećati sistolni volumen (rezerva srca).

Čak i nakon najsnažnije kontrakcije srca u komorama ostaje manji deo krvi - *rezidualna krv* ili *rezidualni volumen*. Značaj rezidualnog volumena se ogleda u tome što se komore i pri većoj frekvenci i jačim kontrakcijama uvek dovoljno pune krvlju. Veličina sistolnog volumena zavisi od vrste (veličina srca) i potreba organizma za krvlju u datom trenutku. Kod sisara prosečno iznosi od 0,45 do 1,5 ml/kg telesne mase.

Minutni volumen (MV) je zapremina krvi koju leva komora istisne u aortu u toku jednog minuta. Minutni volumen je jednak proizvodu sistolnog volumena i frekvencije rada srca (postoji obrnuta srazmera između frekvence i stepena punjenosti komora krvlju). Preveliko povećanje frekvence može značajno da smanji minutni volumen (pozitivna povratna sprega) i dovede do hipovolemičnog šoka. Povećan mišićni napor dovodi do povećanja minutnog volumena (čak i do 5 puta).

Minutni volumen se može odrediti sledećim metodama:

- ✓ direktne (hirurške) metode – precizne, ali zahtevaju otvaranje grudnog koša (koriste se samo u eksperimentalne svrhe) i
- ✓ indirektne (hemijske) metode (koriste se u kliničke svrhe).

ZADATAK: Na osnovu zadatih parametara, dobijenih indirektnom metodom, izračunati minutni volumen kod konja i/ili čoveka.

IZVOĐENJE: Indirektne metode određivanja srčanog minutnog volumena se zasnivaju na dva principa (metode):

1. Fickov princip (količina neke supstance koju iz arterijske krvi preuzme neki organ u jedinici vremena jednaka je proizvodu razlike koncentracije te supstance u arterijskoj i venskoj krvi, odnosno A-V razlike i protoka krvi u jedinici vremena). Za ovo je potrebno odrediti ukupnu količinu O_2 koju organizam preuzme u plućima za 1 minut (pomoću respirometra) i razliku u koncentraciji O_2 između arterijske krvi iz bilo koje dostupne arterije i venske krvi iz *a. pulmonalis*. Minutni volumen se izračunava na osnovu sledeće formule:

$$MV = \frac{\text{potrošnja kiseonika u plućima (ml/min)}}{\text{koncentracija kiseonika u arterijskoj krvi – koncentracija kiseonika u venskoj krvi (ml/L)}}$$

2. Indikator – diluciona metoda (određivanje stepena dilucije nekog indikatora – neutralne boje ili radioaktivnog izotopa). Za ovu metodu je potrebno ubrizgati indikator i/v i svakih 5 skundi uzorkovati arterijsku krv i odrediti koncentraciju indikatora. Minutni volumen se izračunava na osnovu sledeće formule:

$$MV = \frac{\text{zapremina indikatora (L) X koncentracija indikatora (mg/L)}}{\text{prosečna koncentracija indikatora (mg/L) X vreme (min)}}$$

PROSTOR ZA RAD:

Izračunavanje na osnovu Fickovog principa:

Potrošnja kiseonika u plućima = ml/min

Koncentracija kiseonika u arterijskoj krvi = ml/L

Koncentracija kiseonika u venskoj krvi = ml/L

MV = L/min

Izračunavanje na osnovu indikator – dilucione metoda:

Zapremina indikatora = L

Koncentracija indikatora = mg/L

Prosečna koncentracija indikatora = mg/L

Vreme = min

MV = L/min

ZAKLJUČAK:

4.13 Puls (bilo)

Oscilacije elastičnog zida aorte, koje nastaju proširivanjem njenog početnog dela za vreme svake sistole i vraćanjem u poćetni položaj za vreme dijastole, prenose se u vidu talasa duž arterijskog krvotoka sve do arteriola. Te ritmičke oscilacije arterijskih zidova nazivaju se puls ili bilo. Brzina prostiranja pulsnog talasa u aorti iznosi 3-5m/s i povećava se prema manjim arterijama gde iznosi i do 35m/s. Idući od aorte ka manjim arterijama visina pulsnog talasa postaje sve manja, tako da u arteriolama i kapilarama oscilacije potpuno nestaju, što je rezultat povećanog otpora u ovim krvnim sudovima u čijem zidu se nalaze glatkomišićne ćelije. Ispitivanje pulsa se vrši palpacijom (pipanjem) neke od arterija na periferiji, koja ima tvrdu koštanu podlogu, a sama palpacija pulsa predstavlja obavezni deo kliničkog pregleda u humanoj i veterinarskoj medicini.

Puls se može registrovati i pomoću sfigmografa (sfigmografija), a na krivoj pulsa razlikuju se uzlazna grana koja odgovara sistoli leve komore i silazna koja odgovara dijastoli, a na toj silaznoj grani se nalazi mali ekstrazubac - dikrotni zubac.

Palpacija pulsa se vrši nežnim pritiskom jagodicama drugog, trećeg i četvrtog prsta na neku površinu arterije (ne suviše malu) koja ispod sebe ima koštanu podlogu.Kod ljudi puls se palpira na *a.metakarpici*, *a. femoralis* i dr. U veterinarskoj medicini za tu svhu koristi se kod kopitara i velikih preživara *a. facijalis*, a kod manjh preživara, pasa i mačaka *a. femoralis*. Palpacijom pulsa utvrđuje se stanje srca i krvotoka utvrđivanjem svojstava i kvaliteta pulsa:

- ✓ frekvenca pulsa (broj pulsnih oscilacija u minuti)

pulsus normalis – frekvenca pulsa u fiziološkim granicana (tabela 4.2)

pulsus frequens – ubrzan puls (pri tahikardiji)

pulsus rarus – usporen puls (pri bradikardiji)

Tabela 4.2: Fiziološka frekvenca pulsa (/min)

Vrsta	Frekvenca pulsa	Vrsta	Frekvenca pulsa
Goveče	60-80	Mačka	80-100
Konj	28-44	Živina	preko 200
Pas	80-100	Čovek	60-80

✓ visina pulsa

pulsus magnus / altus – visoka amplituda pulsnog tlasa

pulsus parvus – niska amplituda pulsnog talasa

✓ tvrdoća pulsa

pulsus durus – tvrd puls (veća zategnutost zidova krvnih sudova)

pulsus molis – mek puls (manja zategnutost zidova krvnih sudova)

✓ ritam pulsa

pulsus ritmicus – ritmičan puls

pulsus aritmicus – aritmičan puls

✓ brzina odigravanja pulsne oscilacije

pulsus celer – brzo odigravanje pulsne oscilacije

pulsus tardus – sporo odigravanje pulsne oscilacije

✓ mogućnost palpacije

pulsus filiformis - puls koji se teško palpira

pulsus insenzibilis - puls koji se ne može palpirati

ZADATAK: Kod čoveka i neke od životinja na opisanom mestu palpitati puls i analizirati njegove osobine.

IZVOĐENJE: Na označenim mestima postaviti jagodice drugog, trećeg i četvrtog prsta i nežno pritiskati arteriju prema koštanoj podlozi koja se nalazi ispod nje. U jagodicama prstiju oseća se tada svaki talas pulsa kao udar. Pri tome izbrojati fekvenciju pulsa i zapisati.

Obratiti pažnju na sledeće kvalitete pulsa: frekvencija, visina pulsa, tj. veličina ekskurzije arterijskog zida za vreme svakog pulsnog udara, brzina odigravanja pulsne oscilacije (vreme nastajanja i nestajanja pulsa), tvrdoća pulsa (zategnutost, napetost zida arterije) i ritam pulsa.

Nakon palpacije u stanju mirovanja, palpirati puls i nakon fizičke aktivnosti (čučnjeva, penjanja uz stepenice i sl.) i konstatovati razliku.

PROSTOR ZA RAD:

Zapažanja (pre fizičke aktivnosti):

Zapažanja (nakon fizičke aktivnosti):

ZAKLJUČAK:

4.14 Merenje krvnog pritiska

Krvni pritisak pretstavlja silu kojom krv deluje na jedinicu površine zida krvnog suda. Merenje krvnog pritiska se vrši kod većih arterija (arterijski pritisak): kod krupnih životinja na gornjem delu repa (*a. coccygea*), kod malih na zadnjem ekstremitetu (*a.femoralis*), a kod čoveka na nadlaktici (*a. brachialis*). Arterijski pritisak stavaraju: srce, snagom kontrakcije leve komore i elastični zidovi arterija koje je se nakon istezanja vraćaju u prvobitno stanje. Arterijski pritisak obezbeđuje stalni protok krvi u cirkulacionom sistemu i tako, a dopremanjem krvi do kapilara stvara uslove za stalnu razmenu materija između krvi i tkivne tečnosti. Zbog toga je vrednost arterijskog pritiska važan parametar izostrukture organizma sa brojnim homeostatskim mehanizmima koji ga održavaju u fiziološkim granicama.

Pritisak u aorti i velikim arterijama varira tokom srčanog ciklusa. Najvišu vrednost (*sistolni pritisak*) dostiže pri kraju sistole, a zatim opada tokom dijastole. Najniža vrednost pritiska (dijastolni *pritisak*) javlja se na početku sistole komora, neposredno pred otvaranje semilunarnih zalistaka. Razlika između vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska naziva se *pulsni pritisak*. Često se koristi i pojam *srednji arterijski pritisak* i u kliničkoj praksi se izračunava tako što se vrednost dijastolnog pritiska uveća za 1/3 pulsnog pritiska. Najviši pritisak u vaskularnom sistemu vlada na početku aorte, dok je najniži na ušću šupljih vena u srce – centralni venski pritisak.

Krvni pritisak se može meriti direktnim i indirektnim metodama. Direktne metode merenja krvnog pritiska se uglavnom koriste u eksperimentalnim uslovima, mada se koriste i u kliničkim ispitivanjima. Zasnivaju se na uvlačenju kanile ili katetera u neku od arterija (karotidna, femoralna) koja se preko elastične gumene ili plastične cevi dovodi u vezu sa mernim uređajem za registrovanje pritiska. Ceo sistem treba da bude ispunjen fiziološkim rastvorom i antikoagulansom (heparin). Kao merni uređaj može da se koristi živin manometar, ali mnogo precizniji podaci se dobijaju ako se koriste uređaji koji mehaničke promene prevode u električni signal (transducer).

Kod ljudi i domaćih životinja u kliničke svrhe primenjuje se indirektna metoda merenja arterijskog pritiska i to auskultacionom i palpacionom tehnikom. Za merenje se koristi aparat koji se sastoji od gumene manžetne, gumene pumpe sa ventilom i živinog manometra (sfigmomanometar po Riva Rocciju) koji je gumenim crevom povezan sa manžetnom. U poslednje vreme u upotrebi su merači krvnog pritiska različitog izgleda i konstrukcije, ali im je princip rada isti.

ZADATAK: Izmeriti krvni pritisak idirektnom metodom koristeći palpacionu i auskultacionu tehniku.

MATERIJAL: Sfigmomanometar po Riva Rocciju, fonedoskop, vata, alkohol.

