

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Nina Čebulj Kadunc
Monika C. Žužek

**LABORATORIJSKE VAJE IN RAČUNALNIŠKE SIMULACIJE V
FIZIOLOGIJI**
**2. del: Fiziologija krvi, krvnega obtoka, dihanja, izločanja in
gibanja**

Učbenik za študente veterinarske medicine

LJUBLJANA, 2014

**LABORATORIJSKE VAJE IN RAČUNALNIŠKE SIMULACIJE V FIZIOLOGIJI
(2. del: Fiziologija krvi, krvnega obtoka, dihanja, izločanja in gibanja)**

Učbenik za študente veterinarske medicine

Avtorici: Nina Čebulj Kadunc, Monika C. Žužek

Izdajatelj: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Strokovna recenzija:

Prof.dr. Martina Klinkon-Ogrinec, dr.vet.med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Prof.dr. Robert Frangež, dr.vet.med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Lektorica: prof. Ivanka Šircelj-Žnidaršič

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

636.1/.9:612(075.8)(0.034.2)

ČEBULJ-Kadunc, Nina

Laboratorijske vaje in računalniške simulacije v fiziologiji [Elektronski vir] : učbenik za študente veterinarske medicine. Del 2, Fiziologija krvi, krvnega obtoka, dihanja, izločanja in gibanja / Nina Čebulj Kadunc, Monika C. Žužek. - El. knjiga. - Ljubljana : Veterinarska fakulteta, 2014

ISBN 978-961-6199-71-1 (pdf)

1. Žužek, Monika C.

276691712

KAZALO

1 FIZIOLOGIJA KRVI	6
1.1 ODVZEM KRVI DOMAČIM ŽIVALIM	6
1.1.1 Splošni principi	6
1.1.2 Dolgotrajnejše jemanje krvi (kaniliranje)	6
1.1.3 Odvzem krvi z epruветami s podtlakom	7
1.2 ANTIKOAGULANTI IN KOAGULACIJA KRVI	7
1.2.1 Priprava antikoagulantov	8
1.2.2 Fizikalni načini preprečevanja koagulacije krvi	8
1.2.3 Priprava krvne plazme, krvnega seruma in defibrinirane krvi	8
1.2.4 Pomen kalcijevih ionov pri koagulaciji krvi	9
1.2.5 Določanje časa koagulacije krvi	10
1.2.6 Določanje časa krvavitve	11
1.3 DOLOČANJE VISKOZNOSTI KRVI IN KRVNE PLAZME (SERUMA)	12
1.4 MERJENJE GOSTOTE KRVI IN KRVNE PLAZME (SERUMA)	13
1.4.1 Neposredno merjenje gostote krvi	13
1.4.2 Posredno določanje gostote krvi in krvnega seruma (plazme) z raztopino bakrovega sulfata	13
1.5 HEMATOKRIT	15
1.5.1 Korekcija hematokrita	16
1.5.2 Prikaz merjenja hematokrita	17
1.5.3 Določanje hematokrita z metodo po Wintrobeju	18
1.5.4 Določanje hematokrita z mikrohematokritsko metodo	19
1.6 SEDIMENTACIJA KRVI	20
1.6.1 Prikaz merjenja sedimentacije	21
1.6.2 Metoda navpične sedimentacije (po Westergreenu)	22
1.6.3 Metoda poševne sedimentacije	23
1.7 HEMOLIZA IN OSMOTSKA REZISTENCA ERITROCITOV	24
1.7.1 Prikaz hemolize	24
1.7.2 Določanje osmotske rezistence eritrocitov	24
1.8 HEMOGLOBIN	27
1.8.1 Določanje koncentracije hemoglobina	27
1.8.2 Določanje hemoglobinskega tipa pri ovcah	30
1.8.3 Nastanek kristalov klorhemina (Teichmanovi kristali)	32
1.9 ŠTETJE KRVNIH CELIC	33
1.9.1 Štetje krvnih celic z mikroskopom	33
1.9.2 Štetje krvnih celic s hematološkimi analizatorji	38
1.10 ERITROCITNI INDEKSI	39
1.11 KRVNE SKUPINE	41
1.11.1 Prikaz določanja krvnih skupin sistemov ABO in Rh	42
1.11.2 Določanje krvnih skupin sistema ABO pri človeku	44

1.12 LASTNOSTI KRVNE PLAZME/SERUMA.....	45
1.12.1 Pufrska kapaciteta krvne plazme/seruma	45
1.12.2 Ločitev beljakovinskih frakcij krvne plazme z obarjanjem	46
2 FIZIOLOGIJA KRVNEGA OBTOKA	47
2.1 ŽABJE SRCE KOT MODEL ZA ŠTUDIJ DELOVANJA SRCA.....	47
2.1.1 Prikaz delovanja srca žabe	47
2.1.2 Lokalizacija srčnega avtomatizma (<i>Stanniusove ligature</i>)	52
2.2 ELEKTROKARDIOGRAFIJA	53
2.2.1 Registracija EKG	53
2.2.2 Klinična uporaba EKG	57
2.3 KARDIOVASKULARNA DINAMIKA	58
2.3.1 Mehanika črpalk	58
2.3.2 Pretok krvi po žilah	61
2.3.3 Merjenje hitrosti gibanja krvi.....	65
2.3.4 Merjenje časa obtoka krvi	66
2.4 SRČNI TONI	67
2.4.1 Poslušanje srčnih tonov.....	67
2.4.2 Fonokardioskopija in fonokardiografija.....	67
2.5 MINUTNI VOLUMEN SRCA	69
2.5.1 Kirurške metode merjenja minutnega volumna srca	69
2.5.2 Kemične metode merjenja minutnega volumna srca	69
2.5.3 Dilucijske metode merjenja minutnega volumna srca	70
2.6 PULZ	71
2.6.1 Merjenje pulza pri domačih živalih in pri človeku	71
2.6.2 Hitrost širjenja pulznega vala.....	72
2.7 MERJENJE KRVNEGA TLAKA	73
2.7.1 Neposredno merjenje krvnega tlaka v arteriji karotis pri kuncu	73
2.7.2 Natančno merjenje krvnega tlaka.....	75
2.7.3 Posredno merjenje krvnega tlaka	75
2.7.4 Vpliv nekaterih dejavnikov na delovanje srca in krvni tlak pri človeku	77
2.8 KAPILARNA CIRKULACIJA	80
2.8.1 Opazovanje kapilarne cirkulacije v mezenteriju žabe	80
3 FIZIOLOGIJA DIHANJA	81
3.1 DOLOČANJE FREKVENCE DIHANJA	81
3.2 MERJENJE PLJUČNIH VOLUMNOV IN KAPACITET	81
3.2.1 Merjenje vitalne kapacitete s spirometrom po Hutchinsonu	83
3.2.2 Merjenje vitalne kapacitete pljuč s suhim spirometrom (<i>vitalografom</i>).....	83
3.2.3 Prikaz merjenja pljučnih volumnov in kapacitet.....	83
3.3 VLOGA INTRAPLEVRALNEGA TLAKA IN SURFAKTANTA PRI MEHANIZMU PLJUČNE VENTILACIJE	85
3.3.1 Prikaz mehanizma pljučne ventilacije z Dondersonovim modelom	85
3.3.2 Prikaz dejavnikov, ki vplivajo na dihanje	86

3.4 NADZOR IN URAVNAVANJE DIHANJA.....	88
3.4.1 Prikaz učinkov različnih načinov dihanja na raven CO ₂	88
3.4.2 Vplivi na dihanje pri človeku.....	90
4 FIZIOLOGIJA LEDVIC.....	92
4.1 PRIKAZ GLOMERULNE FILTRACIJE.....	92
4.1.1 Učinek premera žil na glomerulno filtracijo	93
4.1.2 Učinek tlaka na glomerulno filtracijo	94
4.2 PRIKAZ NASTAJANJA KONČNEGA (DEFINITIVNEGA) URINA.....	95
4.2.1 Vpliv koncentracijske razlike na sestavo definitivnega urina.....	96
4.2.2 Učinek glukoznih nosilcev na reabsorpcijo glukoze	97
4.2.3 Prikaz učinka hormonov na nastajanje urina	98
4.3 LASTNOSTI IN SESTAVA KONČNEGA URINA.....	99
4.3.1 Odvzem urina.....	99
4.3.2 Pregled fizikalnih lastnosti urina.....	99
4.3.3 Kemične preiskave urina.....	101
4.3.4 Mikroskopski pregled urina	104
5 FIZIOLOGIJA MIŠIC IN GIBANJA	107
5.1 KONTRAKCIJE MIŠIC ŽABE.....	107
5.1.1 Enostavna mišična kontrakcija.....	108
5.1.2 Sestavljena mišična kontrakcija	111
5.1.3 Izotonična in izometrična mišična kontrakcija.....	114
5.1.4 Elastičnost mišic	116
5.2 ERGOMETRIJA.....	117
5.2.1 Utrujanje prstnih mišic pri človeku.....	117
5.3 FIZIOLOGIJA GIBANJA	118
5.3.1 Mehanski vplivi na potek gibanja	118
5.3.2 Ležanje.....	119
5.3.3 Spreminjanje položaja na mestu	120
5.3.4 Hoja živali	120
LITERATURA	129

1 FIZIOLOGIJA KRVI

Kri je vrsta tkiva, ki v telesu opravlja veliko pomembnih funkcij, predvsem transportno, homeostatsko, termoregulacijsko in obrambno. Zaradi razmeroma lahkega in neškodljivega načina odvzema je kri zelo primerna za opazovanje različnih stanj in sprememb v organizmu. Področje fiziologije, ki proučuje stanja v krvi v zvezi s fiziološkimi spremembami, se imenuje **hematologija**. Njej sorodna je klinična hematologija, ki na osnovi preiskav krvi pomaga pri diagnosticiranju bolezni ali postavljanju diferencialne diagnoze. Osnovne hematološke preiskave so ugotavljanje števila krvnih celic, hematokritske vrednosti, koncentracije hemoglobina in sedimentacije krvi. Sodobne biokemične analitske metode omogočajo tudi določanje koncentracije številnih organskih snovi, različnih mineralnih snovi, vitaminov, encimov, hormonov, barvil in drugih snovi v krvni plazmi ali serumu.

