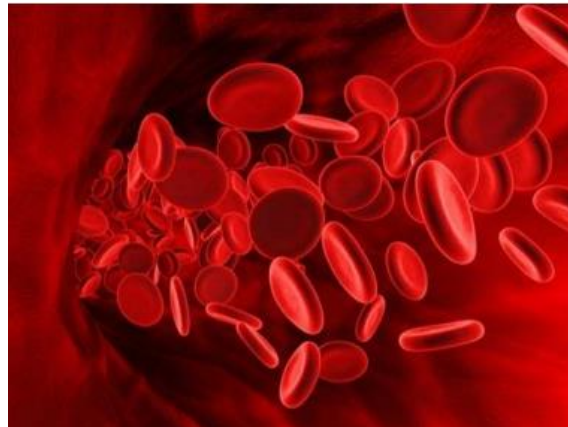


INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE

**MEDIZINISCHES
GRUNDLAGENPRAKTIKUM
FÜR BIOCHEMIKER**

PHYSIOLOGIE DES BLUTES



INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	3
Sammeltabelle	4
1 Einleitung	5
2 Blutentnahme	6
3 Hämatokrit	7
4 Hämoglobinkonzentration	8
5 Erythrozyten- und Leukozyten-Konzentration	12
6 Erythrozyten-Indizes	17
7 Blutgruppen	19
8 May-Grünwald-Färbung	22

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EDTA	di-Kaliumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Hkt	Hämatokrit
Hb	Hämoglobin
[Hb]	Hämoglobinkonzentration
O₂	Sauerstoff
Met-Hb	Methämoglobin
CO	Kohlenmonoxyd
C_E	Erythrozytenkonzentration
C_L	Leukozytenkonzentration
MCV	Mittleres corpusculäres Volumen (Mittleres Volumen eines Erythrozyten)
MCH	Mittleres corpusculäres Hämoglobin (Mittlere Hämoglobin-Masse eines Erythrozyten)
MCHC	Mittlere corpusculäre Hämoglobinkonzentration (Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten)
Rh	Rhesus
E_{ox}	Extinktion des oxygenierten Hämoglobins
E_{deox}	Extinktion des desoxygenierten Hämoglobins
E_{Patient}	Extinktion des Hämoglobins des Patienten
[Hb_{ox}]	Konzentration des oxygenierten Hämoglobins
[Hb_{deox}]	Konzentration des nicht oxygenierten Hämoglobins

SAMMELTABELLE

Test	Ergebnis	Einheit
Hkt		(Fraktion)
[Hb]		g/L
C _E		Erys / μ l Blut
C _L		Leukos/ μ l Blut
MCV		fl
MCH		pg
Blutgruppe: AB0-System:	<u>Agglutinations-Muster:</u> 0 A B <u>Blutgruppe:</u>	-
Blutausstrich <i>(welche Blutzellen konnten identifiziert werden?)</i>		-

ERGÄNZUNG

Bruchteile und Vielfache von Einheiten

10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹²	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁶	10 ⁹	10 ¹²
f	p	n	μ	m	c	d	da	h	k	M	G	T
Femto	Pico	Nano	Mikro	Milli	Zenti	Dezi	Deka	Hekto	Kilo	Mega	Giga	Tera

1 Einleitung

Als mobiles Gewebe, das alle Organe miteinander funktionell verbindet, erfüllt das Blut wichtige Aufgaben des **Stofftransports**, der **Homöostase des „Milieu interieur“**, der **Abwehr körperfremder Stoffe** und der **Signalübermittlung**. Das Praktikum befasst sich mit einigen praktisch-klinisch wichtigen Teilaspekten dieser Funktionen.

Zur Vorbereitung des Praktikums sollten Sie sich mit den folgenden Themen vertraut machen:

- ⇒ Blut: Funktionen und Bestandteile (Blutplasma, Blutzellen)
- ⇒ Blutzellen: Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten (Aussehen, Bildung (→Hämatopoese), Funktionen; May-Grünwald-Färbung)
- ⇒ Differentialdiagnostik (Erythrozytenparameter, Anämie)
- ⇒ Hämoglobin, Sauerstofftransport
- ⇒ Blutgruppen (ABO-System, Rhesussystem)
- ⇒ Antikörper (insbesondere IgM und IgG)

Dieses Skript gibt zu jeder Aufgabe einen **kurzen** theoretischen Überblick, sowie eine Anleitung der Versuchsdurchführung und der Auswertung. Ihre Messergebnisse tragen Sie bitte in die Sammeltabelle ein.

Mitzubringen sind:

- Kittel
- Taschenrechner
- Lineal

Kittel und Handschuhe müssen während der gesamten Versuchsdurchführung getragen werden!

2 Blutentnahme

⇒ Sicherheitsbelehrung für die Verwendung von Humanblut

Für die Bestimmung des Hämatokrits und für die Blutgruppentests wird Kapillarblut aus der Fingerbeere verwendet, welches von den Studierenden selbst gewonnen wird. Bei der Verwendung von Humanblut muss sehr sorgfältig vorgegangen werden, da dieses Blut ein potenzielles Risiko für alle anderen PraktikantInnen darstellt. Daher darf die Durchführung des Blutausstrichs nur unter Einhaltung strikter Sicherheitsbestimmungen erfolgen:

Kittel und Handschuhe müssen während der gesamten Versuchsdurchführung getragen werden.

1. Alle Gegenstände, die mit dem ungetesteten Blut in Berührung gekommen sind, müssen so gehandhabt werden, dass keine anderen Personen mit dem Blut in Kontakt kommen können. Das gilt insbesondere für die verwendeten Lanzetten! Wegen der Verletzungsgefahr sind die Lanzetten sofort nach Gebrauch in die dafür vorgesehenen Abfallbehälter zu entsorgen.
2. Die angestochene Fingerkuppe muss sofort nach der Blutabnahme mit einem Pflaster geschützt werden.
3. Studierende, die darüber informiert sind, dass sie HIV-positiv sind oder an einer Form von Hepatitis erkrankt sind, dürfen den Blutausstrich nicht mit Eigenblut, sondern nur mit dem bereitgestellten Blut aus der Blutbank durchführen.
4. Studierende, die davon ausgehen, dass Ihnen beim Anstechen der Fingerkuppe übel wird, sollten ebenfalls auf das bereitgestellte Humanblut zurückgreifen.
5. Die Nutzung des Eigenbluts ist absolut freiwillig; zur Wahrung Ihrer Persönlichkeitsrechte müssen Sie keine Begründung für Ihre Wahl angeben!