IZVOĐENJE: Palpacionom metodom se određuje samo sistolni pritisak na sledeći način: staviti manžetnu oko nadlaktice, zatim pri zatvorenom ventilu pomoću gumenog balona u manžetnu upumpavati vazduh. Istovremeno drugom rukom palpirati puls na ruci na kojoj se obavlja merenje. Upumpavanje vazduha u manžetnu treba prekinuti onog trenutka kada se više ne oseća puls. Tada je pritisak u manžetni veći od onog u arteriji, ona je potpuno komprimovana i izostaje širenje pulsnog talasa distalno od mesta kompresije. Tokom čitavog postupka potrebno je pratiti visinu živinog stuba.

Sada je potrebno polako, sasvim malo, otvoriti ventil da vazduh iz manžetne može lagano izlaziti. Pažljivo pratiti kada se ponovo oseti puls, visina stuba žive tada pokazuje veličinu sistolnog pritiska (u mmHg ili kPa). Na ovaj način izmerena je vrednost krvnog pritiska metodom potpunog zatvaranja arterije. Radi uvežbavanja merenje ponoviti nekoliko puta.

Nakon ovog merenja potpuno otvoriti ventil i uzeti fonedoskop, staviti u slušni kanal, a drugi kraj postaviti ispod donjeg ruba manžetne, a iznad mesta projekcije arterije. Zatvoriti ventil i upumpati vazduh, auskultirajući arteriju i prateći visinu živinog stuba (ili skalu) manometra.

Tokom upumpavanja vazduha, u jednom trenutku se čuje sasvim slab šum, zatim će šum postati jači i jasniji, da bi daljim upumpavanjem vazduha šum potpuno isčezao. Tada je arterija potpuno komprimovana.

Otvoriti malo ventil i polako ispuštati vazduh. U trenutku kada se pritisak u manžetni izjednači sa arterijskim, zid arterije zatreperi i preko fonedoskopa se čuje jasan i jak šum (I šum po Korotkovu), zatim ovaj šum postaje slabiji da bi se, u jednom trenutku, ponovo jasnije čuo (II šum po Korotkovu) i onda naglo izgubio. Visina živinog stuba kod pojave I šuma odgovara vrednosti sistolnog pritiska, a kod II šuma – dijastolnom pritisku. Ove zvučne pojave su posledica turbulentnog toka krvi kroz delimično komprimovan arterijski krvni sud. Nakon merenja krvnog pritiska u stanju mirovanja, izmeriti pritisak nakon fizičke aktivnosti (čučnjeva, penjanja uz stepenice i sl.) i konstatovati razliku.

PROSTOR ZA RAD:

Pre fizičke aktivnosti:	Nakon fizičke aktivnosti:
Sistolni pritisak =	Sistolni pritisak =
Dijastolni pritisak =	Dijastolni pritisak =
Pulsni pitisak =	Pulsni pitisak =
Srednji arterijski pritisak =	Srednji arterijski pritisak =

ZAKLJUČAK:

4.15 Registrovanje bioelektričnih struja srca

Bioelektrične struje srca se registruju dijagnostičkom metodom koja se naziva *elektrokardiografija*. Akcioni potencijali (depolarizacije i repolarizacije) miokarda nastaju kao rezultat podražaja od strane impulsa koji je nastao u SA čvoru i sistemom za sprovođenje impulsa bio prenet do svih ćelija miokarda. Od srca se bioelektrične struje prenose, zahvaljujući elektrolitima prisutnim u svim telesnim tečnostima i tkivima, do površine tela. *Elektrokardiograf* registruje te razlike u potencijalima (reda veličine mV) između elektroda.

U zavisnosti od promene polariteta ćelijskih membrana miokarda za vreme akcionog potencijala elektrokardiograf registruje razlike u potencijalima kao pozitivne ili negativne otklone, odnosno kao izostanak razlike u potencijalima (izoelektrična linija, bazalna linija) za vreme kada je ćelija u potpunosti polarizovana ili depolarizovana.

Kada je srčana mišićna ćelija polarizovana ne postoji električna aktivnost pa elektrokardiograf povezan preko elektrode na površini tela registruje ravnu izoelektričnu liniju. Posle stimulacije počinje proces depolarizacije. Dolazi do brze promene u naelektrisanjima između spoljašnje i unutrašnje strane ćelijske membrane i taj talas se širi celom dužinom ćelije, a zatim se prenosi do elektrode. Ovu razliku u potencijalima elektrokardiograf registruje kao pozitivan otklon – zubac. Kada se cela ćelija depolariše više ne postoji razlika u potencijalima što elektrokardiograf registruje kao izoelektričnu liniju. Sa početkom depolarizacije javlja se nova razlika u potencijalima. Ponovo dolazi do promene u naelektrisanjima između spoljašnje i unutrašnje strane ćelijske membrane i ovaj talas se prenosi do elektrode Ovu razliku u potencijalima elektrokardiograf registruje kao negativan otklon – zubac.

ECG se može registrovati na sledeće načine:

- ✓ **Bipolarno registrovanje**

<u>I odvod/derivacija</u> – pozitivana elektroda na levom prednjem ekstremitetu a negativna na desnom prednjem ekstremitetu

<u>II odvod/derivacija</u> - pozitivana elektroda na levom zadnjem ekstremitetu a negativna na desnom prednjem ekstremitetu

<u>III odvod/derivacija</u> - pozitivana elektroda na levom zadnjem ekstremitetu a negativna na levom prednjem ekstremitetu

✓ **Unipolarno registrovanje**

Pojačani odvodi sa ekstremiteta:

aVR - pozitivana elektroda na desnom prednjem ekstremitetu

aVL - pozitivana elektroda na levom prednjem ekstremitetu

aVF - pozitivana elektroda na levom zadnjem ekstremitetu

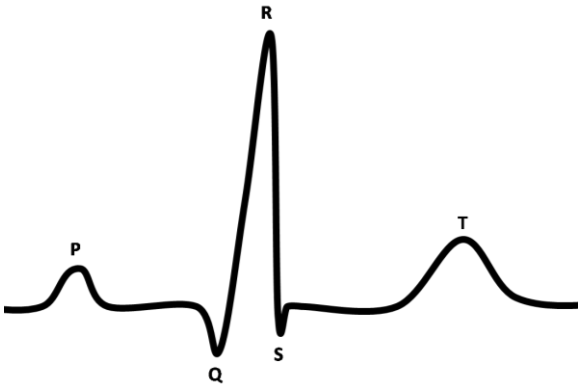
Prekordijalni odvodi:

V_{1-6} – pozitivna elektroda se postavlja na toraks na tačkama projekcije pojedinih delova srca.

Ostali ekstremiteti su kod unipolarnog registrovanja povezani sa negativnom elektrodom.

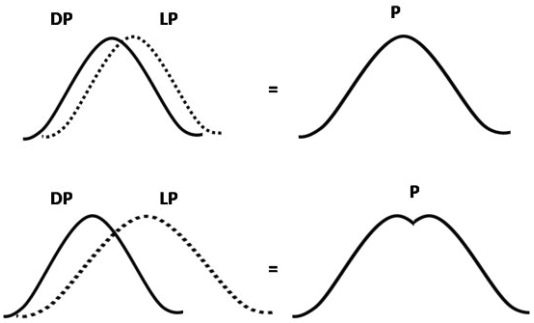
Zapis koji se dobija pomoću elektrokardiografa naziva se *elektrokardiogram*. Za zapisivanje elektrokardiograma se koristi traka milimetarskog papira.

Na slici 4.1 je prikazan izgled elektrokardiograma (fiziološki) dobijen I odvodom. Izgled elektrokardiograma se razlikuje kod različitih odvoda/derivacija (zubci i kompleksi mogu biti različitih amplituda ili polarizacije).



Slika 4.1: Elektrokardiogram

Zubac-P predstavlja zubac depolarizacije predkomora. On ima pozitivan otklon zato što se talas depolarizacije prostire od baze srca ka njegovom vrhu. Ovaj zubac predstavlja procese depolarizacije obe pretkomore, i kod velikih životinja može biti udvojen zato što proces depolarizacije započinje u desnoj pretkomori i zatim se širi na levu predkomoru (slika 4.2).



Slika 4.2: P-zubac kod malih (A) i velikih (B) životinja

(DP – desna predkomora, LP – leva predkomora)

Za vreme PQ-intervala talas depolarizacije prolazi kroz AV-čvor. Pretkomore su potpuno depolarizovane dok su komore potpuno polarizovane pa se na elektrokardiogramu očitava samo izoelektrična linija.

QRS-kompleks je komorni kompleks koji predstavlja depolarizaciju komora. Za vreme depolarizacije komora dolazi do repolarizacije pretkomora ali se to na elektrokardiogramu ne uočava zato što taj »negativan P-zubac« pokriva QRS-kompleks. QRS-kompleks čine tri zupca od kojih svaki odgovara depolarizaciji određenog dela komora.

Q-zubac predstavlja zubac depolarizacije Hissovog snopa i baze međukomornog septuma. Negativna orjentacija Q-zubca je posledica širenja impulsa u pravcu od endokarda ka epikardu zato što se Purkinijeva vlakna Hissovog snopa nalaze subendokardijalno. R-zubac nastaje kao odraz depolarizacije najvećeg dela muskulature komora. Njegovu uzlaznu liniju predstavlja razliku u potencijalima između vrha srca i bočnih delova miokarda komora, a silazna linija je rezultat depolarizacije skoro celog miokarda. S-zubac je rezultat razlike u potencijalu između najvećeg dela miokarda i dela miokarda na bazi leve komore. Ovo je posledica toga što je zid leve komore znatno deblji od desne pa potpuna depolarizacija vremenski nastupa kasnije. Negativna orjentacija ovog zubca nastaje zato što se impuls kreće od pravca vrha srca ka njegovoj bazi.

Za vreme ST-intervala ceo miokard komora je depolarizovan, a miokard predkomora repolarizovan pa se na elektrokardiogramu očitava samo izoelektrična linija.

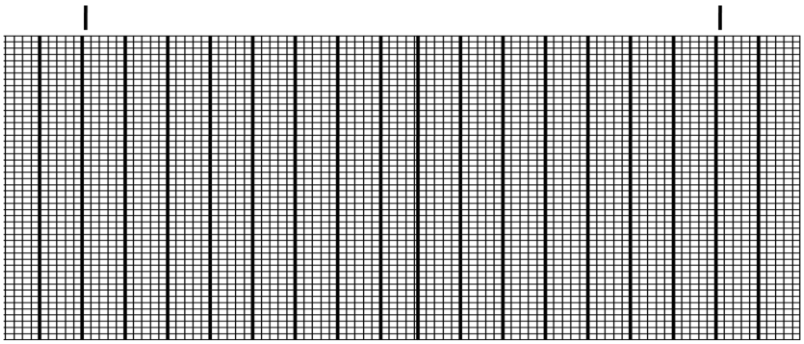
T-zubac je rezultat repolarizacije miokarda komora. On je pozitivno orjentisan (kao i zubac depolarizacije – R) zato što proces repolarizacije započinje od vrha srca i ide prema bazi srca. Uzrok ovome je to što se vrh srca slabije kontrahuje od baze (manja kompresija koronarnih krvnih sudova) i snabdeven je uvek dovoljnom količinom kiseonika i hranljivih materija pa na kraju sistole ima dovoljnu količinu energije (ATP-a) za proces repolarizacije ćelijskih membrana. T-zubac kod nekih životinja (npr. pasa) može biti i negativno orjentisan.