1.1 ODVZEM KRVI DOMAČIM ŽIVALIM

1.1.1 Splošni principi

Živalim običajno jemljemo kri iz površinskih ven. Površina kože, kjer bomo jemali kri, mora biti pred tem očiščena in razkužena, po potrebi pa tudi postrizemo dlako ali odstranimo perje. Nato veno stisnemo (*komprimiramo*), da nabrekne, in punktiramo s sterilno iglo. Kri počasi vsesamo z brizgo ali natočimo naravnost v epruveto ali v drugo zbirno posodo.

Redkeje kot iz ven jemljemo kri iz arterij. Možno je tudi jemanje krvi iz kapilar oziroma kapilarnih pletežev. Pri malih živalih (npr. laboratorijske živali, majhni psi, mačke) lahko jemljemo kri tudi neposredno iz srca. Domačim živalim običajno jemljemo kri iz naslednjih ven: konju iz *v. jugularis*, govedu iz *v. jugularis*, *v. coccigice* ali *v. abdominalis* (kravam), prašiču iz *v. auricularis*, *v. cave cranialis* ali iz orbitalnega sinusa, psu iz *v. cephalice antebrachii* (prednja okončina), *v. saphene parve* (zadnja okončina) in *v. jugularis*, v narkozi pa tudi iz *v. sublingualis*, mački iz *v. femoralis*, kuncu iz *v. auricularis*, podgani in miši iz *v. coccigice*, podjezičnega ali orbitalnega žilnega pleteža ter perutnini iz krilne vene ali *v. jugularis*.

1.1.2 Dolgotrajnejše jemanje krvi (kaniliranje)

Pri nekaterih poskusih, predvsem kadar proučujemo dinamične spremembe v krvi v daljšem časovnem obdobju, moramo odvzeti kri večkrat v krajših časovnih presledkih. Ker vsakokratno odvzem krvi kljub vsej previdnosti pomeni za žival stres in poškodbo tkiva, se poskušamo negativnim stranskim učinkom večkratnega jemanja krvi izogniti z vstavitvijo trajnega žilnega katetra (*kanile*) v žilo.

Najpogosteje vstavimo trajno kanilo v vratno veno (*v. jugularis*). Področje, na katerem želimo vstaviti kanilo, najprej obrijemo in razkužimo. Nato žilo komprimiramo in jo prebodemo z ostrim delom žilnega katetra. Iglo odstranimo, kateter pa pustimo v žili in ga prilepimo na kožo ali dlako na vratu. Kateter napolnimo s fiziološko raztopino, ki vsebuje tudi antikoagulant (npr. heparin).

Pred odvzemom vzorca krvi vsebino katetra in majhno količino krvi zavržemo. Tako preprečimo redčenje vzorca krvi s fiziološko raztopino. Po odvzemu vzorca kateter spet napolnimo s tekočino in ga zapremo z zamaškom.

1.1.3 Odvzem krvi z epruветami s podtlakom

Zaradi nevarnosti okužbe s povzročitelji bolezni, ki se prenašajo s krvjo, so proizvajalci medicinske opreme razvili pripomočke za odvzem krvi, ki zmanjšujejo možnost za neposredni stik jemalca krvi s krvjo pacienta. Ta pripomoček za odvzem krvi je sestavljen iz držala, igle z dvema konicama in epruvete s podtlakom (slika 1.1).



Pred odvzemom krvi najprej odstranimo varovalo s kratke igle in jo privijemo v držalo. Nato odvijemo še varovalni tulec z dolge igle. V držalo vstavimo epruveto s podtlakom tako, da ne prebodemo zamaška. Epruveto in držalo primemo in z dolgo iglo punktiramo komprimirano žilo, nato pa epruveto pritisnemo navzgor tako, da spodnja konica igle prebode zamašek. Ker je v epruveti podtlak, prične kri pritekati v epruveto. Ko je epruveta polna, popustimo pritisk na žilo in iglo izvlečemo iz nje. Ker je v epruveti antikoagulant, vsebino premešamo z nekajkratnim obračanjem epruvete.

1.2 ANTIKOAGULANTI IN KOAGULACIJA KRVI

Za hematološke preiskave potrebujemo večinoma tekočo kri. Strjevanje krvi preprečujemo z dodajanjem snovi, ki jih imenujemo **antikoagulanti**. Ti delujejo na različne faktorje koagulacije krvi in s tem prekinejo proces koagulacije. Vsi antikoagulanti delujejo le, če kri po odvzemu dobro premešamo.

Glede na način delovanja ločimo dve osnovni skupini antikoagulantov. Antikoagulanti prve skupine delujejo tako, da vežejo kalcijeve ione in jih odstranjujejo iz plazme. Sem sodijo npr. **citrati**, **fluoridi**, **oksalati** in **helati** (natrijeve ali kalijeve soli etilendiaminotetraoetne kisline (EDTA)). Antikoagulanti druge skupine, kamor sodita heparin in hirudin, pa delujejo tako, da preprečujejo pretvorbo protrombina v trombin, delovanje trombina na fibrinogen in pretvorbo fibrinogena v fibrin. **Heparin** se v organizmu nahaja v krvnih in tkivnih bazofilcih (npr. jeter, pljuč), **hirudin** pa se nahaja v slini medicinske pijavke (*Hirudo medicinalis*).

1.2.1 Priprava antikoagulantov

- **Natrijev citrat:** Raztopino pripravimo tako, da 3,8 g trinatrijevega citrata razredčimo z destilirano vodo do 100 ml (3,8 % raztopina). Za preprečevanje koagulacije krvi uporabimo 1 del raztopine na 9 delov krvi. S tem kri nekoliko razredčimo, kar moramo upoštevati pri vrednotenju rezultatov hematoloških preiskav.
- **ACD raztopina** se uporablja kot antikoagulant pri odvzemu ali shranjevanju krvi in eritrocitov za transfuzije. Raztopino pripravimo tako, da zatehtamo 1,37 g dinatrijevega brezvodnega citrata, 0,44 g brezvodne citronske kisline in 1,47 g monohidratne dekstroze ter dopolnimo z destilirano vodo do 100 ml. Raztopino steriliziramo v avtoklavu (15 minut na temperaturi 121 °C). Ob uporabi ga dodajamo krvi v razmerju en del raztopine ACD na štiri dele krvi.
- **Oksalati** so strupeni, zato jih ne smemo dodajati krvi, ki se uporablja za transfuzijo. Kalijev oksalat povzroči krčenje, amonijev pa nabrekanje eritrocitov in levkocitov. Uporabna sta v kombinaciji 0,8 g kalijevega in 1,2 g amonijevega oksalata v 100 ml raztopine. Količina 0,1 ml raztopine zadostuje za 1 ml krvi. Raztopino kalijevega in amonijevega oksalata uporabljamo za pripravo **suhega antikoagulanta**. Prednost suhih antikoagulantov je v tem, da ne redčijo krvi. Oksalati niso priporočljivi za odvzem vzorcev, namenjenih za določanje neproteinskega dušika.
- **Soli EDTA** lahko uporabljamo kot raztopine (mokri antikoagulanti) ali kot suhe dodatke krvi (suhi antikoagulanti). Najpogosteje se uporabljajo koncentracije 1 do 2 mg za en ml krvi. Če dodamo več kot 2 mg, pride do krčenja eritrocitov, zato so vrednosti MCH in MCHC netočne. V hematologiji poleg natrijevega uporabljamo tudi dikalijev EDTA, ki je zaradi boljše topnosti uporabnejši. Kadar določamo koncentracijo natrija ali kalija v krvi, uporabimo litijevo sol EDTA.
- **Heparin** pogosto uporabljamo kot 1 % raztopino. 0,1 ml te raztopine prepreči koagulacijo 5 ml krvi. V praksi z 1 % raztopino heparina prepiramo brizge, kadar z njimi jemljemo kri. Heparin ne spremeni volumna eritrocitov, tudi če je dodan v prebitku, vpliva pa na morfološke lastnosti levkocitov.

1.2.2 Fizikalni načini preprečevanja koagulacije krvi

Čas koagulacije lahko podaljšamo z uporabo silikoniziranega pribora in epruвет za odvzem krvi. Tudi plastične ali s parafinom prevlečene epruветe podaljšajo čas koagulacije. Dodatno podaljšamo čas koagulacije tudi, če epruветe predhodno ohladimo, neposredno po odvzemu pa vzorec krvi postavimo v hladilnik ali s centrifugiranjem na nizki temperaturi ločimo plazmo in celice.

1.2.3 Priprava krvne plazme, krvnega seruma in defibrinirane krvi

- **Krvna plazma** je rumenkasta ali brezbarvna tekočina brez krvnih celic. Vsebuje vodo, pline, beljakovine (albumini, globulini, fibrinogen), različne ogljikove hidrate, lipide, neproteinske dušikove spojine, različne ione, encime, hormone, vitamine in pigmente. Dobimo jo tako, da kri, ki smo ji dodali antikoagulant, centrifugiramo (20 do 30 minut pri 2000 do 3000 obratih na minuto) in s tem ločimo krvne celice, ki se posedejo na dno epruветe, od plazme, ki ostane nad njimi. Nastalo plazmo odstranimo.
- **Krvni serum** je tekočina brez krvnih celic. Dobimo ga tako, da pustimo kri spontano koagulirati. Ko se krvni strdek (*koagulum*) skrči (*retrahira*) in iztisne serum, slednjega odlijemo. Proces na

sobni temperaturi traja približno 24 ur, pospešimo pa ga z inkubacijo krvi na 37 °C.

- **Defibrinirana kri:** Če kri ob jemanju mešamo z leseno ali stekleno palčko, se fibrin kot gobasta masa nalaga na palčki. Ob tem so v krvi potekle reakcije koagulacije, zato je nadaljnja koagulacija ostanka krvi – "defibrinirane krvi" nemogoča. S centrifugiranjem iz take krvi dobimo krvni serum.