Sie werden im Verlauf des Praktikums gebeten mit Ihrer Unterschrift zu bestätigen, dass Sie obige Belehrung zur Kenntnis genommen haben.

3 Hämatokrit (Hkt)

Den prozentualen Anteil der Blutzellen am Blutvolumen bezeichnet man als Hämatokrit. Da die zellulären Bestandteile zu über 99% aus Erythrozyten bestehen, wird der Hämatokrit auch als der prozentuale Anteil der Erythrozyten am Blutvolumen bezeichnet. In der Regel wird er aus EDTA-Blut durch Zentrifugation ermittelt. Dabei sedimentieren die Erythrozyten zu einer dicht gepackten Zellmasse, in deren Zwischenräumen nur noch 1 - 2% Plasma eingeschlossen ist. (Dieses eingeschlossene Plasma ergibt einen um einige Prozent zu hohen Hkt). An der Grenze zwischen Erythrozytensediment und Plasmaüberstand befindet sich ein schmaler weißer Saum aus Leukozyten, dessen pathologische Verbreiterung ein Hinweis auf erhöhte Leukozytenkonzentration (Leukozytose) sein kann.

Der arterielle Hkt liegt normalerweise etwas niedriger als der venöse Hkt. Grund hierfür ist die Nettoabgabe von Wasser aus den Kapillaren (Lymphbildung). Der mit Kapillarblut (Ohrläppchen, Fingerbeere) gemessene Wert liegt daher etwas niedriger als die Normwerte, da das Blut mit Gewebswasser verdünnt wird.

Geräte, Reagenzien

Heparinisierte Hämatokritröhrchen

Hämatokrit-Zentrifuge

Lanzetten

Pflaster

70% Ethanol

Durchführung und Auswertung

1. Sterilisieren Sie eine Fingerkuppe des Mittel- oder Ringfingers mit 70% Ethanol.
2. Stechen Sie die Fingerkuppe Ihres Fingers seitlich mit der Lanzette an. Reiben Sie den Finger, bis ein großer Blutropfen entsteht.
3. Halten Sie nun eine heparinbeschichtete Hämatokritkapillare **waagrecht** an diesen Blutropfen, bis sich das Kapillarlumen mit Blut gefüllt hat. Das Röhrchen füllt sich durch Kapillarkraft. Das Röhrchen **muss** vollständig und luftblasenfrei gefüllt sein. Die Hkt-Röhrchen von mehreren Gruppen werden zusammen in der Hämatokrit-Zentrifuge 5 Minuten zentrifugiert. Die Zentrifuge wird von einem Mitarbeiter bedient.

Die Hkt-Röhrchen besitzen einen über die ganze Länge gleichbleibenden Gefäßquerschnitt. Damit ist über die gesamte Länge des Röhrchens die Säulenlänge L dem Säulenvolumen V direkt proportional. Hierdurch vereinfacht sich die Bestimmung des Hkt zu einer Messung zweier Längen.

Der Hkt ergibt sich als Verhältnis der Länge der Erythrozytensäule zur gesamten Blutsäule (Plasma und Erys).

$$\text{Hkt} = \frac{V_E}{V_B} = \frac{L_E}{L_B}$$

L_E : Länge der sedimentierten Erythrozytensäule

V_E : Volumen der sedimentierten Erythrozytensäule

L_B : Länge der gesamten Blutsäule

V_B : Volumen der gesamten Blutsäule

An der Zentrifuge finden Sie eine Skala, anhand derer Sie den Hämatokritwert in Vol% direkt ablesen können.

Das Ergebnis bitte in die Sammeltabelle eintragen.

Hkt:	
Einheit:	Keine, wird als Fraktion angegeben
Normalwert:	
Männer:	0,40 – 0,54
Frauen:	0,37 – 0,47

4 Hämoglobinkonzentration

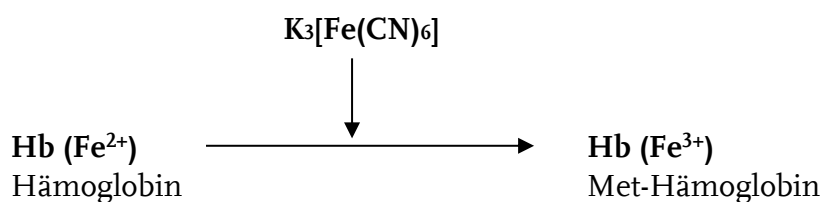
Hämoglobin (Hb) ist das Transportprotein für Sauerstoff (O₂) im Blut. Das tetramere Hb-Molekül enthält 4 Häm-Moleküle, an deren zweiwertiges Eisen (Fe²⁺) O₂ reversibel angelagert werden kann (Oxygenation). Wird das Fe²⁺ jedoch durch Oxidationsmittel oxidiert, so dass das Häm-Eisen als Fe³⁺ vorliegt, so verliert es die Fähigkeit zur reversiblen O₂-Bindung. Das oxydierte, funktionell inaktivierte Hämoglobin bezeichnet man als Methämoglobin (Met-Hb) oder Hämiglobin. Eine Reihe von Substanzen wirkt oxidierend auf das Hb und somit als Met-Hb-Bildner. Hierzu gehören Nitrite, Nitrate und Anilinfarbstoffe. Weil derartige Substanzen natürlich vorkommen, wird stets ein Teil des Hb in Met-Hb überführt. Die Met-Hb-Reduktase, ein NADH-abhängiges Enzym, bewirkt

die Reduktion des Met-Hb wieder zum Hb, so dass normalerweise der Anteil des Met-Hb am Gesamthämoglobin gering ist. Eine pathologische Erhöhung des Met-Hb auf über 50g/L macht sich als Zyanose bemerkbar.

Eine funktionelle Inaktivierung des Hb (d.h. teilweiser oder vollständiger Verlust der O₂-Transportfähigkeit) erfolgt bei der Kohlenmonoxid-Vergiftung. Kohlenmonoxid (CO) wird, ebenso wie O₂, reversibel an das Häm-Fe²⁺ gebunden, jedoch ist die Affinität des CO zum Hb etwa 250-mal größer als diejenige des O₂. Daher kann schon die Kontamination der Einatemluft mit kleinster CO-Konzentration zu einer weitgehenden Inaktivierung des Hb führen.