Nakon T-zubca može se uočiti i U-zubac koji predstavlja depolarizaciju interventrikularnog provodnog sistema i/ili papilarnih mišića.

TP-interval je vreme trajanja pauze između dve srčane kontrakcije.

ZADATAK: Sa elektrokardiograma precrtati zapis i obeležiti sve zupce. Odrediti srčanu frekvencu ako je poznata brzina kretanja milimetarskog papira.

PROSTOR ZA RAD:



Brzina kretanja milimetarskog papira = mm/s

Srčana frekvenca: /min

ZAKLJUČAK:

5.0 Fiziologija respiratornog sistema

Anaerobnom razgradnjom glukoze do mlečne kiseline oslobodi se samo oko 8% energije od količine koja se dobije potpunom oksidacijom do CO_2 i vode – to znači da su tokom evolucije aerobni organizmi dobili izvesnu prednost nad anaerobnim. Pod disanjem se podrazumevaju fiziološki procesi stalne razmene gasova između organizma i spoljašnje sredine (vazduha ili vode). Iz spoljašnje sredine se prima kiseonik, a iz oganizma odaje ugljendioksid. Stalna razmena ova dva gasa uslov je za održavanje života, jer kiseonik omogućava oksidativne procese i iskorišćavanje unetih hranljivih materija, a ugljendioksid se stvara u toku oksidacionih procesa u ćelijama i njegovo nagomilavanje veoma brzo bi dovelo do poremećaja homeostaze i smrti organizma.

Razmena gasova može se odvijati difuzijom preko površine tela (kod veoma malih, primitivnih organizama) i putem specijalizovanih respiratornih organa uz uključivanje razvijenog sistema krvotoka za transport gasova. Postoje 3 osnovna tipa respiratornih organa:

- ✓ traheje,
- ✓ škrge i
- ✓ pluća.

Respiratorni sistem, kod sisara, obuhvata čitav niz organa koji omogućavaju unošenje kiseonika iz spoljašnje sredina u krv i odstranjivanje ugljendioksida iz organizma. Krv kao posrednik omogućava prenošenje kiseonika od pluća do tkiva i ugljendioksid iz tkiva u pluća.

Unošenje vazduha iz spoljašnje sredine i njegovo izbacivanje iz pluća pri disajnim pokretima naziva se *ventilacija pluća*. Razmena gasova između plućnih mehurića (alveola) i krvi naziva se *spoljašnje disanje*, a razmena gasova između tkiva i krvi *unutrašnje disanje*. Oksidacioni procesi u ćelijama se označavaju kao *ćelijsko disanje*. U procesu disanja u širem smislu učestvuju sledeći organi i organski sistemi:

- ✓ vazdušni putevi (od nosnih otvora do respiratornih bronhiola),
- ✓ pluća sa pleurom,
- ✓ grudni koš sa strukturama koje ga čine,
- ✓ respiratorni mišići,
- ✓ aferentni i eferentni nervi,
- ✓ kardiovaskularni sistem i
- ✓ nervni respiratorni centri.

Mehaniku disanja, tj. ventilaciju pluća obavljaju respiratorni mišići (inspiratorni i ekspiratorni) ritmičkim promenama zapremine grudne šupljine, a koju prate i promene zapremine pluća. Udisaj (inspirijum) počinje dolaskom nervnih impulsa iz inspiratornog centra produžene moždine preko interkostalnih nerava do istoimenih mišića i putem *n.frnikusa* do dijafragme koja se tada kontrahuje. Ovo dovodi do pomeranja rebara dorzolateralno i kranijalno (širi se transverzalni dijametar toraksa), a kontrakcija dijafragme ima za posledicu njeno pomeranje u kaudalnom pravcu i povećanje uzdužne ose grudnog koša. Povećanjem zapremine grudnog koša povećava se negativnost interpleuralnog (intratorakalnog) pritiska. Pluća se opiru širenju svojim elstičnim vlaknima; međutim, zahvaljujući izraženoj atheziji tankog sloja tečnosti između pleure pulmonalis i pleure costalis (poplućnica i porebrica), odnosno negativnom intratorakalnom pritisku, u toku širenja toraksa šire se istovremeno i pluća. Usled povećane zapremine pluća, a prvenstveno alveola, u njima opada pritisak vazduha. Zbog toga iz spoljašnje sredine, tj. iz pravca većeg pritiska, vazduh ulazi u pluća-odvija se inspirijum. Značaj intrapleuralnog pritiska vidi se i po tome što nakon prodora vazduha u interpleuralni prostor dolazi do slepljivanja alveola, što se naziva kolaps pluća ili pneumotoraks.

Kod mirnog disanja izdisaj (ekspirijum) je uglavnom pasivan proces. On počinje prestankom dolaska nervnih impulsa u inspiratorne mišiće, kada počinje njihova relaksacija pri čemu se povećana zapremina toraksa vraća na prvobitnu veličinu. Negativnost interpleuralnog pritiska sada se smanjuje i vazduh se iz pluća istiskuje u spoljašnju sredinu.

5.1 Uloga dijafragme u mehanici disanja (Dondersov ogled)

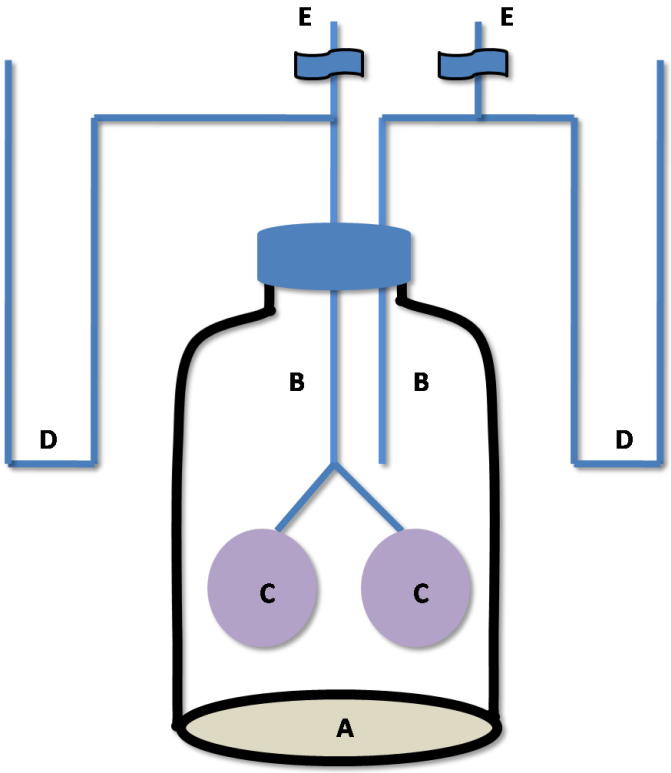
Uloga dijafragme i značaj negativnog interpleuralnog pritiska u plućnoj ventilaciji mogu se i praktično dokazati. Pluća su elastičan organ koji se skuplja i širi pod dejstvom nekoliko sila. Atmosferski pritisak vazduha (101 kPa) deluje na pluća preko disajnih puteva i teži da ih proširi. Tome se suprotstavlja sila elastičnosti plućnog tkiva. Sa druge strane, između vescelarnog i parijetalnog lista pleure vlada normalno negativan pritisak - niži je od atmosferskog pritiska za 0,4-0,6 kPa. Negativan interpleuralni pritisak javlja se kao posledica dejstva dve suprotne sile: snage širenja grudnog koša koja rasteže pluća, i elastičnosti plućnog krila koja se opire rastezanju. Negativnost interpleuranog pritiska raste, tj. apsolutna vrednost pritiska se snižava za vreme inspirijuma, srazmerno dubini udisaja. Obrnuto, pri ekspirijumu negativnost pritiska opada, tj. njegova apsolutna vrednost raste, tako da pri dubokom disanju, pritisak u pleuralnom prostoru može postati i pozitivan, tj. viši od atmosferskog. Negativnost interpleuralnog pritiska uspostavlja se odmah nakon prvog udisaja po rođenju.

Širenje grudne šupline za vreme udisaja izazvano je kontrahovanjem velikog broja mišića. Dijafragma je najvažniji respiratorni mišić. Ona je ispupčena prema grudnoj šupljini. U toku kontrakcije, tj. za vreme udisaja ona se pokreće prema trbušnoj šupljini (ali ne postaje ispupčena prema trbušnoj šupljini), pri čemu se povećava zapremina toraksa, a opada vrednost pritiska u interpleuralnom prostoru (povećava se negativnost).

Uloga dijafragme u procesima udisaja i izdisaja posredstvom stvaranja negativnog interpleuralnog pritiska može se praktično pokazati Dondersovim ogledom.

ZADATAK: Dondersovim aparatom ustanoviti širenje preparata pluća kunića ili gumenih balončića zbog snižavanja pritiska u zatvorenom staklenom zvonu (boci).

MATERIJAL: Dondersov aparat, gumeni balončić. Dondersov aparat (slika 5.1) se sastoji iz staklene boce (2-3 L) sa odrezanim dnom. Na mestu dna postavljena je gumena membrana („dijafragma“) koja može da se pomera gore-dole (A), menjajući zapreminu boce. Kroz čep grlića boce prolaze dve staklene cevi (B). Na unutrašnji deo jedne cevi pričvršćuje se preparat pluća ili gumeni balončić (C), spoljašnji deo komunicira sa atmosferskim vazduhom, a jednim T nastavkom je u vezi i sa vodenim manometrom (D). Druga cev komunicira sa šupljinom boce i preko nje može da se odstrani izvesna količina vazduha, odnosno da se menja pritisak u slobodnom prostoru boce („interpleuralni prostor“). Ova cev je takođe u vezi sa vodenim manometrom (D). Pored navedenog,treba reći i to da spoljašnji krajevi obe cevi imaju ventile (štipaljke) (E) pomoću kojih se komunikacija između pluća (balončića) i slobodnog prostora boce s jedne strane i atmosferskog vazduha s druge strane, može otvoriti ili zatvoriti.



Slika 5.1: Dondersov aparat

IZVOĐENJE: Gumenu membranu (dijafragmu) na dnu boce lagano povući nadole. Manometar, koji je u vezi sa slobodnim prostorom boce pokazuje opadanje pritiska u boci a istovremeno se balončić (pluća) širi. Snažnijim istezanjem „dijafragme“ nastale promene su izraženije. Pri vraćanju gumene membrane u početni položaj pritisak u boci se vraća na početnu vrednost, a pluća (balončić) pri tome splašnjavaju (izdisaj). Zatim

otvoriti slavinu na cevi koja komunicira sa slobodnim prostorom boce i ponoviti ogled (imitacija pneumotoraksa). Zapaziti sve promene i zabeležiti ih.