Naloge:

1. Shematično ponazorite pripravo defibrinirane krvi, plazme in krvnega seruma!
2. Napišite glavne značilnosti vseh treh substratov in ponazorite njihovo sestavo!

1.2.4 Pomen kalcijevih ionov pri koagulaciji krvi

Kri izven organizma naglo koagulira. **Koagulacija krvi** je sestavljen proces, ki poteka kot veriga zaporednih biokemičnih reakcij, ki si večinoma sledijo z veliko hitrostjo (kaskadni proces). Pri koagulaciji krvi sodelujejo številne substance – **faktorji koagulacije krvi**. Imenujemo pa jih po avtorjih, ki so jih odkrili, z generičnimi imeni ali z rimskimi številkami (npr.: IX. – antihemofilični globulin, B – Christmasov faktor, XII. – kontaktni – Hagemanov faktor). Faktorji sodelujejo pri vseh fazah strjevanja krvi.

Osnovne faze koagulacije krvi so:

- **profaza** – sprememba na trombocitih in v krvni plazmi po stiku s tujimi površinami ali steno poškodovanih krvnih žil; ob tem pride do sproščanja trombocitnih faktorjev koagulacije in aktiviranja XII. (kontaktnega, Hagemanovega) faktorja iz plazme;
- **1. faza** – aktivacija tromboplastina (trombokinaze);
- **2. faza** – protrombin se pod vplivom tromboplastina in Ca^{2+} pretvori v trombin;
- **3. faza** – fibrinogen se pod vplivom trombina aktivira in polimerizira v fibrin;
- **4. faza** – spremembe na nastalem krvnem koagulumu (krčenje – *retrakcija* fibrina pod vplivom kontraktilnega proteina trombastenina iz trombocitov in razgradnja fibrina – *fibrinoliza* pod vplivom fibrinolitičnega fermenta plazmina).

a) Material:

- Citratna kri, defibrinirana kri, krvna plazma, krvni serum, heparizirana kri, raztopina $CaCl_2$ s snkc 0,18 mol/L (mkc 20 g/L), epruvete v stojalu in vodna kopel (segreta na 37–39 °C).

b) Postopek:

1. Pripravimo in označimo 5 epruvet: v prvo epruveto odpipetiramo 2 ml citratne krvi, v drugo 2 ml defibrinirane krvi, v tretjo 2 ml krvne plazme, v četrto 2 ml krvnega seruma in v peto 2 ml heparizirane krvi.
2. V vsako epruveto dodamo 3 kapljice raztopine $CaCl_2$.
3. Stojalo z epruvetami postavimo v vodno kopel za 20 min.

c) Naloge:

1. Shematično prikažite izvedbo vaje!
2. Opišite in razložite rezultate poskusa in jih vnesite v spodnjo tabelo!

Št. epr.	Substrat (ml)	Reagent	Rezultati in razlaga
1			
2			
3			
4			
5			

1.2.5 Določanje časa koagulacije krvi

Koagulacija krvi traja določen čas, ki je v normalnih fizioloških okoliščinah specifičen za posamezne živalske vrste. Čas koagulacije krvi je čas, ki mine od odvzema krvi do takrat, ko se ta kri strdi sama od sebe. Ta čas se pri različnih postopkih nekoliko razlikuje. Pomemben je za ugotavljanje motenj v strjevanju krvi (*koagulopatij*), ki nastopijo ob pomanjkanju nekaterih faktorjev strjevanja krvi. Če pride do njih, se ta čas znatno podaljša. Za določanje časa koagulacije se v praksi uporabljajo različne metode (tabela 1.1), ki temeljijo na opazovanju določene količine krvi in zapisovanju časa nastanka očitnih znamenj njene koagulacije.

Tabela 1.1: Časi koagulacije krvi pri živalih, izmerjeni pri različnih metodah

Živalska vrsta	Metoda		
	na predmetnici [min]	po Foniu [min]	po Lee-Whitu [min]
pes	2–4	2,5	3–5
drobnica	–	2,5	–
prašič	–	3,5	–
kunec	2–4	4,5	3–5
kokoš	–	4,5	–
govedo	–	6,5	3–6
konj	7–8	11,5	6–12
človek	4–5	–	5–10

- **Metoda na predmetnici:** Kapljico krvi kanemo iz žile na predmetnico, jo vsakih 15 sekund nagnemo in opazujemo, kdaj bo nehala drseti. Čas odčitamo na uri, ki smo jo sprožili, ko smo kapljico kanili na predmetnico.
- **Metoda po Foniu:** Na urno steklo kanemo direktno iz kanile, zabodene v veno, 10 kapljic krvi. Stekelce postavimo v petrijevko z navlaženim filtrirnim papirjem. Z občasnim nagibanjem ugotovimo, kdaj kri preneha drseti po urnem steklu. Merimo čas od trenutka, ko smo kri kanili na urno stekelce, do trenutka, ko preneha drseti.

- **Metoda po Lee-Whitu:** Iz periferne vene odvzamemo kri z brizgo. V vsako od štirih epruvet direktno iz brizge odmerimo po 1 ml krvi. Epruvete postavimo v vodno kopel, segreto na 37–39 °C. Vsakih 20–30 sekund nagnemo dve epruveti do kota 45° in opazujemo, kdaj se kri strdi. Takrat preverimo tudi nastanek krvnega strdka v drugih dveh epruvetah. Merimo čas od trenutka, ko smo kri natočili v epruvete, do trenutka, ko se v vseh štirih epruvetah strdi.

Naloge:

1. Shematično prikažite izvedbo metod!
2. Z eno od metod izmerite čas koagulacije krvi pri kuncu!

1.2.6 Določanje časa krvavitve

Čas krvavitve je čas, ki je potreben, da preneha kri iztekati iz žile. Na čas krvavitve vplivajo faktorji koagulacije krvi in krčenje krvnih žil.

a) Material:

- Sterilna igla ali lanceta, filtrirni papir, kunec (v zabojčku) in laboratorijska ura.

b) Postopek:

1. Kuncu ostrižemo dlako in z alkoholom in etrom očistimo kožo nad ušesno veno.
2. Z iglo ali lanceto naredimo vbod v veno.
3. Ko se pokaže prva kaplja krvi, sprožimo uro in nato vsakih 30 sekund popivnamo novonastalo kapljo krvi z robom filtrirnega papirja. Konec krvavitve nastopi, ko kri ne pušča več sledi na filtrirnem papirju.

c) Naloge:

1. Shematično ponazorite izvedbo postopka!
2. Določite čas krvavitve pri kuncu!

1.3 DOLOČANJE VISKOZNOSTI KRVI IN KRVNE PLAZME (SERUMA)

Hitrost gibanja tekočin v enakih kapilarah, pod enakim tlakom in na enaki temperaturi je odvisna od notranjega trenja njihovih delcev. Ta pojav imenujemo viskoznost. Viskoznost koloidnih raztopin je znatno večja kot viskoznost pravih raztopin. Viskoznost tekočin lahko ocenimo na osnovi merjenja hitrosti prehoda določene tekočine skozi kapilarno cevko v primerjavi s hitrostjo prehoda destilirane vode. Naprava za merjenje viskoznosti se imenuje viskozimeter, obstaja pa več različnih tipov (npr. kapilarni, rotacijski).

Viskoznost krvi je odvisna od števila in velikosti krvnih celic kot tudi od vsebnosti vode in snovi, raztopljenih v plazmi (zlasti beljakovin in fibrinogena), zato se razlikuje glede na vrsto živali (pri mesojedih je večja kot pri rastlinojedih), spol (pri moških osebkih je večja kot pri ženskih), prehrano in fiziološko oziroma patološko stanje organizma (npr. izguba vode iz organizma poveča viskoznost krvi). Vrednost relativne viskoznosti krvi pri domačih živalih (tabela 1.2) znaša 4,3 do 5,9, seruma pa 1,6 do 2,0 (v primerjavi z destilirano vodo, katere viskoznost je 1).

a) Material:

- Lijak z zoženim iztokom, kri, krvna plazma ali serum, destilirana voda, pipete, stojalo s prižemo in štoparica.

Tabela 1.2: Relativna viskoznost krvi in krvnega seruma domačih živali in človeka

Vrsta živali	Kri	Serum
konj	4,1	2,04
govedo	4,6	1,87
ovca	4,3	1,61
koza	4,0	1,75
prašič	5,9	1,69
pes	4,7	1,74
človek	4,5	1,80

b) Postopek:

- V lijak, s prižemo pritrjen na stojalo, odpipetiramo 2 ml destilirane vode in izmerimo čas, ki je potreben, da izteče vsa voda.
- Postopek ponovimo še s krvjo in krvno plazmo (ali serumom). Pred vsakim merjenjem je treba lijak očistiti in osušiti!
- Viskoznost preiskovane tekočine izračunamo po spodnji enačbi:

$$V_n = V_v \times (t_n/t_v)$$

(V_n – viskoznost preiskovane tekočine, V_v – viskoznost vode, t_n – čas pretoka preiskovane tekočine, t_v – čas pretoka vode)

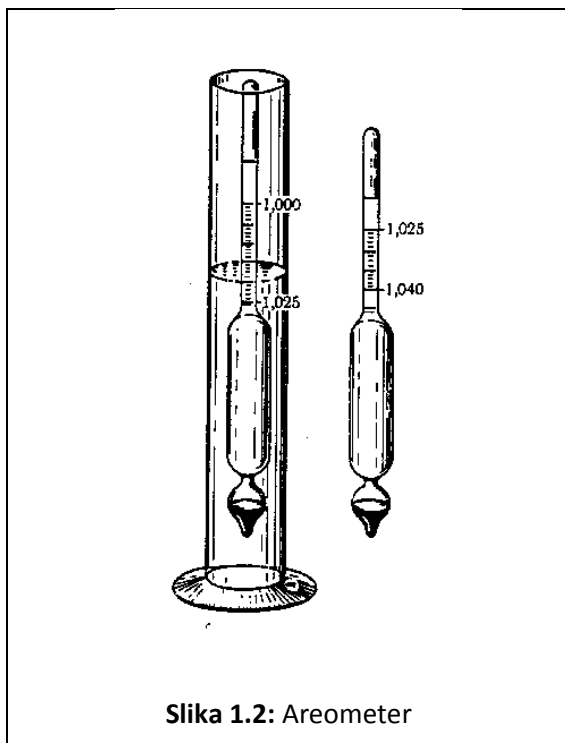
c) Naloge:

- Shematično prikažite izvedbo meritve!
- Izmerite čas iztekanja vode, krvi in plazme oziroma seruma in ocenite viskoznost posameznih tekočin!
- Razložite opazovane pojave!