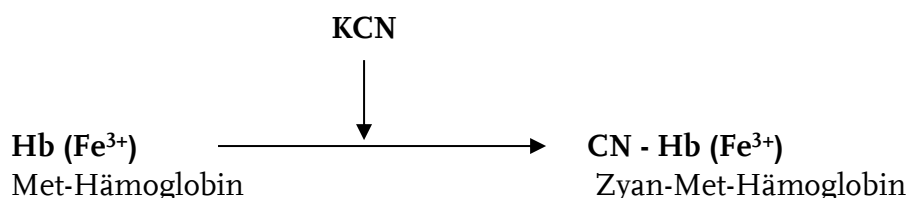
Als Methode der Wahl zur Bestimmung der Hb-Konzentration des Blutes gilt die Zyanmethämoglobin-Methode. Hierbei wird Blut hämolysiert und das Hämoglobin in Zyanmethämoglobin überführt. Die Konzentration dieses stabilen, roten Komplexes wird dann photometrisch bestimmt. Mit diesem Verfahren werden Met-Hb und CO-Hb mit erfasst, so dass die Zyanmethämoglobin-Methode das gesamte Hb - sowohl das aktive als auch das inaktive - erfasst. Die chemische Umwandlung erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsstufen:

1. Reaktionsstufe: Oxidation zu Met-Hb



$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ = Kalium-Hexazyanoferat (III) = Kalium Ferrizyanid ist auch als rotes Blutlaugensalz bekannt.

2. Reaktionsstufe: Überführung des instabilen Met-Hb in den stabilen Zyan-Komplex



KCN = Kaliumzyanid (giftig!)

Die photometrische Konzentrationsbestimmung eines gelösten Stoffes beruht auf dem *Lambert-Beerschen Gesetz*. Demnach ist bei monochromatischem Licht die Extinktion (E) einer Lösung proportional zu der Konzentration (c) eines lichtabsorbierenden gelösten Stoffes und der Schichtdicke der Küvette (d). Der Extinktionskoeffizient (ϵ) ist die Extinktion einer Lösung, die 1 μmol Substanz im Milliliter Lösung enthält.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E : Extinktion der Lösung

ϵ : Extinktionskoeffizient

c : Konzentration des lichtabsorbierenden gelösten Stoffes

d : Schichtdicke der Küvette

Da der Zyan-Met-Hämoglobinkomplex ein Absorptionsmaximum für sichtbares Licht bei 546 nm besitzt, wird die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die Extinktion ist der Konzentration des Zyan-Met-Hämoglobins und damit des Gesamt-Hämoglobins proportional.

Geräte, Reagenzien

Einstellbare 10 μL Pipette (rot)

Pipettenspitzen

Bitte nur mit aufgesteckten Pipettenspitzen pipettieren!!!

Reagenzglas mit 2,0 ml Transformationslösung (DRABKINSche Lösung)

Humanes Spenderblut oder Kapillarblut

Tupfer

Küvette von 1 cm Schichtdicke

Photometer

Durchführung

Für diesen Versuch verwenden Sie entweder getestetes humanes Spenderblut oder Kapillarblut.

Mit der roten Pipette werden 8 μL Blut luftblasenfrei aufgezogen. Der Inhalt wird in ein sauberes Reagenzglas überführt, das 2,0 ml der DRABKINSchen Lösung (Kalium-Hexazyanoferat (III) und Kaliumzyanid) enthält. Diese Lösung enthält alle Reagenzien zur Hämolyse und Überführung des Hb in den Zyan-Met-Hb-Komplex. Die Pipettenspitze wird mehrmals durch Aufziehen und Ausblasen von Lösung durchgespült, bis keine Blutspuren mehr vorhanden sind. Das Reagenzglas wird mit einem Stopfen verschlossen und der Inhalt sofort kurz, aber kräftig geschüttelt. **Vorsicht! Die Lösung ist giftig!** Nach einer Wartezeit von mindestens 5 min. wird das Hämolysat nochmals kräftig geschüttelt, in eine Küvette überführt und im Photometer bei 546 nm gegen blutfreie DRABKINSche

Lösung (Leerwert) gemessen. Die Küvette mit reiner Lösung in den Strahlengang einbringen und das Photometer auf $E = 0$ stellen, dann die Küvette mit Blut-Lösungsgemisch in den Strahlengang stellen und E ablesen.

Auswertung

Nach dem *Lambert-Beerschen Gesetz* errechnet sich die Hämoglobinkonzentration folgendermaßen:

$$c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

c = Konzentration des Hämoglobins in (mmol / L)

E = Extinktionswert, dimensionslos

d = Küvettschichtdicke in (cm)

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient in (cm²/mol)

Der Extinktionskoeffizient des Zyanhämoglobins beträgt bei 546 nm $\epsilon = 44 \text{ cm}^2/\text{mol}$ und die Küvettschichtdicke ist 1 cm. Da das Blut mit der Transformationslösung verdünnt wird, ist diese Verdünnung in der Berechnung zu berücksichtigen: 8 μL Blut + 2000 μL Transformationslösung ist gleich 1 + 250, d.h. 1: 251 Verdünnung.

$$c \text{ (mmol/L)} = \frac{E}{44 \times 1} \times 251$$

Da in der Klinik die Hämoglobinkonzentration in (g/L) angegeben wird, ergibt sich:
Molekulargewicht des Hämoglobins: 64 456 g/mol

$$c \text{ (g/L)} = \frac{E \times 64,456}{44} \times 251$$

Ergebnis in die Sammeltable eintragen.

Hb: g/L	Einheit:	g/L oder g%		
	Normalwerte:	Männer:	140	–180
		Frauen:	120 – 160 g/L	

5 Erythrozyten-Konzentration (C_E) und Leukozyten-Konzentration (C_L)

Zu den zellulären Bestandteilen des Blutes gehören außer den Erythrozyten die Leukozyten und die Thrombozyten. Die Leukozyten werden nach Morphologie und Funktion in Gruppen unterschiedlicher Zelltypen eingeteilt (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten), die nach Färbung unterschieden werden können (siehe Versuchsteil May-Grünwald-Färbung, S. 22). Die Thrombozyten sind Abschnürungen von Knochenmarkkriesenzellen (Megakaryozyten); ihre Größe (1 - 4 μm Durchmesser) ist deutlich geringer als die der Erythrozyten (7 μm) oder Leukozyten (10 - 15 μm), weshalb sie auch bei den hier ausgeführten Zählmethoden nicht erfasst werden können.