PROSTOR ZA RAD:

Zapažanja pri istezanju gumene membrane:

Zapažanja pri vraćanju gumene membrane:

Zapažanja pri ponavljanju ogleda sa otvorenim ventilom:

ZAKLJUČAK:

5.2 Određivanje promena interpleuralnog pritiska tokom disanja

Prilikom udisaja (inspirijuma) i izdisaja (ekspirijuma) dolazi do promena intrapleuralnog pritiska. Ovo predstavlja rezultat promena zapremina grudnog koša i pluća. Merenje i određivanje promena intrapleuralnog pritiska tokom disanja je moguće izvesti kod eksperimentalnih životinja uvođenjem igle, povezane sa manometrom, u intrapleuralni prostor.

ZADATAK: Odrediti promene vrednosti intrapleuralnog pritiska psa ili kunića u toku disanja.

MATERIJAL: Pas ili kunić, vodeni manometar, sterilna igla, vata, alkohol, makaze.

IZVOĐENJE: Životinju postaviti na sto za oglede, ošišati srednji deo trećeg i četvrtog međurebarnog prostora sa desne strane i dezinfikovati. Iglu, koja je preko gumenog creva povezana sa vodenim manometrom u kojem je obojena voda, pažljivo uvesti u intrapleuralni prostor ubodom uz gornju ivicu nižeg rebra. Konstatovati da se pri ulasku igle u intrapleuralni prostor nivo tečnosti u levom kraku manometra penje naviše.

Za vreme udisaja, nivo tečnosti se još više penje, a u toku izdisaja spušta. Nakon nekoliko spontanih respiratornih pokreta, oglednoj životinji, stavljanjem ruke na ulaz u

respiratorne puteve (na nosni otvor), na kratko onemogućiti ulaženje vazduha u respiratorne puteve. Konstatovati šta se dešava sa intrapleuralnim pritiskom.

PROSTOR ZA RAD:

Zapažanja pri inspirijumu:

Zapažanja pri ekspirijumu:

ZAKLJUČAK:

5.3 Određivanje plućnih volumena i kapaciteta-spirometrija

Kao fiziološki respiratorni parametri, na osnovu kojih se procenjuje funkcionalna sposobnost pluća i fizička osposobljenost jedinke, mogu da posluže zapremine vazduha koje se u raznim uslovima izdišu, udišu ili ostaju u plućima. Te zapremine nazivaju se plućnim volumenima i kapacitetima.

Primarne jedinice zapremine pluća su volumeni i dalje se ne mogu deliti, a drugi parametri, koji se sastoje od dva ili više volumena nazvani su kapacitetima. Ovde ćemo navesti one najvažnije, napominjući da se normalne vrednosti većine ovih parametara mogu precizno određivati jedino kod čoveka, jer je za njihovo merenje potrebna saradnja i voljna akcija ispitanika.

Respiratorni volumen (RV) ili respiratorni vazduh je zapremina vazduha koja se udahne pri normalnom inspirijumu ili izdahne pri normalnom ekspirijumu (mirno disanje bez naprezanja). Kod čoveka iznosi oko 0,5 L, kod psa, ovce i koze oko 0,3 L, govečeta do 3,8 L, konja oko 6 L.

Rezervni inspiratorni volumen (RIV) predstavlja zapreminu vazduha koja se može udahnuti maksimalnim inspirijumom posle normalnog (mirnog) inspirijuma.

Rezervni ekspiratorni volumen (REV) je zapremina vazduha koja se izdahne maksimalnim ekspirijumom nakon normalnog ekspirijuma.

Vitalni kapacitet (VK) predstavlja zapreminu vazduha koja se izdahne iz pluća maksimalnim izdisajem nakon maksimalnog udisaja. VK je, ustvari, po vrednosti zbir prethodna tri volumena (VK=RV+RIV+REV). VK kod ljudi iznosi oko 4 L, a kod utreniranih osoba 5-6 L.

I nakon maksimalnog ekspirijuma u plućima ostaje izvesna zapremina vazduha-rezidualni kapacitet-RK (kod ljudi oko 1,5 L). On se sastoji od dve komponente: kolapsnog volumena (zapremina vazduha koja se istisne iz pluća nakon obostranog pneumotoraksa) i minimalnog vazduha (zapremina koja se uopšte ne može istinuti iz pluća). Prisustvo minimalnog vazduha koji nastaje odmah nakon prvog udisaja novorođenčeta ima značaj u sudskoj medicini.

Funkcionalni rezidualni kapacitet je zapremina vazduha koja ostaje u plućima nakon normalnog ekspirijuma i predstavlja zbir RK i REV.

Inspiratorni kapacitet = RV + RIV

Ukupni (totalni) kapacitet pluća-TK definiše se kao zbir vitalnog kapaciteta i rezidualnog kapaciteta (TK = VK + RK). To je najveća zapremina vazduha koja se može naći u plućima (konj oko 42L, čovek oko 6L).

Tabela 5.1: Plućni volumeni i kapaciteti

Plućni volumen / kapacitet	**Skraćenica**	**Konj (L)**	**Čovek (L)**
Respiratorni volumen	RV	6	0,5
Rezervni inspiratorni volumen	RIV	12	3,5
Rezervni ekspiratorni volumen	REV	12	1,5
Vitalni kapacitet	VK (RV + RIV + REV)	30	4,5
Rezidualni kapacitet	RK (kolapsni + minimalni)	12	1,2 – 1,6
Totalni kapacitet	VK + RK	42	6
Inspiratorni kapacitet	RV + RIV	18	3,8
Funkcionalni rezidualni kapacitet	REV + RK	24	2,2 – 2,7

Plućni volumeni i kapaciteti se mogu meriti postupkom koji se zove spirometrija (aparat spirometar).

ZADATAK: Pomoću spirometra odrediti plućne volumene i kapacitete.

MATERIJAL: Vodeni spirometar, vata, alkohol.

Najjednostavniji vodeni spirometar sastoji se od dva cilindrična suda. Spoljašnji sud je fiksiran, ispunjen vodom i sa gornje strane otvoren. Drugi sud je otvorenom stranom uronjen u spoljašnji sud. On je pokretan, ima skalu sa oznakama u mililitrima, a kad se vazduh preko gumenog creva ubacuje u unutrašnjost ovoga sistema,unutrašnji sud izronjava, pa se može očitati koliki je volumen vazduha unesen. Vodeni spirometar može biti povezan sa kimografom te se na taj način može dobiti i zapis. Ovaj spirometar podesan je za određivanje volumena vazduha koji se ekspirira.

IZVOĐENJE: Pri određivanju napred navedenih parametara neophodna je kontrolisana saradnja osbe kojoj se ispituje plućni volumen i kapacitet. Unutrašnji sud treba uroniti u vodu koja se nalazi u spoljašnjem sudu tako da je nula na skali unutrašnjeg suda u visini gornjeg ruba spoljašnjeg suda. Dezinfikovati deo gumenog creva koji se stavlja u usta. Zatim odrediti zadate parametre sledećim redosledom:

Respiratorni volumen (RV): nakon mirnih, normalnih disajnih ciklusa, u fazi izdusaja prineti ustima deo creva i lagano, mirno i normalno (bez naprezanja) izdahnuti u spirometar i registrovati do kojeg je nivoa unutrašnji sud izronio iz spoljašnjeg (zapisati vrednost u ml);

Rezervni ekspiratorni volumen (REV): pošto se unutršnji sud zaroni u vodu nakon mirnog disanja, a posle završenog normalnog ekspirijuma, maksimalno se uduvava (izdiše) vazduh u spirometar (zapisati postignutu vrednost);

Vitalni kapacitet (VK): u toku mirnih respiracija maksimalno udahnuti, a zatim maksimalno izdahnuti vazduh u spirometar i zapisati vrednost;

Rezervni inpiratorni volumen (RIV): izračunati po formuli: RIV = VK - (RV + REV).

PROSTOR ZA RAD:

RV =	ml
REV =	ml
VK =	ml
RIV =	ml

ZAKLJUČAK:

5.4 Pneumografija

Pneumografija je metoda registracije pokreta grudnog koša pri disanju pomoću pneumografa koji radi na principu zračne transmisije. Sastoji se od metalnog cilindra presvučenog na oba kraja elastičnom membranom, ili iz metalne udubljene posude presvučene na otvorenom kraju elastičnom membranom. Oba tipa pneumatografa su pomoću gumenog creva povezana sa Mareyevim dobošem sa perom za registrovanje na kimografu. Dobijenu krivu nazivamo pneumogram čijom se analizom možemo informisati o:

- ✓ dubini disanja,
- ✓ frekvenciji i
- ✓ odnosu između inspirija i ekspirija.

Fiziološki u miru amplituda otklona odgovara volumenu udahnutog ili izdahnutog vazduha od 500 mL, frekvencija disanja je 12-16 u minuti, a odnos trajanja inspirija i ekspirija iznosi 1:1,3 (čovek).

Prema amplitudi i frekvenciji razlikuje se više tipova disanja koje možemo simulirati:

- ✓ *eupneja* - pravilno,mirno disanje,
- ✓ *dispneja* - otežano,naporno disanje,
- ✓ *hiperpneja* - povećanje frekvencije i/ili dubine disanja,
- ✓ *hipopneja* - smanjenje frekvencije i/ili dubine disanja,
- ✓ *tahipneja* - ubrzano disanje,
- ✓ *bradipneja* - usporeno disanje,
- ✓ *polipneja* - površno, brzo disanje (dahtanje),
- ✓ *apneja* - prestanak disanja.

ZADATAK: Ispitati karakter disajnih pokreta (frekvenciju i dubinu) pod različitim uslovima.

MATERIJAL: Pneumograf, kimograf, poluga za registrovanje, kesa.

IZVOĐENJE: Pri otvorenoj bočnoj cevi na glavnoj cevi, koja povezuje doboš i pneumograf, fiksirati pneumograf oko grudnog koša u nivou ksifoidne hrskavice. Zatim peanom ili posebnom stezaljkom zatvoriti postranu cev, a pero Mareyevog doboša prisloniti uz kimograf i registrovati nekoliko normalnih respiratornih pokreta. Nakon toga treba izvesti sledeće oglede:

a) Rastaviti doboš od pneumografa i zamoliti ispitanika da napravi nekoliko čučnjeva, a potom brzo spojiti sistem i neko vreme registrovati disajne pokrete. Zapaža se da za vreme fizičkog napora i neposredno iza toga dolazi do povećanja dubine i frekvencije disajnih pokreta;

b) Zamoliti ispitanika da nekoliko minuta forsirano diše, pa nakon toga ispitati karakter disajnih pokreta. Sada su disajni pokreti sporiji, manje frekvencije i amplitude;

c) Ispitati dužinu trajanja voljnog obustavljanja disanja i registrovati disajne pokrete nakon toga. Nastaje period vrlo produbljenog i ubrzanog disanja;

d) Ispitati efekat disanja u zatvoreni ograničeni prostor na karakter disajnih pokreta (disanje u kesu). Disajni pokreti postaju sve dublji i frekventniji;

e) Ispitati šta se dešava sa disajnim pokretima pri gutanju (refleksno zaustavljanje disanja).