1.4 MERJENJE GOSTOTE KRVI IN KRVNE PLAZME (SERUMA)

Gostota snovi je razmerje med njeno maso in volumnom ($\rho = m/V$). Enota je kg/m^3 oziroma g/L . Gostota krvi je med 1035 in 1060 g/L in je odvisna od števila eritrocitov, količine hemoglobina in koncentracije elektrolitov in beljakovin v krvni plazmi. Gostota krvnega seruma znaša 1020 do 1027 g/L , gostota eritrocitov pa 1080 do 1090 g/L .

1.4.1 Neposredno merjenje gostote krvi



Slika 1.2: Areometer

Večjim količinam krvi (krvne plazme ali seruma) lahko izmerimo gostoto neposredno z areometrom ali piknometrom.

Pri merjenju gostote z **areometrom** tega potopimo v stekleno čašo, napolnjeno s krvjo, krvno plazmo ali krvnim serumom (slika 1.2) in na skali neposredno odčitamo vrednot gostote.

Kadar merimo gostoto s **piknometrom**, najprej stehamo prazen piknometrom. Nato ga napolnimo s preiskovano tekočino in zopet stehamo. Gostoto preiskovane tekočine izračunamo tako, da od vrednosti mase piknometra s preiskovano tekočino odštejemo vrednost mase praznega piknometra, nato maso preiskovane tekočine delimo z njenim volumnom ($\rho = m/V$).

1.4.2 Posredno določanje gostote krvi in krvnega seruma (plazme) z raztopino bakrovega sulfata

Ta metoda določanja gostote krvi temelji na principu, po katerem telo lebdi v tekočini, katere gostota je enaka gostoti telesa, v tekočini z nižjo gostoto potone in v tekočini z višjo gostoto se dvigne na površino. Kapljica krvi v raztopini bakrovega sulfata ne bo razpadla zaradi nastanka bakrovega proteinata na njeni površini. Prednost metode je predvsem v tem, da lahko merimo gostoto majhne količine vzorca.

a) Material:

- Nasičena raztopina modre galice ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$), destilirana voda, citratna kri, epruvete, pipete in kapalke.

b) Postopek:

1. Nasičeno raztopino modre galice pripravimo tako, da 2 kg modre galice raztopimo v 2,5 L destilirane vode. Ker je raztopina nasičena, se vsa modra galica ne raztopi. Raztopino najprej filtriramo, nato pa 488 ml nasičene raztopine razredčimo z destilirano vodo do volumna 1 litra. S tem dobimo **osnovno raztopino modre galice** z gostoto 1100 g/L , ki jo

preverimo z areometrom in po potrebi korigiramo.

2. V označenih epruvetah po navodilih (gl. tabelo 1.3) pripravimo raztopine modre galice različnih specifičnih tež.
3. V vsako epruveto kanemo kapljico krvi in opazujemo njeno obnašanje 5 do 10 sekund. Rezultat zapišemo v tabelo 1.3.
4. Postopek ponovimo (v istih epruvetah) še s krvnim serumom

c) Naloge:

1. Shematično prikažite izvedbo vaje!
2. Na osnovi obnašanja kapljic v posameznih epruvetah določite gostoto krvi in krvne plazme oziroma seruma! Rezultate meritev vnesite v tabelo 1.3!

Tabela 1.3: Priprava raztopin modre galice določenih gostot (gostota osnovne raztopine je 1100 g/L)

Številka epruvete	Volumen osnovne raztopine [ml]	Volumen vode [ml]	Gostota raztopine [g/L]	Obnašanje kapljice
1	1,9	8,1	1020	
2	2,1	7,9	1022	
3	2,3	7,7	1024	
4	2,5	7,5	1026	
5	2,7	7,3	1028	
6	2,9	7,1	1030	
7	3,1	6,9	1032	
8	3,3	6,7	1034	
9	3,5	6,5	1036	
10	3,7	6,3	1038	
11	3,9	6,1	1040	
12	4,1	5,9	1042	
13	4,3	5,7	1044	
14	4,5	5,5	1046	
15	4,7	5,3	1048	
16	4,9	5,1	1050	
17	5,1	4,9	1052	
18	5,3	4,7	1054	
19	5,5	4,5	1056	
20	5,7	4,3	1058	
21	5,9	4,1	1060	
22	6,1	3,9	1062	
23	6,3	3,7	1064	
24	6,5	3,5	1066	
25	6,7	3,3	1068	

1.5 HEMATOKRIT

Hematokrit je volumski odnos med količino krvnih celic in količino krvne plazme in prikazuje delež eritrocitov v krvi. Določamo ga s centrifugiranjem venske krvi, ki smo ji dodali nek antikoagulant. Po centrifugiranju dobimo na dnu hematokritske cevke stolpec eritrocitov, nad tem je sloj levkocitov in trombocitov (debeline 0,5 do 1 mm), nad njim pa krvna plazma. Vrednost hematokrita določimo z računanjem razmerja med celotno višino stolpca krvi in višino stolpca eritrocitov. Postopek lahko poenostavimo z uporabo graduiranih cevčic ali posebnih čitalcev. Delež eritrocitov izražamo glede na celotno kri v odstotkih (% – stari merski sistem) ali v deležu od ena [$^1/1$] po SI. V angloameriški literaturi zasledimo namesto hematokrita tudi izraz PCV (*Packed Cell Volume*).

Vrednost hematokrita je odvisna od velikosti in števila eritrocitov v krvi, zato se razlikuje glede na vrsto živali (tabela 1.4), starost, spol, vpliv zunanjih faktorjev in bolezenskih stanj. Padeč hematokrita pod fiziološke vrednosti je posledica zmanjšanja števila oziroma velikosti eritrocitov (anemije) zaradi izgube krvi ali motenj v nastajanju eritrocitov. Dvig nad normalne vrednosti pa je posledica povečanja števila eritrocitov (policitemije) oziroma njihove velikosti. Nastane lahko tudi ob dehidraciji živali (zaradi znojenja, bruhanja ali driske) ali zaradi ekscitacij, ki izzovejo izločanje eritrocitov iz vranice (zaradi večjih količin adrenalina).

Tabela 1.4: Vrednost hematokrita (povprečje in razpon fizioloških vrednosti) pri domačih živalih

Vrsta živali	Povprečje [$^1/1$]	Razpon fizioloških vrednosti [$^1/1$]
govedo – Ž	0,34	0,24–0,43
M	0,35	0,28–0,52
konj	0,4	0,32–0,53
ovca	0,37	0,29–0,45
koza	0,30	0,21–0,42
prašič	0,42	0,34–0,50
pes	0,46	0,35–0,56
mačka	0,37	0,42–0,40
opica	0,42	0,34–0,49
kunec	0,39	0,28–0,46
podgana	0,42	0,37–0,48
kokoš	0,32	0,27–0,51
človek – Ž	0,42	0,37–0,47
M	0,47	0,40–0,54

1.5.1 Korekcija hematokrita

Pri centrifugiranju krvi v sloju eritrocitov vedno ostane del plazme. Količina te plazme je odvisna od številnih faktorjev, npr. od trajanja in hitrosti centrifugiranja, razlike med metodami (pri mikrohematokritski metodi manjše količine kot pri makrohematokritski), velikosti eritrocitov (čim večji so eritrociti, manj je zaostale plazme) in od vrednosti hematokrita (čim nižje so vrednosti, manj je zaostale plazme). Pri vrednostih hematokrita od 0,13 do 0,20 je zaostale plazme 1,5–2,5 %, pri vrednostih 0,40 do 0,45 od 4,5–5,5 %, pri vrednostih od 0,60 do 0,65 pa 7–8 %.

- **Pravi hematokrit venske krvi** je izmerjeni hematokrit venske krvi, zmanjšan za tisto količino plazme, ki ostane po centrifugiranju v stolpcu celic. Dobimo ga, če vrednost hematokrita, ki jo dobimo ob centrifugiranju venske krvi, pomnožimo s faktorjem za zaostalo plazmo:

$$Ht_{pr} = Ht_{izm} \times F_{zp}$$

(Ht_{pr} – pravi hematokrit venske krvi, Ht_{iz} – izmerjeni hematokrit venske krvi, F_{zp} – faktor za zaostalo plazmo)

Faktor za zaostalo plazmo dobimo s primerjavo pravega volumna krvi živali in preračunanega volumna krvi iz venskega hematokrita in znaša za psa 0,97, za ovco 0,91, za kozo 0,91 in za človeka 0,99.