Die Erythrozyten transportieren vermittelt durch das Hb O_2 im Blut, die Leukozyten erfüllen die wesentlichen Aufgaben der unspezifischen und spezifischen Infektabwehr. So sind die neutrophilen Granulozyten, die Makrophagen und die dendritischen Zellen zur Phagozytose von Fremdstoffen fähig. Lymphozyten sind entscheidend für die spezifische Infektabwehr. Im Praktikum werden die Anzahl der Erythrozyten und der Leukozyten ermittelt, wobei eine Differenzierung in deren Untergruppen (Differentialblutbild) nicht erfolgt.

Eine Vermehrung der Erythrozytenzahl pro Blutvolumen (= Erythrozyten-Konzentration) heißt Polyglobulie oder Erythrozytose. Sie drückt sich auch in erhöhtem Hkt aus. Sie kann Ausdruck eines relativ zu niedrigen Plasmavolumens (Pseudo-Polyglobulie) oder einer Vermehrung der Erythrozyten-Masse sein (Polyglobulie), wie man sie etwa bei der Polyzythaemia vera rubra, einer proliferativen Erkrankung des Knochenmarks, findet. Physiologisch zeigt sich eine echte Polyglobulie bei Höhenanpassung. Eine Verminderung der Erythrozytenzahl pro Volumeneinheit lässt wahrscheinlich auf eine Hämodilution nach Blutverlusten schließen. Die Zählung der Erythrozyten spielt besonders für die Differentialdiagnose der verschiedenen Anämieformen eine Rolle. Vermehrung (Leukozytose) und Verminderung (Leukopenie) der Zahl der Leukozyten im Blutvolumen (= Leukozyten-Konzentration) sind wichtige diagnostische Merkmale, wobei nach dem im Wesentlichen betroffenen Leukozytentyp differenziert wird (z.B. Lymphozytose, Granulopenie etc.).

Eine Leukozytose findet man bei akuten bakteriellen Infektionen, Leukämien und rasch progredienten Tumoren. Die Leukopenie kann ihre Ursache in einer Knochenmarkschädigung haben, kann Folge von Medikamenten oder Infekten sein oder auf andere Erkrankungen hinweisen.

Erythrozytenzählung

Geräte, Reagenzien

Humanes Spenderblut oder Kapillarblut

Einstellbare 10 μL Pipette (rot), einstellbare 200 μL Pipette (gelb), Pipettenspitzen

Bitte nur mit aufgesteckten Pipettenspitzen pipettieren!!!

Tupfer

Eppendorf Cups

HAYEMsche Lösung

NEUBAUER (Improved) Zählkammer mit Deckglas

Mikroskop

Durchführung

Für diesen Versuch verwenden Sie entweder Kapillarblut oder getestetes humanes Spenderblut aus einer Blutkonserve.

Legen sie mit der gelben Pipette 199 μL HEYEMsche Lösung in das Eppendorf Cup vor. HAYEMsche Lösung besteht aus 5,0 g Na_2SO_4 , 1,0 g NaCl , 0,5 g HgCl_2 , gelöst in 200 mL H_2O . Die Hypertonie der Lösung bewirkt ein leichtes Schrumpfen der Erythrozyten, die dadurch besser sichtbar werden.

Nehmen Sie mit der roten Pipette 1 μL Blut auf und pipettieren Sie das Blut in das Eppendorf Cup mit der vorgelegten HEYEMschen Lösung. Verschließen Sie das Eppendorf Cup und Mischen Sie die Lösung durch Anschnappen. Das Blut ist nun 1:200 verdünnt (Faktor F_E). Die Lösung nun **5 Minuten stehen lassen**.

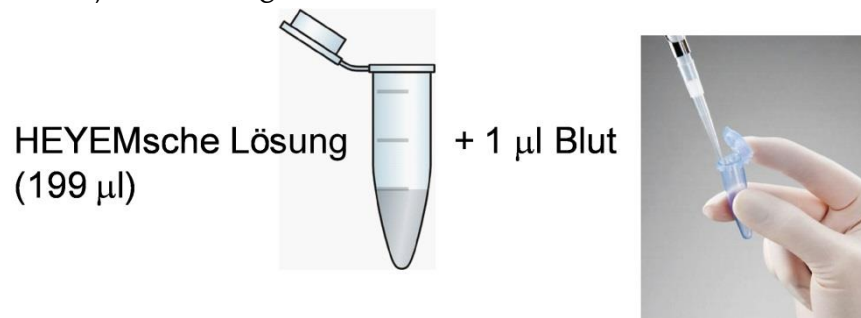


Abbildung 1: Blutverdünnung für die Erythrozytenzählung

Vorbereitung der Zählkammer

Die Zählkammer nach Neubauer ist ein Objektträger mit drei Balken (s. Abb. 2A). In den mittleren, unterteilten Balken sind zwei quadratische Zählnetze eingraviert, auch liegt es 0,1 mm niedriger als die benachbarten Balken. Bringt man daher auf die Seitenbalken ein geschliffenes Deckglas, so wird eine Zählkammer von 0,1 mm Tiefe hergestellt, die an den beiden Längsseiten des Objektträgers offen ist (s. Abb. 2A).

Unter Anleitung wird das Deckglas am unteren Rand auf die Zählkammer gelegt, so dass beide Daumen auf den äußeren Glasbalken liegen. Nun wird das Deckglas unter leichtem

Druck über das Zählfeld geschoben. Das Deckgläschen liegt nur dann seiner Unterlage dicht auf, wenn an den äußeren Glasbalken Interferenzfarben (NEWTONsche Ringe) sichtbar sind.

Füllen der Zählkammer

Mit der 10 μL Pipette (rot) werden nun 10 μL der verdünnten Erythrozytenlösung aufgezogen. Die Pipette wird nun an die Seite der Zählkammer gehalten und vorsichtig der Auslaufknopf betätigt, so dass ein Tropfen erscheint, der noch an der Pipettenspitze hängen bleibt. Die Erythrozyten-Suspension wird durch Kapillarkraft in die Zählkammer gezogen. Die Zellen einige Minuten sedimentieren lassen.

Mikroskopische Auszählung

Sobald sich die Erythrozyten auf der Zählfläche abgesetzt haben, wird das Zählfeld im Mikroskop bei mittlerer Vergrößerung (400fach: Okular 10:1, Objektiv 40:1) eingestellt. Das Netz bildet ein Quadrat, das durch weitere Linien in kleinere Quadrate unterteilt ist (s. Abb. 2B). Abbildung 2C zeigt diese Unterteilung in $5 \times 5 = 25$ mittlere Quadrate noch stärker vergrößert. Je 16 der kleinsten Quadrate (KQ) bilden ein mittleres Quadrat. Die 5 angegebenen mittleren Quadrate (vier Eckquadrate plus ein Mittelquadrat, s. Abb. 2C) werden nach dem Schema der Abb. 2D ausgezählt. Jeweils 16 KQ werden zusammen zur Auszählung benutzt. Das bedeutet, dass alle im Feld liegenden Erythrozyten plus diejenigen, die den rechten und unteren Rand berühren, in insgesamt $5 \times 16 = 80$ KQ gezählt werden (Abb. 2E). Nicht mitgezählt werden diejenigen, die den linken und oberen Rand berühren.