PROSTOR ZA RAD (zabeležiti zapažanja):

5.5 Auskultacija disajnih šumova

Kretanje vazduha kroz sistem dišnih puteva za vreme inspirijuma i ekspirijuma izaziva izvesne šumove. Nastanak šumova u sistemu respiratornih cevi uslovljen je dejstvom onih istih faktora i na bazi istih fizičkih zakona na osnovu kojih se stvaraju zvuci u šupljini gumene cevi kada se kroz njen lumen propušta tečnost ili gasovi. Kretanje mlaza odvija se nečujno sva dotle dok je brzina kretanja proporcionalna veličini lumena. Kada se taj odnos poremeti, na tom mestu se odmah pojavljuju zvuci.

Od šumova koje možemo čuti pri auskultaciji normalnih organa za disanje razlikujemo:

- ✓ *laringealni stenozni šum*,
- ✓ *vezikularno disanje* i
- ✓ *bronhijalno disanje*.

ZADATAK: Auskultirati laringealni stenozni šum, vezikularno i bronhijalno disanje kod psa i/ili čoveka.

MATERIJAL: Stetoskop.

IZVOĐENJE: Stetoskopom auskultirati laringealni stenozni šum, vezikularno i bronhijalno disanje kod kolege i/ili psa.

Laringealni stenozni šum - Aparat za disanje predstavlja sistem cevi različitog prečnika, gde nagla suženja naizmenično prelaze u znatna proširenja. Uzani lumen nozdrva prelazi u široku nosnu šupljinu koja se dalje nastavlja u uske nosne meatuse. Dalje, veliko proširenje ždrela prelazi naglo u tesnac glasnog otvora iza kojeg se nalazi široka šupljina grkljana. Prema tome, u početnom delu respiratornog aparata jasno su izražena tri suženja od kojih je najjače izraženo suženje glasnog otvora sa naglim prelaskom u veliko proširenje. Intenzitet šumova koji se stvaraju pri prolasku vazduha kroz ova suženja srazmeran je brzini kretanja mlaza vazduha i stepenu suženja. Obzirom da se svi ti zvuci stvaraju istovremeno, oni se stapaju i daju jedan zajednički zvuk nazvan laringealni stenozni šum. Ovaj šum se lako čuje pri auskultaciji traheje. To je jak, jasan zvuk koji ima obeležje tona.

Vezikularno disanje - Zvuk koji se čuje na grudnom košu zdravih životinja po svom kvalitetu predstavlja potpunu suprotnost trahealnom disanju. To je mekani zvuk koji potseća na mekano izgovaranje slova F. Po svemu sudeći, vezikularno disanje pretstavlja jedan složeni zvuk. U njegov sastav ulaze dve komponente. Glavna masa zvuka stvara se u plućnom parenhimu, na mestu prelaza bezbrojnih bronhiola u široke levkaste plućne infundibulume. Sa ovim stenoznim šumom meša se i laringealni stenozni šum. Zvuk koji se čuje za vreme ekspirijuma je kratak i slab. Karakter i intenzitet vezikularnog disanja pokazuje kod domaćih životinja jasne razlike. Zavisi od vrste životinje, telesne građe, oblika grudnog koša, stanja uhranjenosti, starosti i intenziteta metabolizma. Najglasnije je i najoštrije kod mesojeda, a slabije i tiše kod goveda.

Bronhijalno disanje - Kod svih domaćih životinja, izuzev konja, bronhijalno disanje čuje se prilično glasno u predelu lopatice i ramena. Naročito je jasno i jako izraženo kod pasa. U suštini, bronhijalno disanje se smatra ostatkom vezikularnog disanja u čiji sastav ulazi do pluća sprovedeni i rezonancom pojačani laringealni stenozni šum.

PROSTOR ZA RAD (zabeležiti zapažanja):

5.6 Prisustvo CO_2 u izdahnutom vazduhu

Udisanjem, O_2 iz alveolarnog vazduha odlazi u krv, a CO_2 iz dezoksigenisanog hemoglobina prelazi u alveole. U izdahnutom vazduhu koncentracija CO_2 je i do 100 puta veća nego u udahnutom vazduhu (atmosferskom).

ZADATAK: Dokazati prisustvo CO_2 u izdahnutom vazduhu.

MATERIJAL: Stakleni sud, metalni držač za sud, boca ispiralica, vakuum pumpa, 2N rastvor NaOH i $BaCl_2$, pacov, pean, epruvete.

IZVOĐENJE: Uzeti stakleni sud zapremine 500mL, sa zatvaračem na kome se nalaze dva otvora kroz koje izlaze dve staklene cevi. Kraća cev služi za ulazak atmosferskog vazduha, a duža cev je pomoću gumenog nastavka spojena sa staklenom cevi boce ispiralice u koju je sipan 2N rastvor NaOH. Za drugu cev boce ispiralice spojena je vakuum vodena pumpa. Pacov se peanom fiksira za rep i lagano ubaci u stakleni sud i tu ostavi oko 10 minuta. Izdisajni vazduh iz staklenog suda odlazi u bocu ispiralicu. Nakon 10 minuta pacov se vraća u kavez a iz boce ispiralice se sipa u epruvetu oko 3mL rastvora NaOH i tome doda 2mL 2N rastvora $BaCl_2$. Pri sipanju $BaCl_2$ rastvor u epruveti je postao beličast usled nastalog $BaCO_3$. Natrijum-hidroksid je vezao CO_2 iz izdisajnog vazduha i nastao je natrijum-karbonat koji sa barijum-hloridom gradi beo talog usled nastalog barijum-karbonata. Zabeležiti zapažanja.

PROSTOR ZA RAD (zabeležiti zapažanja):

6.0 Fiziologija mišića i perifernih nerava

Mišići (skeletna i glatka muskulatura, srčani mišić) čine nešto više od 50% ukupne telesne mase. Skeletni mišići (poprečno-prugasti), pričvršćeni za kosti skeleta, svojim kontrakcijama i opuštanjem omogućavaju kretanje životinje i održavanje tela u prostoru. Glatka muskulatura u zidu unutrašnjih organa obezbeđuje motoriku i ostale aktivnosti tih organa, a srčani mišić omogućuje ulogu pumpe srca u zatvorenom sistemu cirkulacije.

Osnovna funkcionalna jedinica skeletnog mišića je mišićna ćelija (mišićno vlakno, zbog veoma izdužanog oblika – nekoliko mm do jednog metra). Svako mišićno vlakno je spojeno sa najmanje jednim nervnim završetkom aksona motornog neurona somatskog nervnog sistema, pa se skeletni mišići još nazivaju voljna muskulatura, za razliku od glatke koja je inervisana vegetativnim nervnim sistemom.

Zajednička karakteristika mišićnih ćelija, za razliku od drugih ćelija organizma, jeste prisustvo kontraktilnih proteina u sarkoplazmi koji ulaze u sastav miofibrila, odnosno miofilamenata. Miofibrili su snopovne strukture, postavljeni duž mišićnog vlakna (nekoliko stotina do nekoliko hiljda). Oni su nosioci osnovne funkcije mišićne ćelije, odnosno kontraktilnosti koja potiče od molekula kontraktilnih proteina. Sastoje se iz tankih i debelih filamenata.

Tanki filamenti imaju 3 vrste kontraktilnih proteina (aktin, tropomiozin i troponin), a debeli filamenti samo jedan kontraktilni protein (miozin). Oko svakog debelog filamenta paralelno je postavljeno 6 tankih filamenata koji su u sredini razmaknuti, a postrano su fiksirani za Z-membrane. Deo miofibrila između dve Z-membrane naziva se sarkomera i ona predstavlja osnovnu kontraktilnu jedinicu.

Osnovne karakteristike svih mišića su *elastičnost*, *razdražljivost* i *kontraktilnost*.

✓ Elastičnost se ogleda u mogućnosti istezanja mišića pri dejstvu neke sile i vraćanje na prvobitno stanje po njenom prestanku. Elastičnost je omogućena vezivnotkivnim elementima u strukturi mišića.

✓ Razdražljivost je sposobnost mišića da prihvataju različite vrste nadražaja (električni, mehanički, hemijski, termički) i da na njih odgovaraju kontrakcijom. Razdraženje je ustvari zajednička osobina svih ćelija sa polarizovanom membranom (sve žive ćelije). Na mestu nadražaja (apsorbovane energije) dolazi do lokalne depolarizacije membrane sa nastankom jonske struje (bioenergije) koja u ćeliji pokreće biohemijske procese sa ishodom kontrakcije (u slučaju mišićnih ćelija). Najmanja energija (nadražaj) za izazivanje procesa depolarizacije nazvana je pragom nadražaja. Kod skeletne muskulature svaka mišićna ćelija je inervirana najmanje jednim nervnim završetkom. Grupa mišićnih ćelija inervirana jednim motornim neuronom zove se motorna ćelija. Kada motorni nerv „pošalje“ impuls, sve će se ćelije te motorne jedinice kontrahovati jer je svaki impuls iznad praga (na motornoj ploči izluči se natpražna količina acetilholina). Svaka mišićna ćelija pojedinačno reaguje po zakonu „sve ili ništa“; međutim, jačina kontrakcije jednog mišića zavisi od broja aktiviranih motornih jedinica.

✓ Kontraktilnost je osnovna odlika mišićne ćelije, što je ustvari sposobnost da ona po prijemu nadražaja (nervnog impulsa) reaguje kontrakcijom. Kontrakcija se odvija u obliku skraćivanja dužine, a bez izrazite promene tonusa (izotonusna kontrakcija), ili sa povećanjem napona, a bez promene dužine (izometrijska kontrakcija). Kontrakcija je veoma složen proces u toku kojeg se odigravaju bioelektrične, biohemijske i mehaničke promene.

Za ispitivanje funkcije mišića i nerava koriste se izolovani preparati mišića sa pripadajućim motornim nervom.

6.1 Preparacija galvanoskopske noge, neuromišićnog i mišićnog preparata

Najčešće se za eksperimente na skeletnim mišićima u praktikumu koristi žablji mišićni preparat (*m. gastrocnemius*) koji je isprepariran iz zadnjeg ekstremiteta žabe zajedno sa distalnim delom butne kosti oslobođene od mišića. Zavisno od toga kakve je prirode ogled koji će se izvoditi moguće je ispreparirati 3 vrste preparata:

✓ *Galvanoskopska noga*: sastoji se od distalnog dela femura, femorotibijalnog zgloba i svih struktura distalno od ovog zgloba do stopala, uključujući *m. gastrocnemius* i njegov motorni nerv (*n. ishiadicus*). Ovaj preparat se koristi kada želimo kontrakciju neuromuskularnog preparata samo posmatrati, bez registrovanja na kimografu;

✓ *Neuromuskularni preparat*: distalni deo razgolićene butne kosti sa očuvanom inzercijom i čitav *m. gastrocnemius* sa *n. ishiadicusom* (koristi se kada želimo registrovati mišićnu kontrakciju);

✓ *Mišićni preparat*: kao prethodni preparat ali bez nerva.