- **Telesni hematokrit:** Razmerje med eritrociti in plazmo v velikih krvnih žilah je drugačno kot v majhnih, zato se razlikujejo tudi vrednosti hematokrita. Hematokrit venske in arterijske krvi je večji kot hematokrit v majhnih krvnih žilah zaradi razlik med razmerjem površine endotela krvnih žil in volumnom lumena, ob pretoku krvi je več plazme na površini toka krvi. Vrednost telesnega hematokrita dobimo z množenjem pravega hematokrita venske krvi s faktorjem za razmerje telo/vene ali z množenjem izmerjenega hematokrita s splošnim korekcijskim faktorjem:

$$Ht_{tel} = Ht_{pr} \times F_{t:v} = Ht_{izm} \times F_{spl}$$

(Ht_{tel} – telesni hematokrit, $F_{t:v}$ – faktor za razmerje telo/vene, F_{spl} – splošni korekcijski faktor)

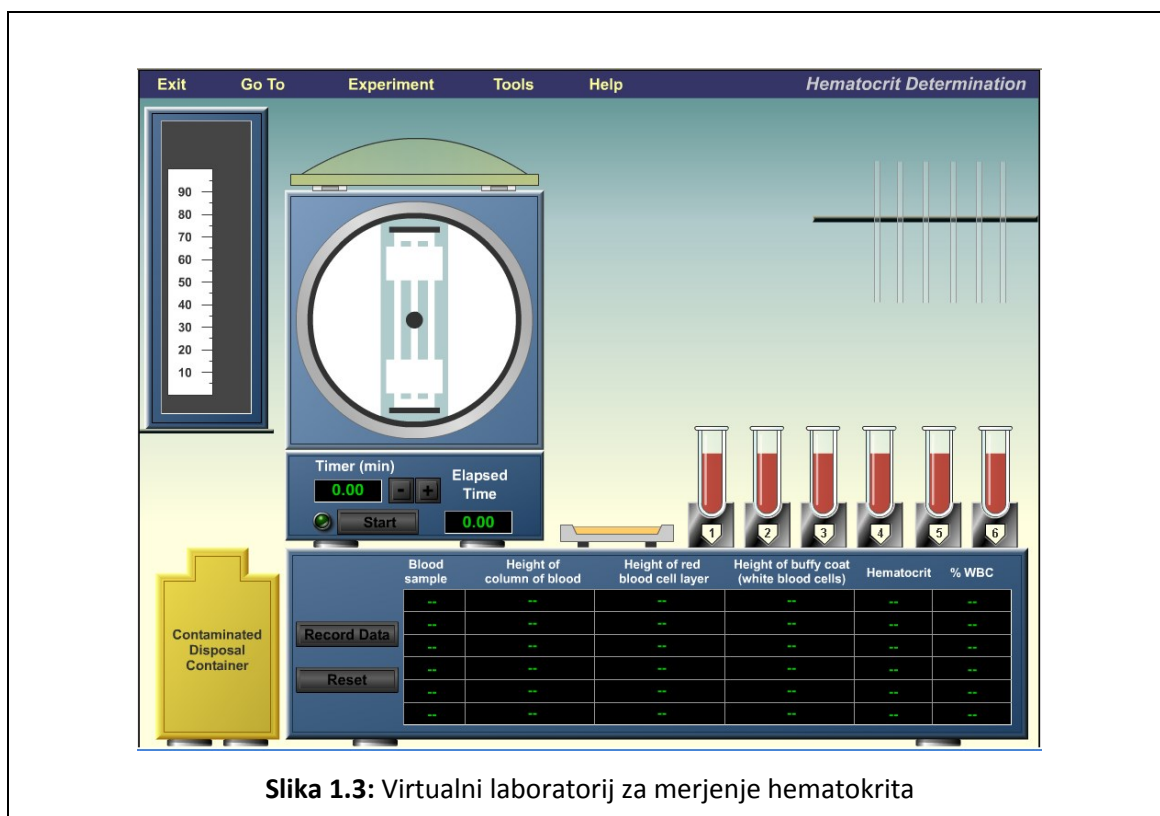
Faktor za razmerje telo/vene znaša za psa 0,89, za kozo 0,90, za prašiča 0,71 in za kunca 0,89. Vpliv na ta faktor imajo npr. starost, velikost, stopnja aktivnosti živali, koncentracija hemoglobina. Splošni korekcijski faktor venskega hematokrita (F_{spl}) pa dobimo z množenjem faktorja za zaostalo plazmo s faktorjem za razmerje telo/vene ($F_{spl} = F_{zp} \times F_{t:v}$).

1.5.2 Prikaz merjenja hematokrita

Merjenje hematokrita lahko prikažemo z računalniško simulacijo (npr. PhysioEx). Računalniško simulacijo odpremo z izbiro ukaza **Poskus/Določanje hematokrita** (*Experiment/Haematocrit determination*) v poglavju **Krvne analize** (*Blood analyses*). Virtualni laboratorij za merjenje hematokrita prikazuje slika 1.3. Na spodnjem delu virtualnega laboratorija je enota za shranjevanje rezultatov, nad njo je levo hematokritska centrifuga, desno stojalo za epruvete, med njima pa posodica z voskom za zapiranje cevk. V zgornjem desnem kotu so heparinizirane steklene kapilare, v levem pa čitalec hematokrita. Spodaj levo je posoda za odlaganje s krvjo kontaminiranega materiala.

a) Postopek:

1. Kapilarno cevko premaknemo v prvo epruveto s krvjo; cevka se napolni zaradi kapilarnega vleka.
2. Napolnjeno kapilarno cevko premaknemo k posodici z voskom; cevka se zamaši na spodnji strani.
3. Napolnjeno in zamašeno kapilarno cevko prenesemo v mikrohematokritsko centrifugo.
4. Postopek ponovimo še z ostalimi vzorci.
5. Delovanje centrifuge naravnamo na 5 minut (s tipkama **(+)** in **(-)** ob prikazu) in z ukazom **Start** poženemo centrifugo.
6. Ko se centrifuga ustavi in odpre, prenesemo 1. cevko v merilec hematokrita, ki nam pokaže višino stolpca eritrocitov in levkocitov. Rezultate zapišemo v zgornji tabeli.
7. Postopek ponovimo še z ostalimi cevkami.



Slika 1.3: Virtualni laboratorij za merjenje hematokrita

Številka vzorca	Višina stolpca krvi (mm)	Višina stolpca eritrocitov (mm)	Vrednost hematokrita ($\frac{1}{1}$)	Razlaga
1				
2				
3				
4				
5				
6				

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v zgornjo tabelo!
2. Razložite, kakšni so po vašem mnenju razlogi za razlike med izmerjenimi vrednostmi hematokrita!

1.5.3 Določanje hematokrita z metodo po Wintrobeju**a) Material:**

- Wintrobejeve hematokritske epruvete, citratna kri, brizga z dolgo iglo, centrifuga in staničevina.

b) Postopek:

- a) Z dobro premešano citratno krvjo napolnimo (z brizgo z dolgo iglo) Wintrobejevo epruveto do zgornje oznake.
- b) Cevko centrifugiramo 30 minut pri 3000 obratih/min.
- c) Po končanem centrifugiranju odčitamo višino stolpca eritrocitov.

c) Naloge:

1. Narišite in opišite hematokritsko cevčico po Wintrobeju!
2. Izmerite hematokritsko vrednost krvi!

1.5.4 Določanje hematokrita z mikrohematokritsko metodo

a) Material:

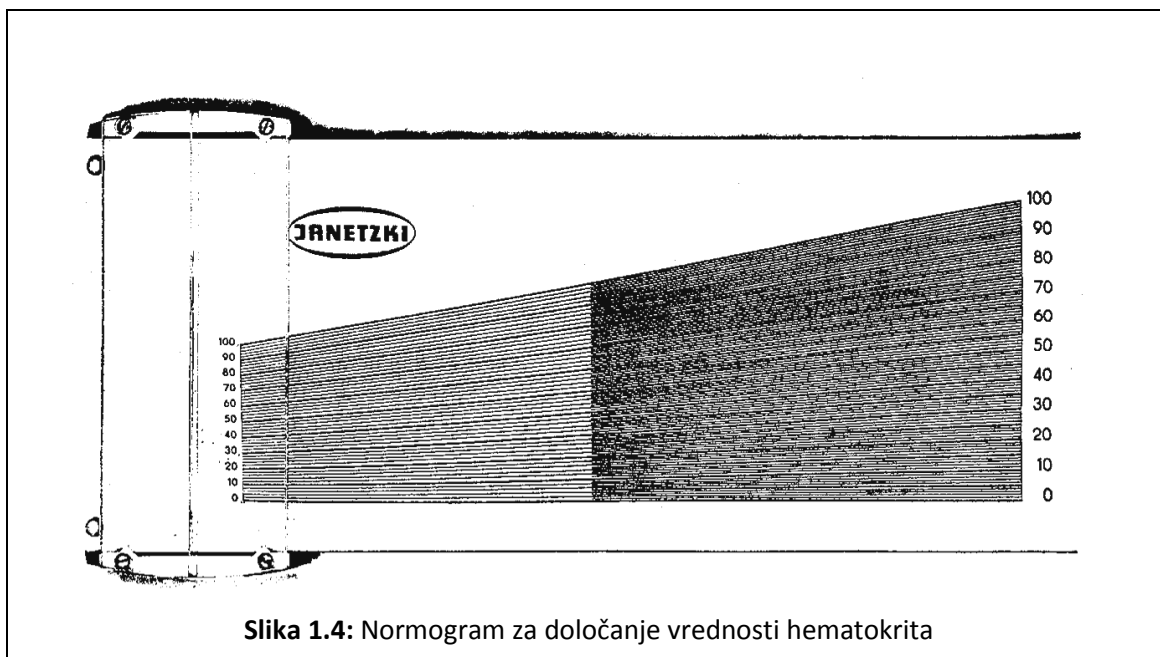
- Citratna kri, kapilarne cevčice (heparinizirane), vosek (kit), mikrohematokritska centrifuga, normogram za odčitavanje vrednosti (slika 1.4).

b) Postopek:

1. Kapilarne cevčice napolnimo s krvjo in na enem koncu zamašimo.
2. Cevčice vstavimo v centrifugo (z zamašenim koncem navzven).
3. Centrifugiramo 2 minuti in pol (števila obratov ni treba uravnavati, ker je avtomatsko regulirano).
4. Po končanem centrifugiranju cevčico namestimo v ležišče pomičnega dela na čitalcu, ki ga premikamo toliko časa, da leži vsebina kapilare med spodnjo in zgornjo oznako normograma.

c) Naloge:

1. Opišite cevčico za izvedbo mikrohematokritske metode!
2. Izmerite mikrohematokritsko vrednost vzorca krvi! Vrednost primerjajte z rezultatom, ki ste ga izmerili z makrohematokritsko metodo!