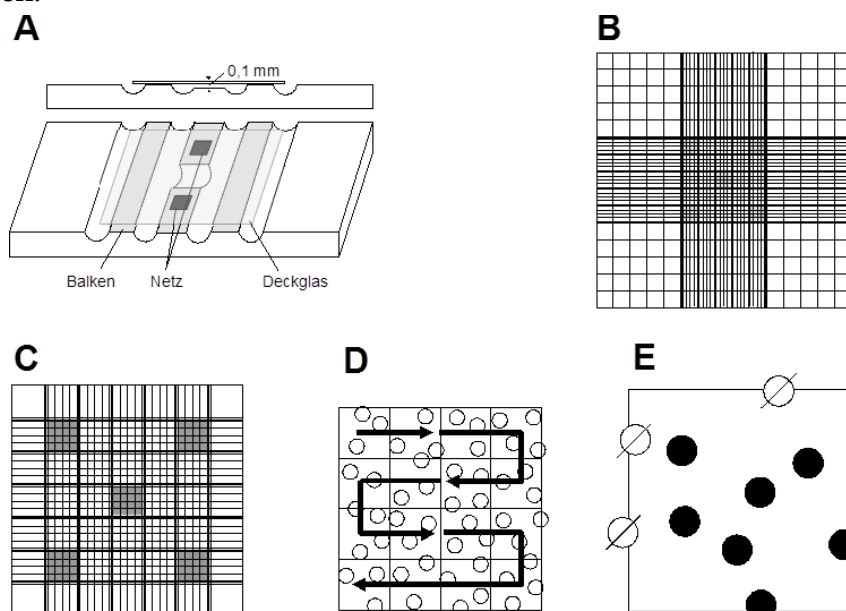


Abbildung 2: Zählkammer nach Neubauer (Improved)

- A. Ansicht.
- B.-E. Aufsicht bei zunehmender Vergrößerung.
- B. Das Netz der Neubauerkammer.
- C. Die auszählenden mittleren Quadrate für die Erythrozytenzählung.
- D. Durchmusterung der 16 Kleinstquadrate eines mittleren Quadrats.
- E. Zählung innerhalb eines Kleinstquadrates. Nur die Erythrozyten, deren Lage den geschlossenen Punkten entspricht, werden gezählt.

Der Zahlenwert der Erythrozyten pro 16 KQ = ein mittleres Quadrat wird laut folgendem Schema eingetragen:

1.	2.	3.	4.	5.
Ausgezählte KQ	Ausgezählte KQ	Ausgezählte KQ	Ausgezählte KQ	Ausgezählte KQ

Summe der fünf mittleren Quadrate: ____

Auswertung

Jedes der mittleren Quadrate hat eine Seitenlänge von 0,2 mm und ist in $4 \times 4 = 16$ Kleinstquadrate unterteilt. Die Kleinstquadrate haben eine Fläche von $1/20 \text{ mm} \times 1/20 \text{ mm} = (1/400 \text{ mm}^2) = 0,0025 \text{ mm}^2$. Bei einer Tiefe von 0,1 mm beträgt also das Volumen, $V_{KQ} = (1/4000 \text{ mm}^3) = 0,00025 \text{ mm}^3$.

Die 80 gezählten Quadraten haben ein Volumen von, $V_{QE} = (80 \times 0,00025 \text{ mm}^3) = 0,02 \text{ mm}^3 = 0,02 \mu\text{L}$.

$$C_E \text{ (Ery}/\mu\text{L Blut)} = \frac{N_E}{F_E \times V_{QE}}$$

$$= N_E \times 10\,000 \text{ Ery}/\mu\text{L Blut}$$

C_E : Konzentration der Erys pro μL Blut

N_E : Anzahl der Erys

F_E : Verdünnungsfaktor $\rightarrow 1:200$ (0,005)

V_{QE} : Volumen der ausgezählten Quadrate (für die Bestimmung von C_E)

Die Erythrozyten werden in Millionen (10^6) pro μL angegeben. Dieser Zahlwert ist identisch mit der S.I. Einheit Billionen (10^{12}) pro L.

Ergebnis bitte in die Sammeltabelle eintragen.

C_E :

Einheit: $xy \cdot 10^6 \text{ Ery}/\mu\text{L Blut}$ oder $xy \cdot 10^{12} \text{ Ery/L Blut}$

Normalwerte:

Männer: $4,6 - 5,9 \times 10^6 \text{ Ery} / \mu\text{L Blut}$

Frauen: $4,2 - 5,4 \times 10^6 \text{ Ery} / \mu\text{L Blut}$

Leukozyten-Konzentration (C₁)

Geräte, Reagenzien

Kapillarblut oder humanes Spenderblut

Einstellbare 10 µl Pipette (rot), einstellbare 200 µl Pipette (gelb), Pipettenspitzen

Bitte nur mit aufgesteckten Pipettenspitzen pipettieren!!!

Eppendorf Cups

Tupfer

Methylenblau in 3%iger Essigsäure

NEUBAUER (Improved) Zählkammer mit Deckglas

Mikroskop

Durchführung

Die Leukozytenzählung folgt dem Prinzip der Erythrozytenzählung. Die Verdünnung des Blutes erfolgt jedoch in 3%iger Essigsäure mit Methylenblau. Legen sie mit der gelben Pipette 18 µl der Verdünnungslösung (3%ige Essigsäure mit Methylenblau) in das Eppendorf Cup vor. Nehmen Sie mit der roten Pipette 2 µl Blut auf und pipettieren Sie das Blut in das Eppendorf Cup mit der vorgelegten Verdünnungslösung. Verschließen Sie das Eppendorf Cup und Mischen Sie die Lösung durch Ansnippen. Das Blut ist nun 1:10 verdünnt (Faktor F₁). Durch diese hypotone, saure Lösung werden die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert.

Die Lösung nun **5 Minuten stehen lassen**.