Skicirati preparate sa modela:

ZADATAK: Preparirati preparate: galvanoskopska noga, neuromišićni preparat i mišićni preparat.

MATERIJAL: žaba, makaze, pincete (male i velike), konac za ligature, ploča za preparaciju, papirna vata, Ringerov rastvor, kapaljke, Galvanijeva viljuška (najprostiji električni element izgrađen od dve male limene pločice, jedna od bakra a druga od cinka).

IZVOĐENJE: Za obavljanje ogleda na neuromuskularnim preparatima nije potrebno sačuvati CNS pa je stoga početak preparacije vezan za dekapitaciju i razaranje kičmene moždine. Uzeti žabu u levu ruku pri čemu je obavijemo parčetom krpe tako da joj je slobodna samo glava; jedan krak makaza se uvuče u usta i povuče skroz unazad i odreže gornja čeljust. U kičmeni kanal uvući metalnu sondu što dublje i njenim rotiranjem razoriti kičmenu moždinu.

Većim makazama poprečno preseći trup odmah iza prednjih ekstremiteta. Jednom rukom uhvatiti prerezani kraj trupa za kičmeni stub, a drugom kožu na presečenom kraju i snažnim povlačenjem prema dole svući kožu sa trupa i zadnjih ekstremiteta. Čitav preparat sa dorzalnom stranom nadole staviti na ploču za prepariranje. Oprati ruke i pribor zbog štetnih materija koje se nalaze na koži kao rezultat produkcije kožnih žlezda.

Skicirati postupak sa modela:

Počev od simfize, makazama rezati mišiće trbušnog zida uz lateralni rub ilijačnih kostiju (levo i desno), odstraniti ih, te picetom izvući sve unutrašnje organe pazeći da se pri tome ne uhvate i oštete živci koji izlaze iz lumbo-sakralnog dela kičmenog stuba.

Pod živčane snopove, najpre jedne, a zatim i druge strane, podvući stisnutu malu pincetu i laganim pomeranjem duž snopa osloboditi živce od okolnog tkiva (živce nikako ne štipati i ne gnječiti).

Povući konac ispod lumbosakralnog spleta posebno s jedne i druge strane i čvrsto podvezati što bliže korenu (pri ovome se zapaža trzaj muskulature ekstremiteta, što je znak da je živac funkcionalno sačuvan).

Izvršiti presecanje živca između ligature i njegovog korena. Stalnim držanjem živca preko konca izvesti odvajanje od podloge sve do prepone i prebaciti ga na prednju stranu buta (prvo jedan pa drugi živac).

Skicirati postupak sa modela:

Uhvatiti čitav preparat levom rukom, previti ga u karličnom predelu tako da se trtična kost isturi prema gore, ona se makazama preseče, a u nastali otvor uvuče se jedan vrh makaza i vrši obrezivanje muskulature uz unutrašnji rub ilijačnih kostiju (sve vreme paziti da u makaze na upadne živac). Oba nastavka ilijačnih kostiju palčevima razmaknuti u stranu.

Skicirati postupak sa modela:

Daljni tok *n. ishiadicusa* ide po dorzalnoj strani buta u jednom žlebu prekrivenom butnom muskulaturom. Njegova preparacija se vrši tupo - pomoću prstiju. Razdvojiti mišiće i osloboditi žleb u kojem leži živac i lagano, držeći za konac, povlačiti ga i odvajati od okolnog tkiva i ogranaka koji su usmereni od glavnog stabla ka okolnoj muskulaturi.

Živac je sada slobodan sve do femorotibijalnog zgloba (kolena) i prebacuje se preko podkolenice.

Butnu kost makazama osloboditi od preostalog mišićnog tkiva i kost preseći na granici između gornje i srednje trećine. Isti postupak ponoviti i sa drugim preparatom.

Skicirati postupak sa modela:

Tako dobijen preparat se zove *galvanoskopska noga*. U cilju zaštite preparata od sušenja i gubljenja fizioloških svojstava živca, treba ga do upotrebe držati umotanog u filter papir navlažen Ringerovim rastvorom.

Priprema neuromišićnog preparata obuhvata i nastavlja se na preparaciju galvanoskopske noge. U toku dalje preparacije potrebno je izdvojiti m. gastrocnemius sa motornim živcem (n. ishijadicus). Pincetom uhvatiti Ahilovu tetivu i makazama je preseći ispod hrskavičavog dela.

Odvojiti je makazama od njene podloge iznad skočnog zgloba. M. gastrocnemius se sve do kolena od podloge odvaja jednostavnim povlačenjem za tetivu. Na gornjem kraju preseći femorotibijalni zglob pazeći da nerv ne dospe u otvor makaza - na taj način je dobijen preparat m. gastrocnemiusa s inzercijom na distalnom delu delu butne kosti i s pripadajućim živcem – taj preparat se naziva *neuromuskularni preparat*.

Skicirati postupak sa modela:

U cilju provere uspešnosti i ispravnosti preparacije može se živac dodirnuti Galvanijevom viljuškom nakvašenom Ringerom i ukoliko je preparat ispravan, doći će do kontrakcije mišića.

Preparat držati u filter papiru navlaženom Ringerovim rastvorom.

Preparaciju *mišićnog preparata* izvesti kao što je opisano napred, samo izostaviti prepariranje živca.

6.2 Direktno i indirektno draženje mišića

U fiziološkim uslovima, *in vivo*, mišići se nadražuju preko impulsa iz nervnih završetaka. Prilikom eksperimenata na neuromišićnom preparatu, mišić može da se nadraži indirekno (razdraživanjem nerava) ili direktno (draženjem mišićnih vlakana). Ukoliko elektrode postavimo direktno na m. gastrocnemius i preko stimulatora obavimo razdraženje doći će do kontrakcije mišića. Međutim, ova kontrakcija nije rezultat direktnog razdraženja mišićnih vlakana nego nervnih vlakana razgranatih u mišiću. Nervna vlakna imaju niži prag nadražaja, osetljivija su od mišićnih vlakana, prva se razdraže i prenesu impuls do mišićnih vlakana. Direktno draženje mišića moguće je ostvariti onda ako se prethodno isključi mogućnost transmisije (prenosa) nadražaja sa nervnog završetka na mišićnu ćeliju (blokada motorne ploče). To se postiže *kurareom* koji se vezuje za acetilholinske receptore na postsinaptičkoj membrani motorne ploče.

ZADATAK: Na nekurarizovanom i kurarizovanom neuromišićnom preparatu izvršiti indirektno i direktno nadraživanje mišića.

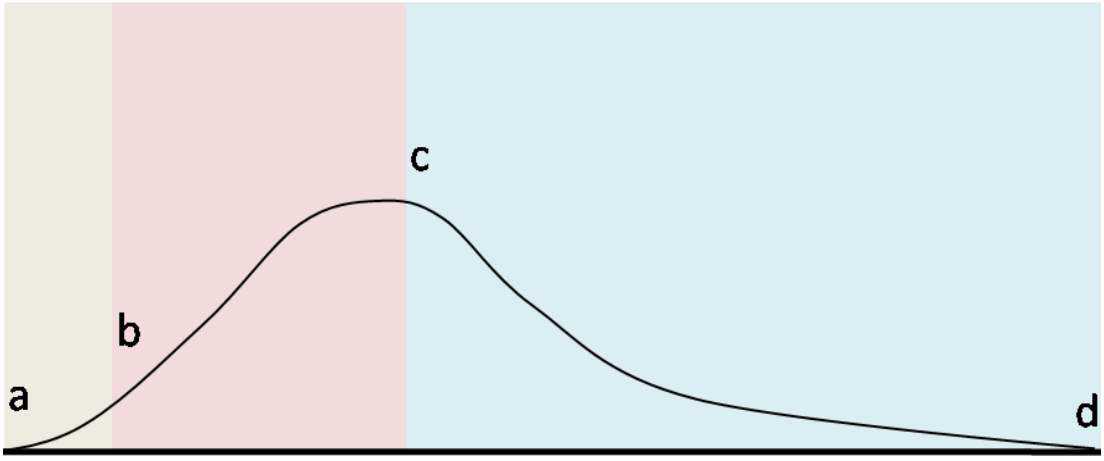
MATERIJAL: Sve kao u vežbi 6.1, elektrostimulator, elektrode, stativ za pričvršćivanje preparata, rastvor d-tubokurarina, špric, igla.

IZVOĐENJE: U leđnu limfnu kesu žabe ubrizgati 1-1,5 mL 15 rasvora d-tubokurarina. 20-30 minua nakon toga žaba će biti paralizovana, nepokretna (zbog blokade motornih ploča). Ispreparisati galvanoskopsku nogu i postaviti je na ploču za preparisanje. Pripremiti uređaj za podraživanje (elektrostimulator) i elektrode postaviti prvo na n. ishiadicusu, a zatim direktno na mišić i dražiti frekventnim (učestalim) nadražajima. Zapaziti da li će kontrakcija mišića izostati u slučaju draženja živca (indirektno draženje) ili pri direktnom draženju mišića. Zabeležiti zapažanja.

PROSTOR ZA RAD (zabeležiti zapažanja):

6.3 Prosta mišićna kontrakcija

Kada na mišić delujemo samo jednim pojedinačnim mišićnim nadražajem dovoljne jačine (prag), kao odgovor dobijamo jednu mišićnu kontrakciju koja se naziva *prosta mišićna kontrakcija* ili jednostavni trzaj. Međutim, u organizmu, fiziološki, uglavnom ne dolazi do ovakvih kontrakcija. One se javljaju samo u eksperimentalnim uslovima i služe za bliže analize toka mišićne kontrakcije. Potrebno je imati u vidu da u organizmu mišići svoju funkciju pretežno obavljaju tzv. složenim kontrakcijama koje nastaju sumacijom pojedinačnih prostih mišićnih kontrakcija (videti u narednim vežbama). Prosta mišićna kontrakcija žabljeg mišićnog preparata traje ukupno 0,1 sekundu i sastoji se iz tri dela (slika 6.1).



Slika 6.1: Prosta mišićna kontrakcija

(**a** trenutak razdraženja, **a**-**b** latentni period, **b**-**c** aktivna faza, **c**-**d** pasivna faza)

Latentni period traje oko 0,01 sekundu i predstavlja period od momenta razdraženja nerva do početka skraćivanja (kontrakcije) mišića. Ovaj period podrazumeva sledeća dešavanja: draženje motornog nerva, prostiranje impulsa kroz nerv do neuromišićne sinapse i procese u sinapsi, prostiranje impulsa u mišićnoj membarani i tubularnom sistemu, aktiviranje sarkomere sve do vidljivog dela skraćenja mišića.

Aktivna faza kontrakcije traje 0,04 sekunde i obuhvata procese klizanja filamenata u sarkomerama.

Pasivna faza kontrakcije traje oko 0,05 sekundi. To je faza dekontrakcije i u to vreme se odvijaju procesi relaksacije mišića.

ZADATAK: Registrovati i analizirati prostu mišićnu kontrakciju.

MATERIJAL: Pribor za preparaciju neuromuskularnog preparata žabe, komorica za izolovani mišić sa elektrodama i polugom za registrovanje, kimograf, elektrostimulator, Ringerov rastvor, kapaljke.