1.6 SEDIMENTACIJA KRVI

V krvi, ki smo ji dodali antikoagulant, je suspenzija eritrocitov nekaj časa stabilna, nato pa pride do posedanja eritrocitov in njihovega ločevanja iz plazme. Intenzivnost tega posedanja – **sedimentacije** – je merilo stabilnosti suspenzije eritrocitov v krvni plazmi. Hitrost sedimentacije je odvisna od stopnje adhezivnosti in nagnjenosti eritrocitov k aglutinaciji, velikosti eritrocitov, prisotnosti različnih snovi v plazmi (npr. serumski albumini povečajo stabilnost suspenzije eritrocitov in upočasnijo sedimentacijo, fibrinogen, glikoproteidi in gamaglobulini pa jo pospešijo), viskoznosti krvne plazme, specifične teže krvnih celic ali plazme, zunanje temperature, antikoagulantov in nagiba merilne pipete.

Pri različnih živalskih vrstah poteka različno hitro. Najhitrejša je pri konju, medtem ko je pri eritrocitih prežvekovalcev zanemarljiva. Vpliv eritrocitov lahko dokažemo s poskusom: če damo eritrocite konja v govejo plazmo, ti hitro sedimentirajo, eritrociti goveda v konjski plazmi pa počasi.

Tabela 1.5: Vrednosti navpične sedimentacije eritrocitov (v mm) pri domačih živalih in človeku

Vrsta živali	Čas sedimentacije			
	30 min	60 min	120 min	24 ur
govedo	0,5	1,0	2,0	12,0
konj	107,0	135,0	143,0	148,0
ovca	–	0,6	1,3	12,6
koza	0,25	0,5	1,0	8,0
prašič	2,5	5,0	10,0	45,0
pes	1,0	2,0	4,0	10,0
mačka	2,7	7,3	16,0	46,0
kunec	1,0	1,5	3,0	31,0
kokoš	–	4,0	8,0	45,0
človek – Ž	–	3–12	12–25	–
M	–	2–10	10–20	–

Proces sedimentacije poteka v treh fazah. V prvi sedimentirajo posamezni eritrociti, v drugi eritrociti, združeni v agregate, v tretji pa se seseda stebriček eritrocitov in pri tem iztiska med celicami zastalo plazmo.

Faktorje, ki vplivajo na sedimentacijo krvi, lahko zbirno prikažemo s formulo:

$$V_s = \frac{2r^2 (S_1 - S_2)g}{9n}$$

(V_s – hitrost sedimentacije krvi, r – premer eritrocita, S_1 – gostota eritrocitov, S_2 – gostota plazme, g – konstanta gravitacije, n – koeficient viskoznosti plazme)

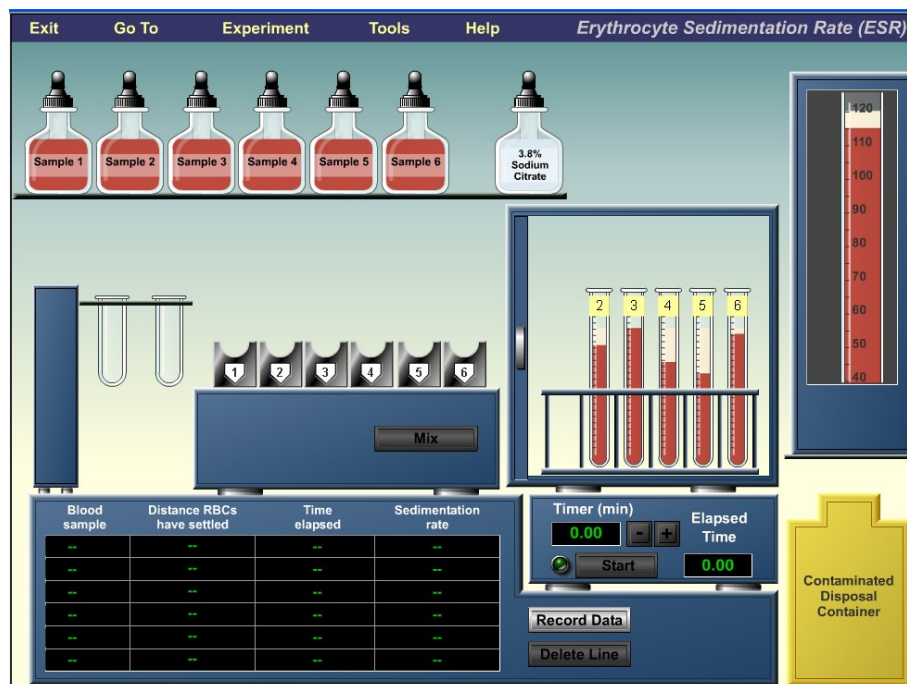
Pri zdravih osebkih je sedimentacija eritrocitov razmeroma počasna, povečano nastajanje fibrinogena in imunoglobulinov pa povzroči zlepljanje eritrocitov in oblikovanje stolpcev (*rouleaux*), zato se eritrociti posedajo hitreje. Merjenje sedimentacije eritrocitov ni specifičen diagnostični postopek, temveč se uporablja le kot pomožni podatek pri ocenjevanju

zdravstvenega stanja. Z njegovo pomočjo lahko spremljamo razvoj različnih bolezni, predvsem vnetij in nekaterih oblik raka (ob slabšanju stanja pacienta hitrost sedimentacije narašča, ob izboljšanju pa upada). Vpliv različnih fizioloških in patoloških stanj na hitrost sedimentacije lahko najboljše vidimo pri psih, mačkah in prašičih.

- **Pospešena sedimentacija** nastopi, kadar v organizmu nastaja več fibrinogena, glikoproteidov, gamaglobulinov oziroma manj albuminov, kot je fiziološko zaradi povečanega razpadanja tkiv, vdora ali sproščanja tujih beljakovin v organizem, zmanjšanja števila eritrocitov ali količine hemoglobina v njih ali povečanja deleža vode v krvi. To se lahko zgodi pri številnih akutnih in kroničnih obolenjih ter malignih tumorjih, anemijah in hipotireoidizmu. Fiziološko je sedimentacija pospešena v gravidnosti.
- **Upočasnjena sedimentacija** se pojavi ob policitemijah, hemokonzraciji, hudi oslabelosti organizma in pri alergijskih boleznih.

1.6.1 Prikaz merjenja sedimentacije

Merjenje sedimentacije eritrocitov lahko prikažemo z računalniško simulacijo PhysioEx. Poskus odpremo z ukazoma **Poskus/Hitrost sedimentacije eritrocitov (Experiment/Erythrocyte Sedimentation Rate)** v poglavju **Krvne analize (Blood analyses)**. V virtualnem laboratoriju (slika 1.5) so na polici v zgornjem delu ekrana stekleničke z vzorci krvi. Desno od njih je steklenička z natrijevim citratom, ki ga pri tej metodi moramo dodati vzorcem krvi. Pod policičo sta stojalo za epruvete z mešalcem in omarica s cevkami za sedimentacijo. Pod omarico je ura, s katero merimo čas sedimentacije. Na desnem robu virtualnega laboratorija je omarica s povečevalnim steklom, ki pomaga pri odčitavanju rezultatov. Spodaj levo je posoda, v katero odlagamo ves material, ki je prišel v stik s krvjo.



Slika 1.5: Virtualni laboratorij za prikaz hitrosti sedimentacije eritrocitov

a) Postopek:

1. V stojalo postavimo 6 epruvet.
2. Iz stekleničke s 1. vzorcem prenesemo 1 ml krvi v 1. epruveto. Postopek ponovimo še z ostalimi 5 vzorci.
3. Iz stekleničke z natrijevim citratom prenesemo po 0,5 ml raztopine v vsako epruveto.
4. Izberemo ukaz **Premešaj (Mix)** na stojalu za epruvete. Vsebina epruvet se meša 5 sekund. Po končanem mešanju se odpre omarica z epruvetami za sedimentacijo.
5. Prvo epruveto z vzorcem premaknemo nad prvo sedimentacijsko epruveto in prelijemo vsebino. Izpraznjeno epruveto premaknemo v posodo za odpadke. Postopek ponovimo še z ostalimi vzorci.
6. Nastavimo čas na 60 min (s tipko **(+)**) in poženemo meritev **(Start)**. Omarica se zapre. Po izteku časa sedimentacije (v virtualnem laboratoriju 60 sek) se vrata omarice ponovno odprejo.
7. Epruveto s prvim vzorcem premaknemo v omarico s povečevalnim steklom in odčitamo sedimentacijo. Rezultat zapišemo. Postopek ponovimo še z ostalimi vzorci.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kako se razlikuje čas sedimentacije med posameznimi vzorci?
 - Pojasnite vzroke za nastale razlike!

Številka vzorca	Hitrost sedimentacije (mm/h)	Razlaga
1		
2		
3		
4		
5		
6		

1.6.2 Metoda navpične sedimentacije (po Westergreenu)**a) Material:**

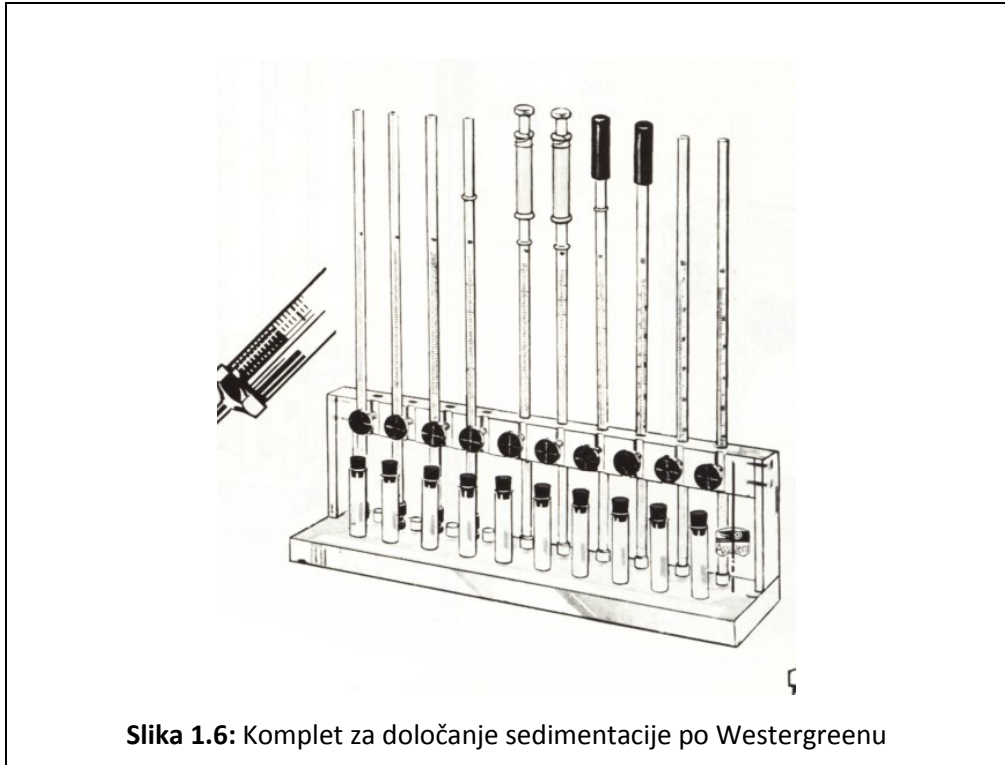
- Stojalo za pipete, Westergreenove pipete (30 cm dolge steklene cevke z notranjim premerom 1–2 mm, graduirane od zgoraj navzdol v presledkih 1 mm v dolžini 200 mm), citratna kri različnih živalskih vrst.