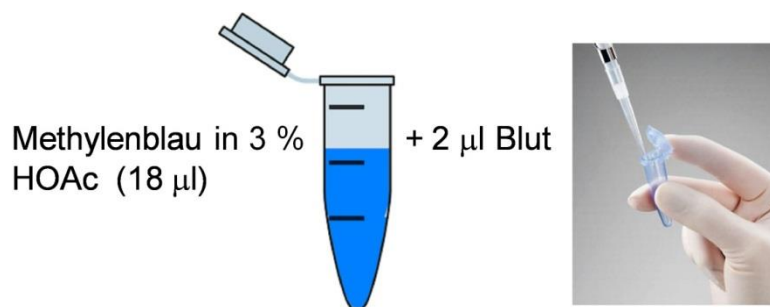


Abbildung 3: Blutverdünnung für die Leukozytenzählung

Die Zählkammer wird wie oben angegeben gefüllt, es wird das **gesamte Zählnetz** (Abb. 2c) ausgezählt, d.h. 25 mittlere Quadrate, deren Zwischenräume und die umgebenden Doppelbegrenzungen.

Auswertung

Zur Leukozytenzählung zählt man die gesamte Fläche des Netzes aus, einschließlich der durch Doppelstriche markierten Bereiche. Insgesamt ergibt sich eine Fläche von 1 mm².

Das Volumen (V_{QL}) entspricht = 1 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³ = 0,1 µL

Die Berechnung der Leukozytenkonzentration erfolgt mit der gesamten Leukozytenzahl analog zu der Erythrozytenzählung:

$$C_L \text{ (Leuko / } \mu\text{L Blut)} = \frac{N_L}{F_L \times V_L}$$

$$= N_L \times 100 \text{ Leuko/} \mu\text{L Blut}$$

C_L : Konzentration der Leukos pro μL Blut

N_L : Anzahl der Leukos

F_L : Verdünnungsfaktor \rightarrow 1:10 (0,1)

V_L : Volumen der ausgezählten Quadrate (für die Bestimmung von C_L)

Ergebnis bitte in die Sammeltabelle eintragen.

C_L:	Einheit:	Leuko / μL Blut
	Normalwerte:	<u>Männer und Frauen:</u> 5000 – 10.000 Leuko / μL Blut

6 Erythrozyten-Indizes

Aus dem Hämatokrit, der Hb-Konzentration und der Erythrozytenkonzentration lassen sich Erythrozytenparameter berechnen. Sie sind für die Differentialdiagnose der verschiedenen Anämieformen von Bedeutung.

Mittleres corpusculäres Volumen (MCV)

Das durchschnittliche Volumen eines einzelnen Erythrozyten errechnet sich aus dem Hämatokritwert und der Erythrozytenkonzentration:

$$\text{MCV (L)} = \frac{\text{Hkt (Fraktion)}}{C_E \text{ (Ery/L Blut)}}$$

Die übliche Einheit für MCV ist Femtoliter: (fl) = 10^{-15} L

Ergebnis bitte in die Sammeltabelle eintragen.

MCV:	Einheit:	fl
	Normalwert:	80 - 100 fl

Mikrozytose: Häufiges Auftreten von *kleineren* Erythrozyten im Blut, z.B. bei der Eisenmangelanämie.

Makrozytose: Häufiges Auftreten von *größeren* Erythrozyten im Blut, z.B. bei der perniziösen Anämie, die durch Vitamin B12- oder Folsäuremangel hervorgerufen wird.

Mittleres corpusculäres Hämoglobin (MCH)

Aus der Hämoglobinkonzentration des Blutes und der Erythrozytenkonzentration kann der durchschnittliche Gehalt an Hämoglobin im einzelnen Erythrozyten berechnet werden:

$$\text{MCH (g)} = \frac{[\text{Hb}] \text{ (g/L Blut)}}{\text{CE (Ery/L Blut)}}$$

Die übliche Einheit für MCH ist Picogramm: (pg) = 10^{-12} g.

Bitte tragen Sie das Ergebnis in die Sammeltabelle ein.

MCH:	Einheit:	pg
	Normalwert:	27 - 32 pg

Normochrom: Erythrozyten, bei denen die Hämoglobinbeladung im *Normbereich* liegt.

Hypochrom: Erythrozyten, bei denen die Hämoglobinbeladung *erniedrigt* ist, z. B. bei der Eisenmangelanämie.

Hyperchrom: Erythrozyten, bei denen die Hämoglobinbeladung *erhöht* ist, z. B. bei der perniziösen Anämie.

7 Blutgruppen

Werden Erythrozyten eines Menschen mit dem Serum eines anderen zusammengebracht, so entsteht entweder eine Erythrozytensuspension, oder aber es kommt zur Verklumpung (Agglutination) von Erythrozyten. Verantwortlich für die Agglutination sind Antikörper im Plasma, die sich an Antigene der Erythrozyten anheften und Brücken zwischen den Erythrozyten bilden. Die Antikörper, die zur γ -Globulin-Fraktion gehören, bezeichnet man als Agglutinine (genauer: Iso-Hämagglutinine). Für die Antigen-Eigenschaft der Erythrozyten sind membrangebundene Polysaccharid-Aminosäure-Komplexe verantwortlich; diese Erythrozyten-Antigene nennt man auch Agglutinogene (= Hämagglutinogene). Entsprechend dem Muster der auf den Erythrozyten vorhandenen Agglutinogene definiert man die verschiedenen Blutgruppen.

Es gibt mehrere Blutgruppensysteme. Neben den praktisch bedeutsamen Systemen ABO und Rhesus (mit seinen Untergruppen) gibt es weitere Systeme, die jedoch wegen ihrer nur schwach ausgeprägten Antigen- Eigenschaft keine Bedeutung in der Transfusions-Medizin besitzen. Im Praktikum werden nur die Blutgruppen des ABO- und Rhesussystems bestimmt.

ABO-System

Im ABO-System können Erythrozyten vier verschiedene Antigen-Eigenschaften haben (Phänotyp), für die genetisch drei verschiedene Allele - A, B und 0 - verantwortlich sind. Die Gene der Allele A und B werden dominant gegenüber 0 vererbt.

Das Plasma jedes Menschen (außer derjenigen mit Blutgruppe AB) enthält die Antikörper gegen alle Antigene, die auf den eigenen Erythrozyten nicht vorkommen (s. Tab. 1). Diese werden in den ersten Lebenswochen erworben.