IZVOĐENJE: Pripremiti elektrostimulator za draženje pojedinačnim nadražajima sa kimografom kao prekidačem u primarnom kolu struje. Postaviti neuromišićni preparat u komoricu ispunjenu Ringerovim rastvorom, polugu za registrovanje prisloniti uz hartiju kimografa i slobodnom vrtnjom okrenuti doboš za čitav krug, vodeći računa da poluga ostavi trag čitavom dužinom kruga. Na taj način se dobija bazalna linija.

Prebaciti živac preko elektroda i ustanoviti na elektrostimulatoru jačinu nadražaja pri kojoj je efikasno draženje samo pri otvaranju primarnog kola struje. Podesiti na kimografu automatski prekidač i aplicirati pojedinačni nadražaj. Mišić će reagovati jednom kontrakcijom i pošto se kimograf ne okreće, na hartiji će biti ocrtana uspravna linija (tačka **a**) koja predstavlja momenat razdraženja.

Rukom lagano zavrteti doboš kimografa, kada prođe čitav krug zatvoriće se i otvoriti kolo struje kod tačke **a**, ali će se zapis kontrakcije razvući i dobićemo celu krivu proste mišićne kontrakcije sa svim njenim elementima. Zapis precrtati i izvršiti njegovu analizu.

Izgled krive proste mišićne kontrakije se menja ako je mišić zamoren. Da bi to uočili i dokazali potrebno je mišić podražavati oko dva minuta učestalim nadražajima pa nakon toga opet registrovati na istom mestu kao i prethodno, prostu mišićnu kontrakiju. Opisati i analizirati nastale promene.

PROSTOR ZA RAD:

Zapis sa kimografa:

ZAKLJUČAK:

6.4 Minimalna i maksimalna mišićna kontrakcija

Ako se skeletni mišić draži pojedinačnim nadražajima sve većeg i većeg intenziteta on će odgovarati sve većom kontrakcijom. To nije slučaj sa srčanim mišićem jer on reaguje po zakonu „sve ili ništa“. Međutim, draženjem jednog jedinog mišićnog vlakna skeletnog mišića nadražajem pražne jačine moguće je dokazati da se i ono ponaša po ovom zakonu. Razlog zašto skeletni mišić, kao celina, reaguje na opisan način je u tome što je on građen od velikog broja mišićnih vlakana koja pojedinačno imaju različit prag osetljivosti, tako da se povećanjem intenziteta nadražaja povećava broj vlakana uključenih u kontrakciju.

ZADATAK: Registrovati uticaj jačine pojedinačnog nadražaja na snagu kontrakcije neuromuskularnog preparata žabe.

MATERIJAL: Neuromuskularni preparat žabe i sve što je navedeno u prethodnoj vežbi (6.3).

IZVOĐENJE: Ispreparisati neuromuskularni preparat žabe. Postaviti preparat u komoricu ispunjenu Ringerovim rastvorom, živac prebaciti preko elektroda, polugu za registrovanje opteretiti tegom od 10g a polugu za registrovanje prisloniti uz doboš kimografa koji je podešen na slobodnu vrtnju. Okrenuti doboš za čitav krug da bi se dobio zapis bazalne linije.

Elektrostimulator podesiti na nulti intenzitet struje. Zatvaranjem i otvaranjem kola struje utvrditi da je intenzitet nadražaja preslab da izazove kontrakciju mišića. Nadražaj ispod praga osetljivosti se označava kao *subminimalni nadražaj*.

Postepeno povećavati jačinu struje sve do onog intenziteta kada se u jednom momentu pri otvaranju kola struje pojavi mala kontrakcija (vidi se zapis na kimografu). Ovo je *minimalna kontrakcija* koja se dobija *minimalnim nadražajem* (*prag razdraženja*).

Doboš kimografa pomaknuti za oko 1cm i malo povećati jačinu nadražaja pa zatvoriti i otvoriti kolo struje. Visina zapisa je veća zbog snažnije kontrakcije mišića. Celu prethodnu proceduru ponavljati sve dok povećanje jačine struje (nadražaja) ne bude više izazivalo povećanje zapisa na kimografu, tj. kada se snaga mišićne kontrakcije više ne povećava iznad maksimalno dostignute, bez obzira na povećanje jačine nadražaja.

Prva u nizu dobijenih kontrakcija posle koje ne dolazi više do povećanja snage kontrakcije naziva se *maksimalna kontrakcija*, a intenzitet nadražaja koji je ovu kontrakciju izazvao naziva se *maksimalni nadražaj*.

Nadražaji i kontrakcije koji se nalaze u području između minimalnih i maksimalnih nazivaju se *submaksimalni nadražaji* i *submaksimalne kontrakcije*.

Maksimalna kontrakcija je postignuta onog trenutka kada je jačina nadražaja bila tolika (maksimalni nadražaj) da su se sva pojedinačna mišićna vlakna nadražila i kontrahovala.

Sa kimografa precrtati zapis i analizirati ga.

PROSTOR ZA RAD:

Zapis sa kimografa:

ZAKLJUČAK:

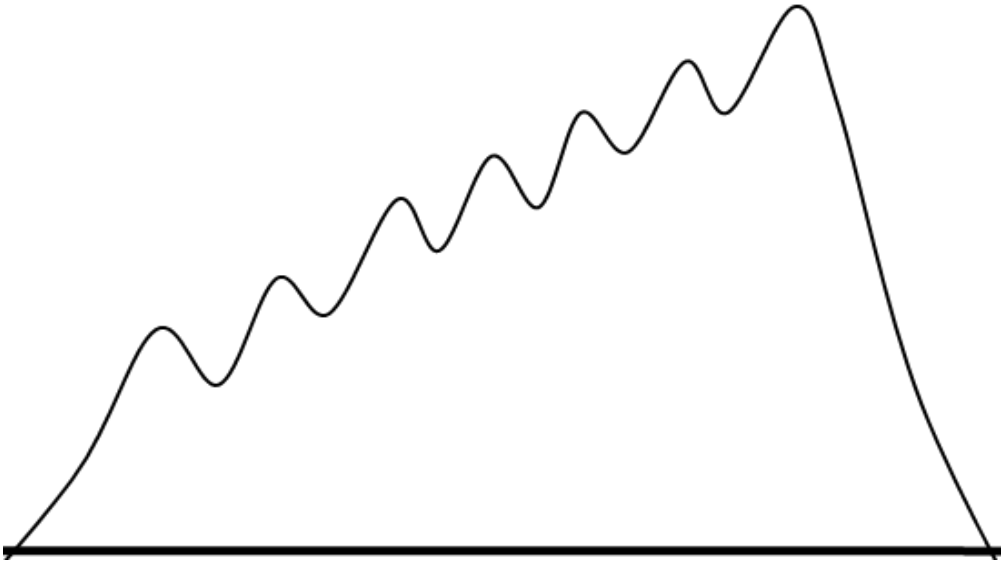
6.5 Složena mišićna kontrakcija – tetanus

Skeletni mišić na pojedinačan nadražaj pražne vrednosti reaguje jednostavnim trzajem – prostom mišićnom kontrakcijom. Ako se u kratkom vremenskom razmaku apliciraju dva ili više nadražaja, dolazi do sumacije, odnosno *složene mišićne kontrakcije* ili *tetanusa*. Ovo je moguće zbog toga što period refraktarnosti (neosetljivosti mišića na nadražaj) traje veoma kratko (do 0,01 sekundu – latentni period). Znači, ako drugi (sledeći) nadražaj usledi u periodu između latentnog perioda i završetka čitave proste mišićne kontrakcije (za žablji mišić oko 0,1 sekundu), mišić će se ponovo kontrahovati.

Ako je nadražaj apliciran u aktivnoj fazi, mišić će produžiti kontrakciju, ona je jača i to će biti sumirana kontrakcija sa jednim vrhom. Ukoliko drugi nadražaj usledi u pasivnoj fazi, mišić se odmah kontrahuje i dolazi do sumirane kontrakcije sa dva vrha. Kriva druge kontrakcije je utoliko više, ukoliko drugi nadražaj stiže ranije u odnosu na početak relaksacije.

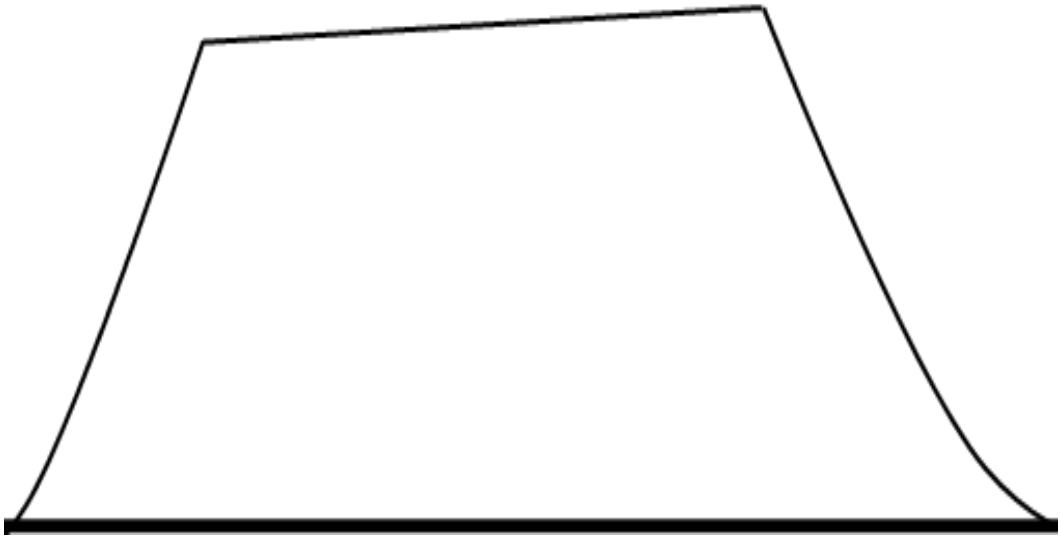
Skeletni mišići u fiziološkim uslovima, odnosno u organizmu, primaju preko nerava iz motornih centara iz CNS serije impulsa u kratkim vremenskim intervalima (dakle, ne jedan ili dva impulsa) sa frekvencijom najčešće oko 50Hz. Svaki od impulsa izaziva kontrakciju, one se sumiraju (stapaju) i dolazi do pojave složene mišićne kontrakcije ili tetanusa.

Kada u seriji impulsa (nadražaja) svaki sledeći pada u vreme relaksacije prethodne kontrakcije, razviće se *zupčasti* ili *nepotpuni tetanus* (slika 6.2).



Slika 6.2: Nepotpuni (zupčasti) tetanus

Potpuni tetanus nastaje kada je učestalost nadražaja veća i kada svaki sledeći nadražaj pada u aktivnoj fazi kontrakcije prouzrokovane prethodnim nadražajem i one se sumiraju (slika 6.3).



Slika 6.3: Potpuni tetanus

ZADATAK: Registrovati nepotpuni i potpuni tetanus neuromišićnog preparata žabe.