b) Postopek:

1. Kri vsesamo do oznake 0 in pipeto vstavimo v stojalo.
2. Zapišemo točen čas in odčitamo rezultate 10, 20, 30 in 60 min ter po 2, 3 in 24 urah po začetku merjenja.

c) Naloge:

1. Narišite in opišite pipeto po Westergreenu!
2. Ugotovite vrednost sedimentacije v vašem vzorcu krvi v različnih časovnih obdobjih (10, 20, 30 in 60 min ter po 2, 3 in 24 urah) po začetku merjenja in grafično ponazorite rezultate!
3. Meritve izvedite s krvjo različnih živalskih vrst in primerjajte rezultate!



Slika 1.6: Komplet za določanje sedimentacije po Westergreenu

1.6.3 Metoda poševne sedimentacije

V poševno ležečih epruvetah kri hitreje sedimentira, ker se pri sesedanju eritrocitov vzpostavi kroženje: eritrociti hitreje dosežejo steno poševne cevke, po kateri naglo drsijo proti dnu, po nasprotni steni pa se dviga plazma. Najhitreje poteka sedimentacija pri nagibu 66° . Tedaj je v dvajsetih minutah tolikšna kot v navpični cevki v 24 urah.

a) Material:

- Aparat za sedimentacijo krvi (npr. po Taubnerju), citratna kri.

b) Postopek:

1. Spodnjo posodico aparata po Taubnerju napolnimo do notranjega roba, jo pokrijemo z zamaškom, v katerega smo namestili stekleno cevko, in privijamo zamašek, dokler meniskus krvi ne doseže oznake 0.
2. Napolnjene cevke položimo v ležišče.
3. Po 20 minutah odčitamo rezultate.

c) Naloge:

1. Shematično narišite sestavne dele aparata za poševno sedimentacijo!
2. Razložite (narišite) vzroke za hitrejši potek sedimentacije pri poševni metodi v primerjavi z navpično!
3. Ugotovite vrednosti sedimentacije v vzorcih krvi različnih vrst domačih živali in jih primerjajte z vrednostmi, ki ste jih dobili z metodo po Westergreenu!

4. Grafično prikažite rezultate!

1.7 HEMOLIZA IN OSMOTSKA REZISTENCA ERITROCITOV

Če eritrocitna membrana počni, vsebina eritrocita preide v okolico in rdeče obarva serum ali plazmo. Delno razpadanje eritrocitov (hemoliza) je fiziološki pojav in je posledica staranja eritrocitov. V različnih patoloških stanjih pa eritrociti razpadajo v večjem obsegu (npr. ob nekaterih oblikah anemije).

Zunaj organizma razpadanje eritrocitov povzročajo različne kemične snovi (npr. eter, kloroform, amonijeve in žolčne soli, lugi, kisline, saponini itd.), ki raztapljajo eritrocitno membrano, in fizikalni dejavniki, npr. previsoka ali prenizka temperatura okolja, grobo ravnanje s krvjo (stresanje) ali močan podtlak v brizgi ob jemanju krvi.

1.7.1 Prikaz hemolize

a) Material:

- Citratna kri, destilirana voda, fiziološka raztopina za toplokrvne živali, zamrzovalnik, hematološke epruvete v stojalu, pipete, mikropipete.

b) Postopek:

1. Pripravimo in označimo tri hematološke epruvete.
2. V prvo in tretjo epruveto odpipetiramo 5 ml fiziološke raztopine, v drugo pa 5 ml destilirane vode.
3. V vsako epruveto z mikropipeto dodamo enako količino krvi in vsebino epruвет premešamo.
4. Tretjo epruveto damo za 2 uri v zamrzovalnik in nato vsebino počasi odtajamo.

c) Naloge:

1. Shematično prikažite izvedbo vaje!
2. Opišite vsebino epruвет in razložite opazovane pojave!

1.7.2 Določanje osmotske rezistence eritrocitov

V hipotonični raztopini voda iz okolja prehaja v eritrocit, dokler se osmotski tlak ne izenači. Če je razlika prevelika, pa pride do pokanja membrane eritrocitov in hemolize.

V različnih koncentracijah hipotoničnih raztopin eritrociti hemolizirajo postopno glede na odpornost njihovih membran proti osmotskemu tlaku okolice, kar imenujemo **osmotska rezistenca eritrocitov**. V laboratoriju ugotavljamo odpornost eritrocitov v primerjavi s serijo hipotoničnih raztopin NaCl. Koncentracija, pri kateri opazimo začetno hemolizo eritrocitov, se imenuje **minimalna osmotska rezistenca eritrocitov** (pri tej koncentraciji propadejo najmanj odporni eritrociti). Vrednost koncentracije NaCl, pri kateri razpadejo vsi eritrociti, pa se imenuje **maksimalna osmotska rezistenca eritrocitov** (pri tej koncentraciji propadejo tudi najbolj odporni eritrociti).

Osmotska rezistenca eritrocitov (tabela 1.6) je odvisna od velikosti in oblike eritrocitov (na splošno velja: čim manjša je celica, tem bolj je občutljiva na vdor vode in prej hemolizira). Zato se razlikuje glede na vrsto živali in fiziološko ali patološko stanje živali (zmanjšana je npr. ob hemolitični zlatenici, avtoimunskih hemolitičnih anemijah, zastrupitvah in obsežnih opeklinah, povečana pa ob hipokromnih anemijah in talasemiji).

Za natančnejše določanje stopnje hemolize med minimalno in maksimalno osmotsko rezistenco eritrocitov uporabljamo kolorimetrično metodo, rezultate pa lahko ponazorimo grafično.

Do uvedbe mednarodnega merskega sistema (SI) so osmotsko rezistenco eritrocitov izražali v g% (g/100 ml) NaCl, sedaj pa je uvedeno izražanje v mmol/L. Pretvorbe opravimo po formulah:

$$\text{mmol/L (NaCl)} = \text{mg/100 ml (NaCl)} \times 0,170$$

$$\text{mg/100 ml (NaCl)} = \text{mmol/L (NaCl)} \times 5,8$$

Tabela 1.6: Minimalna in maksimalna osmotska rezistenca eritrocitov pri različnih vrstah domačih živali in pri človeku

Vrsta živali	Koncentracija NaCl			
	Minimalna		Maksimalna	
	g/100 ml	mmol/L	g/100 ml	mmol/L
konj	0,59	100,3	0,39	66,3
govedo	0,59	100,3	0,42	71,66
ovca	0,60	102,0	0,45	76,5
koza	0,62	105,40	0,48	81,6
prašič	0,74	125,8	0,45	76,5
pes	0,45	76,5	0,36	61,2
človek	0,44	74,8	0,32	54,4

a) Material:

- Citratna kri, destilirana voda, osnovna raztopina NaCl snkc 170 mol/L (mkc 10 g/L), pipete (10 ml), kapalke, stojalo z 12 epruветami, centrifuga in fotometer (z zelenim filtrom – 540 nm).

b) Postopek:

1. Po navodilih (tabela 1.7) pripravimo serijo raztopin NaCl od izotonične v prvih do močno hipotonične v zadnjih epruветah. Kot osnovno raztopino uporabimo raztopino NaCl s koncentracijo 10 g/L.
2. V vsako epruветo dodamo po 1 kapljico krvi in dobro premešamo vsebino.
3. Po približno 30 minutah centrifugiramo vzorce (5 min/1000 obratov v min).
4. Po končanem centrifugiranju si ogledamo vsebino epruвет – pozorni smo na barvo raztopine in na prisotnost oziroma velikost "gumbka" eritrocitov na dnu epruвет.
5. Vsebinsko posameznih epruвет fotometriamo – odčitamo ekstinkcije vzorcev. Kot slepi vzorec uporabimo destilirano vodo. Odstotek hemolize izračunamo po formuli:

$$\% \text{ hemolize} = \left(\frac{e_n}{e_{max}} \right) \times 100 \%$$

(e_n – ekstinkcija testnega vzorca, e_{max} – maksimalna ekstinkcija)

c) Naloge:

1. Na osnovi sprememb v vsebini posameznih epruвет in fotometriiranja ugotovite minimalno in maksimalno osmotsko rezistenco vašega vzorca eritrocitov (krvi)!
2. Rezultate opazovanj in meritev vnesite v tabelo 1.7!
3. Na osnovi kolorimetrije narišite krivuljo osmotske rezistence eritrocitov!