Tabelle 1: Blutgruppenmerkmale im ABO-System

Blutgruppe	Genotyp	Häufigkeit	Antikörper im Plasma	agglutiniert Blutgruppe
0	00	42%	Anti-A und Anti-B	A, B, AB
A	AA oder A0	44%	Anti-B	AB, B
B	BB oder B0	10 %	Anti-A	AB, A
AB	AB	4 %	nicht vorhanden	keine Agglutination

Bei der Bestimmung der Blutgruppe werden Erythrozyten mit bekannten Testseren der Blutgruppen 0 (enthält Antikörper anti-A und anti-B), A (anti-B) und B (anti-A) vermischt und die Reaktionen (Agglutination oder nicht) beobachtet und notiert. Dabei können sich die in Abbildung 4 dargestellten Reaktionen ergeben:

Blut	Serum			Blutgruppe
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	
⊕ ?	⊕	⊖	⊕	→ A
⊕ ?	⊖	⊖	⊖	→ 0
⊕ ?	⊖	⊕	⊕	→ B
⊕ ?	⊕	⊕	⊕	→ AB

Abbildung 4: Verhalten menschlicher Erythrozyten im Kontakt mit Testseren zur Bestimmung der AB0 Blutgruppen (Abbildung entnommen aus Taschenlehrbuch Physiologie, Thieme, 2. Auflage)

Das AB0-System hat große Bedeutung bei der Bluttransfusion. Wird Spenderblut mit Empfängerblut zusammengebracht, so können folgende Reaktionen auftreten:

- a) Spender-Erythrozyten mit Empfänger-Serum
- b) Spender-Serum mit Empfänger-Erythrozyten

Da der Empfänger viel Plasma besitzt, reichen bei Unverträglichkeit im allgemeinen dessen Antikörper aus, um die Spender Erythrozyten zu zerstören: Die Reaktion a) ist stark. Dagegen wird bei Vollblutkonserven vergleichsweise wenig Spender-Plasma übertragen, so dass nur ein Teil der Empfänger-Erythrozyten zerstört werden: Die Reaktion b) ist schwach. Dennoch wird vor einer Bluttransfusion gefordert, die Verträglichkeit sowohl in der Reaktion a) (Major-Test) als auch in der Reaktion b) (Minor-Test) zu prüfen: Kreuzprobe. Heutzutage werden meistens Erythrozytenkonzentrate, die Serum-frei sind, transfundiert. Der Minor-Test ist in dem Fall überflüssig.

Aus Tabelle 2 ergeben sich die Reaktionsmuster (Agglutination oder nicht) bei Kontakt von Erythrozyten und Serum der verschiedenen Blutgruppen. Man sieht, dass eine Agglutination im Major- und Minor-Test nur dann ausbleibt, wenn Spender und Empfänger der gleichen Blutgruppe angehören.

Rhesus - System

Das Rhesus - System ist das wichtigste Blutgruppensystem nach dem AB0 System. Das Rhesus - System unterscheidet zwischen Rhesus positiv und Rhesus negativ. Rh+ bedeutet, dass auf den Blutzellen ein bestimmtes Antigen vorkommt. Personen, die dieses Antigen nicht besitzen, sind demnach Rh-. Zum Rhesus-System gehören mehrere Antigene, so genannte Rhesusfaktoren, die auf den Erythrozyten vorkommen. Am wichtigsten sind die Rhesusfaktoren C, D und E. Der Rhesusfaktor D besitzt das stärkste antigene Potenzial.

Im Gegensatz zu den AB0-Antigenen kommt das Antigen D sonst in der Natur nicht weiter vor. Wer Rhesus negativ ist, produziert nicht automatisch Antikörper gegen dieses Antigen wie beim AB0-System. Erst nach einem Blutkontakt mit dem Antigen D kommt es bei einer Rhesus negativen Person zur Antikörperbildung. Für die Schwangerschaft sind die Auswirkungen einer AB0 - Inkompatibilität verglichen mit einer Rh-Unverträglichkeit von geringerer Bedeutung, da deren Antikörper vom Typ IgM nicht plazentagängig sind. Die für die Rhesusinkompatibilität verantwortlichen IgG-Antikörper sind demgegenüber plazentagängig. Deshalb können sie das klinische Bild des Morbus hämolyticus neonatorum auslösen, wenn eine Rh negative Frau, die durch Kontakt mit Rh+ Blut sensibilisiert wurde, mit einem Rh positiven Kind schwanger ist.

Geräte, Reagenzien

Lanzette, Pflaster

0,9% NaCl Lösung

Milchglasplatte mit mehreren Vertiefungen

Testseren A, B und 0

Durchführung der Blutgruppenbestimmung:

- Geben Sie einige Tropfen 0,9% NaCl in ein Eppendorfgefäß.
- Sterilisieren Sie Ihre Fingerkuppe mit 70 % Ethanol.
- Stechen Sie die Fingerkuppe Ihres Mittelfingers seitlich mit einer Lanzette an und überführen Sie einen großen Tropfen Blut in das mit NaCl-Lösung gefüllte Eppendorfgefäß.
- Beschriften Sie die Reaktionsnöpfchen. Jede Reaktionsplatte wird von 2 StudentInnen genutzt. Die Praktikumsassistenten werden Ihnen nun jeweils einen Tropfen des Anti A-, Anti B-, Anti AB- bzw. Anti D-Serums in das Reaktionsnöpfchen geben.
- In die 5. Kammer kommt nur 1 Tropfen 0,9 % NaCl-Lösung als Kontrolle.
- Verteilen Sie nun das verdünnte Blut auf 5 Reaktionsnöpfchen.
- Schwenken Sie die Probeplatte vorsichtig hin und her! Das Präparat sollte nicht austrocknen! Nach 2-3 min wird auf das Vorliegen einer Agglutination geprüft. Nach dem Muster der Agglutinationsreaktion wird die Blutgruppe bestimmt (s. Tab. 2).
- Beachten Sie, dass die Reaktion mit Anti-D-Serum bis 5 min dauern kann.
- Tragen Sie Ihre Ergebnisse in die Sammeltabelle ein; daran soll die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Blutgruppen ermittelt werden. Übernehmen Sie diese Werte in Ihr Aufgabenblatt.

8 May-Grünwald Färbung

Ein Blutausstrich dient ungefärbt vornehmlich der mikroskopischen Untersuchung auf Parasiten. Gefärbt ermöglicht der Blutausstrich Gestalt und Aussehen der Leukozyten gut sichtbar zu machen und sie den verschiedenen Gruppen einzuordnen. Parallel dazu betrachtet man auch die Erythrozyten und beurteilt sie nach Größe, Form und Farbe.