MATERIJAL: Neuromišićni preparat žabe i sve navedeno za izvođenje prethodne vežbe.

IZVOĐENJE: Isprepariran neuromuskularni preparat postaviti u komoricu napunjenu Ringerovim rastvorom, živac postaviti na elektrode, polugu za registrovanje prisloniti uz doboš kimografa, napraviti bazalnu liniju i podesiti kimograf na sporu vrtnju. Podesiti frekvenciju na elektrostimulatoru na 5-7 Hz i dražiti nerv, zatim podesiti frekvenciju na 30-40 Hz i dražiti nerv, i na kraju, podesiti frekvenciju na 100 Hz i dražiti nerv. Precrtati i analizirati dobijene zapise.

PROSTOR ZA RAD:

Zapis sa kimografa:

ZAKLJUČAK:

6.6 Sekundarna mišićna kontrakcija

Pri svakoj kontrakciji mišića, ili malo pre nje, javljaju se neke druge pojave kao što su hemijske, termičke i električne. Prema tome, mišićnoj kontrakciji prethodi depolarizacija mišićnih membrana. Ovaj talas elektronegativnosti (akcioni potencijal) širi se od mesta motorne ploče na celu površinu mišićne ćelije, što konačno dovodi do oslobađanja jona Ca koji difunduju u sarkoplazmu i uključuju biohemijski proces koji dovodi do mehaničkih dešavanja – kontrakcije mišića. Akcione struje, koje prethode mišićnoj kontrakciji, moguće je registrovati ne samo specijalnim instrumentima, nego i jednostavno dokazujući tzv. sekundarnu kontrakciju.

ZADATAK: Dokazati akcione struje u skeletnom mišiću pomoću sekundarne mišićne kontrakcije.

MATERIJAL: Materijal kao u prethodnoj vežbi, dva neuromuskularna preparata žabe, elektrostimulator za pojedinačne i frekventne nadražaje, elektrode i staklena ploča.

IZVOĐENJE: Ispreparirati dva neuromuskularna preparata žabe i postaviti ih jedan pored drugog na suvu staklenu ploču. Živac jednog preparata (primarnog preparata) staviti na bakarne elektrode, a živac drugog preparata (sekundarni preparat) staviti na mišić primarnog preparata tako da ga dodiruje svojim presečenim delom.

Pojedinačnim nadražajem dražiti živac primarnog preparata i istovremeno posmatrati reakciju sekundarnog preparata. Podesiti stimulator na frekventne nadražaje i tetanizirati primarni preparat i zapaziti reakciju sekundarnog preparata.

U ovom ogledu je sekundarni preparat poslužio kao galvanometar koji pokazuje pojavu akcionih struja u nadraženom primarnom preparatu jer su te bioelektrične struje sa primarnog preparata prenese na nerv sekundarnog preparata i on se istovremeno kontrahuje sa primarnim.

Da se ne radi o jednostavnom prenosu izvorne električne struje može se dokazati podvezivanjem živca sekundarnog preparata ili njegovim fiziološkim razaranjem pomoću amonijaka. Nakon toga, ponavljaju se navedeni postupci. Ovog puta će izostati i pojedinačna kontrakcija i tetanus sekundarnog preparata, dok će primarni preparat ispoljavati kontrakcije. To znači da se tu radi o bioelektričnim (akcionim) strujama primarnog mišića koje pokreću talas depolarizacije u živcu sekundarnog mišića ali taj talas se ne može raširiti zbog fiziološkog prekida (razaranja) nerva. To znači da se živac ne ponaša kao obični provodnik elektriučne struje.

PROSTOR ZA RAD (zabeležiti zapažanja):

ZAKLJUČAK:

6.7 Rastegljivost i elastičnost mišića

Jedna od važnih karakteristika mišića jeste elastičnost. Svoju elastičnost mišići manifestuju, pored ostalog, i time što se pod dejstvom opterećenje istežu, a posle rasterećenja ponovo vraćaju u prvobitni položaj. Elastičnost je moguća zahvaljujući vezivno-tkivnim elementima koji ulaze u sastav mišića. Međutim, mišići ne predstavljaju idealno elastični materijal.

ZADATAK: Uporediti krive istezanja skeletnog mišića i približno idealno elastičnog materijala (gumene trake).

MATERIJAL: Muskularni preparat žabe, komorica za izolovani mišić, gumena traka, tegovi, kimograf.

IZVOĐENJE: Staviti mišićni preparat u komoricu i povezati ga sa polugom za registraciju koja je prislonjena uz doboš kimografa. Na kimografu ispisati bazalnu liniju. Polugu zatim opteretiti tegom od 10g i kimograf rukom pokrenuti za oko 1cm. Polugu opterećivati sve više okrećući doboš kimografa rukom nakon svakog novog opterećenja. Nakon što su upotrebljeni svi tegovi, postepeno smanjivati opterećenje poluge i registrovati na kimografu promene dužine mišića. Kada su skinuti svi tegovi, izvaditi mišić iz komorice i zameniti ga gumenom trakom, pa ponoviti ogled kao i sa mišićem.

Nakon potpunog rasterećenja poluge, kada je ona bila povezana sa mišićem, njen vrh se nije vratio na isti nivo sa kojeg je krenuo nakon početka opterećivanja (bazalna linija), a jeste kada je u komorici bila gumena traka. Iz toga proizilazi da je rad koji izvrši mišić pri rasterećenju manji od rada koji je izvršen za njegovo istezanje. Razlika između jednog i drugog rada predstavlja onaj deo energije koji je degradiran u toplotu. Ova razlika potiče otuda što mišić nije idealno elastično telo, već ispoljava, pored elastične, i viskoznu komponentu.

PROSTOR ZA RAD (zabeležiti zapažanja):

ZAKLJUČAK:

LITERATURA

1. Branstorm M.J.: Interactive Physiology: cardiovascular system. A.D.A.M. software, Inc. and Benjamin/Cummings Publishing, 1996.
2. Branstorm M.J.: Interactive Physiology: muscular system. A.D.A.M. software, Inc. and Benjamin/Cummings Publishing, 1996.
3. Branstorm M.J.: Interactive Physiology: respiratory system. A.D.A.M. software, Inc. and Benjamin/Cummings Publishing, 1996.
4. Cunningham J.G.: Textbook of Veterinary Physiology. Third Edition. W.B. Saunders Company, USA, 2002.
5. Đuričić I.: Fiziološki praktikum. V izdanje. Naučna knjiga Beograd, Srbija, 1978.
6. Experimental Physiology. Natural Sciences Tripos and Medical and Veterinary Sciences Tripos, University of Cambridge, UK, 1997.
7. Guyton A.C., Hall J.E.: Medicinska fiziologija (prevod). 11. izdanje. Medicinska naklada Zagreb, Hrvatska, 2006.
8. Joksimović-Todorović M., Božić A.: Praktikum iz fiziologije domaćih životinja. Poljoprivredni fakultet Zemun i Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Beograd – Novi Sad, Srbija, 2002.
9. Krnić J., Hodžić A.: Osnovi primenjene fiziologije u veterinarskoj medicini. Veterinarski fakultet Sarajevo, Sarajevo, BiH, 2008.
10. Rebar A.H., MacWilliams P.S., Feldman B.F., Metzger F.L., Pollock R.V.H., Roche J.: IDEXX Laboratories Guide to Hematology in Dogs and Cats. Teton NewMedia, USA, 2002.
11. Reece W.O.: Physiology of Domestic Animals. Lea & Febiger Ltd, USA and UK, 1991.
12. Savić V., Stojić V.: Praktikum iz fiziologije. ITP Naučna d.o.o., Beograd, Srbija, 1999.
13. Sjaastad Q.V., Hove K., Sand O.: Physiology of Domestic Animals. Scandinavian Veterinary Press, Norway, 2003.
14. Stojić V.: Veterinarska fiziologija. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. Naučna KMD Beograd, Srbija, 2004.
15. Swenson M.J.: Dukes Physiology of Domestic animals, Tenth Edition. Cornell University Press, USA, 1984.

O autoru

Dr Zdenko Kanački rođen je 15. avgusta 1977. godine u Pančevu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 1996., a diplomirao 2002. godine sa prosekom 9,70. Poslediplomske, magistarske studije upisao je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu 2002. godine, a magistarsku tezu odbranio je 2006. godine. Doktorsku disertaciju odbranio je 2011. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu. Kao student postdiplomac i stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije uključen je u nastavni proces i naučno-istraživački rad na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu od 2002. godine. Od 2004. godine zaposlen je na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, na Departmanu za veterinarsku medicinu, u zvanju asistenta pripravnika, a u zvanje asistenta je izabran 2009. godine. Doc. dr Zdenko Kanački je izabran u zvanje docenta za užu naučnu oblast Anatomija, histologija i fiziologija životinja 2011. godine. Do sada je objavio 61 naučno-istraživački rad. Kao istraživač učestvovao je u realizaciji 6 projekata. Stručno usavršavanje je obavio na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu. Član je Etičke komisije Univerziteta u Novom Sadu.

Iz recenzija

Praktikum u potpunosti ispunjava kriterijume koje zahtevaju standardi izvođenja praktične nastave iz veterinarske fiziologije. Posebno mjesto u rukopisu zauzimaju detaljni opisi izvođenja vežbi na oglednim životinjama što omogućava studentima da ovaj deo nastave mogu izvoditi pomoću alternativnih metoda (kompijuterske simulacije, prikazi i modeli). Po obimu i sadržaju, prema stilu pisanja i naučnim činjenicama, prema svrsishodnosti i značaju za veterinarsku fiziologiju i studiju veterinarske medicine, ovo delo predstavlja odličan praktikum za izvođenje vežbi iz nastavnog predmeta Fiziologija 1. Praktikum je u potpunosti prilagođen i namijenjen studentima studijskog programa Veterinarske medicine. Pored studenata navedenog studijskog programa, praktikum će biti od koristi i studentima bioloških i biotehničkih nauka, kako u dodiplomskom, tako i u postdiplomskom studiju.

Prof. dr Josip Krnić, Sarajevo, BiH

Praktikum iz Fiziologije napisan je prema planu i programu predmeta na integrisanim studijama na studijskom programu Veterinarska medicina na Poljoprivrednom fakultatu u Novom Sadu. Praktikum je napisan jasnim stilom, sistematično, polazeći od osnovnih postulata iz oblasti fiziologije. Kada se student upozna sa fiziološkim osnovama pojedinih organskih sistema, u praktikumu se daje pregled potrebnog materijala i način izvođenja ogleda kojima se mogu proveriti i dokazati navedene činjenice. Nakon svakog ogleda, studentu se ostavlja mogućnost postepene analize dobijenih rezultata i samostalnog donošenja zaključka. Obzirom da je materija predstavljna na jedan jezgrovit, ali krajnje informativan i primenljiv način i da je dat precizan i postupan opis praktičnog izvođenja važbi iz ove nastavne materije, preporučujem da se ovaj praktikum štampa, što će upotpuniti i poboljšati izvođenje nastave i proces učenja.

Doc. dr Slobodan Stojanović, Novi Sad, Srbija.

ISBN 978-86-7520-317-9