Die May-Grünwald-Färbung ist eine Differentialfärbung für luftgetrocknete Blutausstriche und zytologische Präparate. Die May-Grünwald-Lösung besteht aus einer Mischung von mit Eosin angesäuertem Methylenblau und Methanol, die in Wasser gelöst wird. Gelegentlich wird sie mit der Giemsa-Färbung kombiniert und als „May-Grünwald-Giemsa-Färbung“ bezeichnet.

Die Intensität der Färbung hängt von der genauen Zusammensetzung der May-Grünwald-Lösung ab, sie enthält Methylenblau, Eosin und Methanol. Durch Methanol werden die Blutzellen auf dem Blutausstrich fixiert. Methylenblau ist eine basische Thiazinfarbe mit positiver Ladung und färbt Säuren wie DNA, RNA und Proteine (und damit auch die Zellkerne) in einem Blauton. Aufgrund ihrer pH-abhängigen Farbgebung ist die May-Grünwald-Färbung besonders für die Anfärbung von Granula geeignet. **Basophile (saure) Granula** erscheinen im lichtmikroskopischen Bild durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle acidophilen beziehungsweise basischen (**eosinophilen**) **Strukturen ziegelrot**, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Er färbt speziell das Hämoglobin und basische Granula in einem rötlichen Farbton. Neutrale Granula weisen nach Färbung einen hell- bis purpurroten, blassen Farbton auf. Das Zytoplasma von Erythrozyten wird durch die May-Grünwald-Lösung hellrot, das der Thrombozyten leicht bläulich (siehe Abbildung 6).

Durchführung

Punktion der Fingerbeere, Blutausstrich und Färbung werden für jeweils einen Studenten pro Gruppe **durch die Kursassistenten** durchgeführt: im späteren Praktikumsteil bekommen Sie den gefärbten Blutausstrich ausgehändigt.

Schauen Sie sich Ihren Blutausstrich unter dem Mikroskop (Aufbau und Funktion siehe Abbildung 5) bei mit dem 40x und 100x Objektiv an. Beim 100x Objektiv ist *immer* ein kleiner Tropfen Immersionsöl notwendig, der auf das Deckglas von lichtmikroskopischen Präparaten gegeben wird. Da beim Blutausstrich **kein Deckglas** verwendet wird, wird das Immersionsöl direkt auf den Objektträger gegeben.

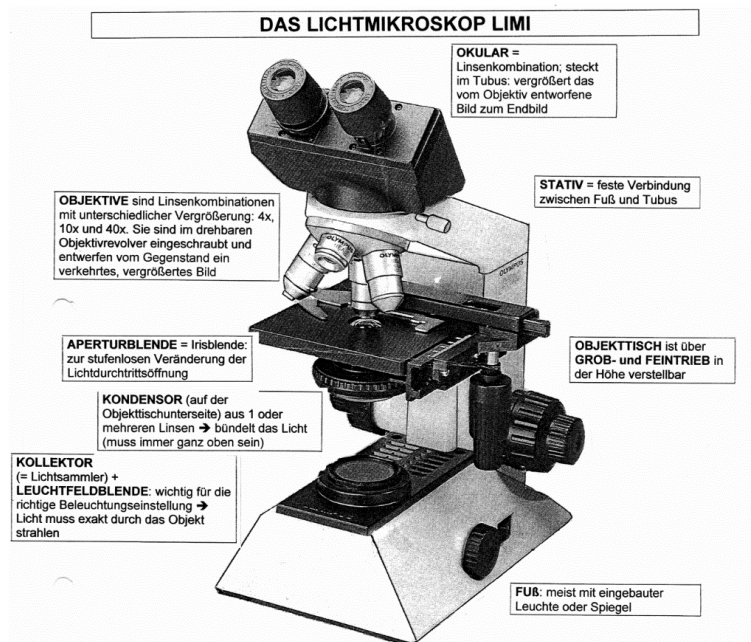


Abbildung 5: Aufbau und Funktion des Lichtmikroskops

Versuchen Sie nun folgende Blutzellen in Ihrem Blutausstrich zu identifizieren. Wodurch sind sie in ihrem Aussehen gekennzeichnet? Wodurch kommt ihre Färbung zustande?

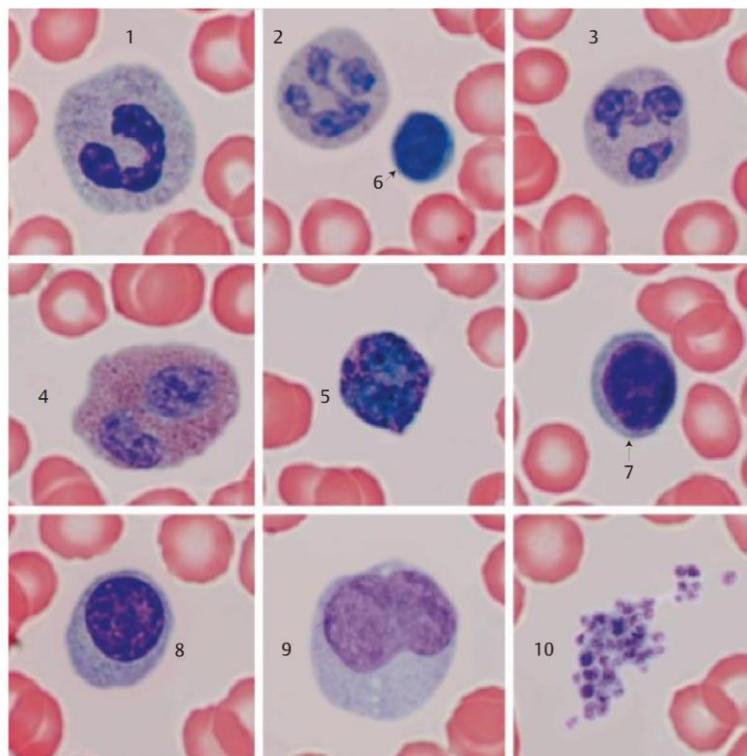


Abbildung 6: Übersicht über die verschiedenen Zellen im menschlichen Blutbild (May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim, Vergrößerung 1000-fach). 1, stabkerniger neutrophiler Granulozyt; 2+3, segmentkerniger neutrophiler Granulozyt; 4, eosinophiler Granulozyt; 5, basophiler Granulozyt; 6, kleiner Lymphozyt; 7, mittelgroßer Lymphozyt; 8, großer Lymphozyt; 9, Monozyt; 10, Thrombozyten (Abbildung entnommen aus Kurzlehrbuch Histologie, Norbert Ulfig, Thieme, 4. Auflage).