Tabela 1.7: Priprava hipotoničnih raztopin NaCl

Št. epruvete	Volumen osnovne raztopine NaCl [ml]	Volumen H ₂ O [ml]	Koncentracija raztopine [g/L]	Videz vsebine epruvete	Ekstinkcija [e]	Delež hemolize [% H]
1	10,0	0	10			
2	9,6	0,4	9,6			
3	9,2	0,8	9,2			
4	8,8	1,2	8,8			
5	8,4	1,6	8,4			
6	8,0	2,0	8,0			
7	7,6	2,4	7,6			
8	7,2	2,8	7,2			
9	6,8	3,2	6,8			
10	6,4	3,6	6,4			
11	6,0	4,0	6,0			
12	5,6	4,4	5,6			
13	5,2	4,8	5,2			
14	4,8	5,2	4,8			
15	4,4	5,6	4,4			
16	4,0	6,0	4,0			
17	3,6	6,4	3,6			
18	3,2	6,8	3,2			
19	2,8	7,2	2,8			
20	2,4	7,6	2,4			
21	2,0	8,0	2,0			
22	1,6	8,4	1,6			
23	1,0	9,0	1,0			
24	0	10,0	0,0			

1.8 HEMOGLOBIN

Hemoglobin (Hb) je najpomembnejša sestavina eritrocitov. Kemično je kromoproteid, sestavljen iz osrednjega beljakovinskega dela – **globina**, na katerega so vezani štirje **hemi** (pigmentni kompleksi železa s protoporfirinom). V celotnem Hb je približno 0,338 % železa. Funkcija Hb je prenos kisika in ogljikovega dioksida, ima pa tudi pufersko vlogo.

1.8.1 Določanje koncentracije hemoglobina

Določanje koncentracije Hb v krvi ima velik pomen, saj na osnovi sprememb v količini lahko sklepamo na nekatere motnje v zvezi z nastajanjem in dozorevanjem eritrocitov in na količino kisika, ki je navzoča v cirkulaciji. Kvantitativno določanje Hb se uporablja za diagnostiko anemij in drugih bolezni krvi in krvnega obtoka. Koncentracija Hb naraste pri policitemiji in nekaterih boleznih srca in ožilja. Povečana je tudi pri osebkih, ki živijo na večjih nadmorskih višinah. Zmanjša pa se pri anemijah, hipotireoidizmu, nekaterih boleznih jeter in ledvic ter po akutni krvavitvi.

Koncentracijo Hb v krvi določamo z različnimi kvantitativnimi metodami. Te delimo na **kolorimetrijske** (na osnovi primerjav barve raztopin Hb ali njegovih derivatov s standardi), **plinometrijske** (na osnovi sposobnosti Hb, da veže kisik), **kemijske** (na osnovi določanja v Hb vezanega železa) in **fizikalne** (na osnovi določanja specifične teže krvi).

V klinični hematologiji se uporabljajo številne metode določanja koncentracije Hb. Po mednarodnem merskem sistemu (SI) izražamo koncentracijo Hb v mol/L krvi (tabela 1.1). V praksi koncentracijo Hb še vedno izražajo v g/100 ml ali v g/L.

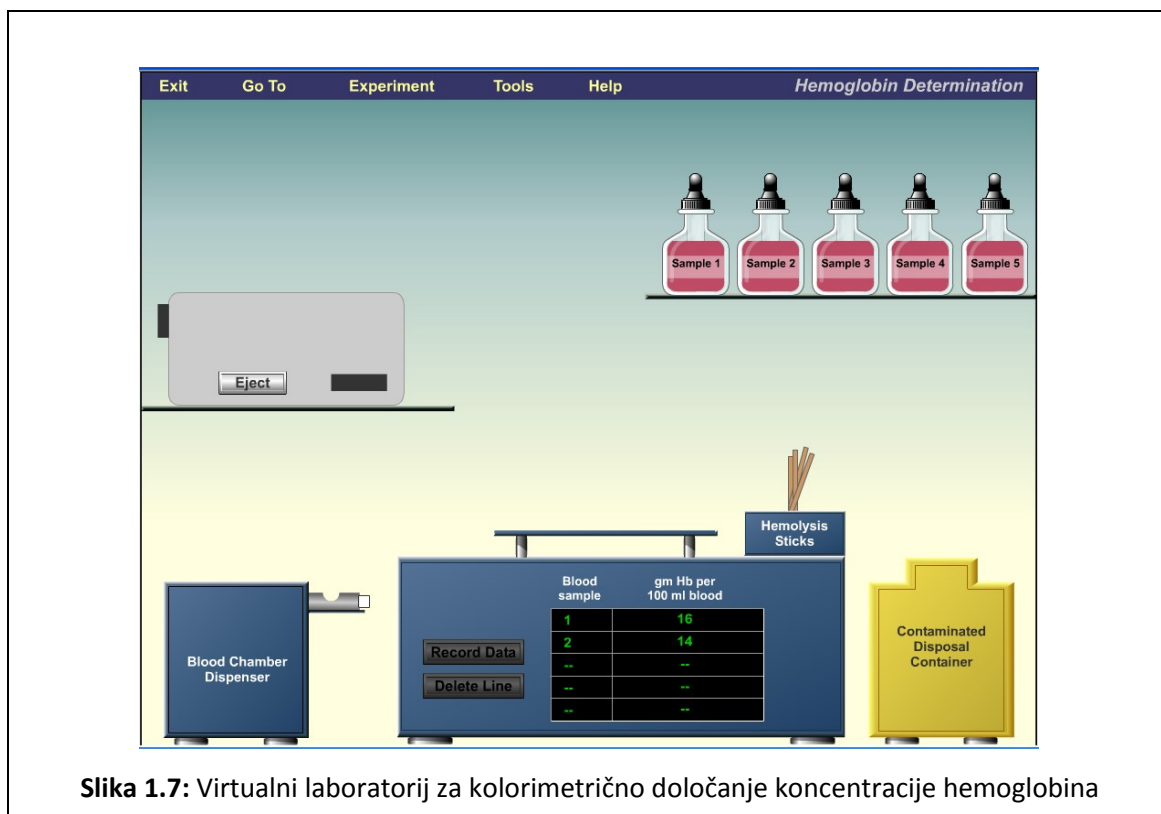
Tabela 1.8: Koncentracija hemoglobina pri domačih živalih (po Jainu)

Vrsta živali	Hemoglobin [g/L]
govedo	100 (80–150)
ovca	115 (90–150)
koza	100 (80–120)
prašič	130 (100–160)
konj	130 (80–190)
pes	150 (120–180)
mačka	120 (80–150)
človek	140 (120–180)

A) Prikaz kolorimetričnega določanja koncentracije hemoglobina

Postopek lahko prikažemo z računalniško simulacijo (npr. PhysioEx). Pri tej metodi je treba vzorec krvi najprej premešati z leseno palčko, da hemolizira. Hemoglobinometer omogoča prenos zelene svetlobe skozi hemolizirani vzorec in primerjavo njegove barve z barvnimi standardi znanih koncentracij Hb. Intenzivnost obarvanja vzorca je odvisna od količine Hb v njem. Zelena barva se uporablja, ker je človeško oko sposobno zelo natančno razlikovati različne odtenke zelene barve.

Iz menija poskusov v poglavju **Krvne analize (Blood analyses)** izberemo ukaz **Poskus/Določanje hemoglobina (Experiment/Hemoglobin Determination)**. V virtualnem laboratoriju (slika 1.7) je zgoraj desno polička s 5 vzorci krvi, levo pa hemoglobinometer. Spodaj je na sredini enota za zapisovanje rezultatov. Nad njo je laboratorijska mizica, na kateri pripravljamo vzorce, ob njej pa posodica z lesenimi palčkami za mešanje vzorcev. Levo je posoda s komoricami za merjenje Hb, desno pa posoda za odlaganje s krvjo kontaminiranega materiala.



Slika 1.7: Virtualni laboratorij za kolorimetrično določanje koncentracije hemoglobina

a) Postopek:

1. Komorico za kri premaknemo na laboratorijsko mizico.
2. Iz prve stekleničke s pomočjo kapalke na zamašku prenesemo kapljico krvi v komorico in jo premešamo z leseno palčko (ob vzorcu se pojavi prikaz časa mešanja, ki traja 45 s).
3. Palčko premaknemo v posodo za odpadke, komorico s hemolizirano krvjo pa v hemoglobinometer. Takoj nato se prikaže barvna skala, katere levi del kaže barvo testnega vzorca, desni del pa barve standardnih vzorcev.
4. Ročico na desni strani prikaza počasi dvigamo in spuščamo, dokler barva testnega vzorca na desni ne ustreza barvi enega od standardov na levi strani. Tedaj odčitamo koncentracijo Hb na prikazu (v g/100 ml) in jo zapišemo.
5. Postopek, opisan v točkah 1 do 4, ponovimo še z ostalimi vzorci!

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kakšne so fiziološke vrednosti koncentracij Hb pri domačih živalih?
 - Ali obstaja razlika med samci in samicami?

Številka vzorca	Koncentracija Hb		Razlaga
	g/100 mL	g/L	
1			
2			
3			
4			
5			

B) Določanje koncentracije hemoglobina po Sahliju

Po tej metodi hemoliziramo eritrocite s solno kislino, sproščeni Hb pa preide v kisli hematin (klorhemin), ki je rjave barve. Raztopino kislega hematina redčimo z destilirano vodo, dokler se barva raztopine ne ujema z barvo standarda.

a) Material:

- Hemoglobinometer po Sahliju, mikropipete, steklena palčka, raztopina HCl snkc 0,1 mol/L (mkc 3,6 g/L), destilirana voda.

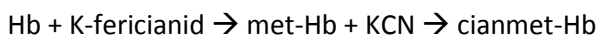
b) Postopek:

1. V epruveto hemoglobinometra odpipetiramo do oznake 10 raztopino HCl.
2. Z mikropipeto dodamo 0,02 ml krvi in jo splaknemo z vsrkavanjem in izpihavanjem tekočine.
3. Epruveto potresemo, da se kri dobro premeša s solno kislino.
4. Po enominutnem premoru pričnemo v epruveto po kapljicah dodajati destilirano vodo (raztopino večkrat premešamo s stekleno palčko), dokler barva raztopine v epruveti ni enaka barvi standarda.
5. Na graduaciji epruvete odčitamo višino stolpca raztopine, to je količino Hb v gramih.

Ta postopek je razmeroma hiter, vendar ne dovolj natančen, zato se uporabljajo druge, sodobnejše in bolj natančne laboratorijske metode.

C) Določanje koncentracije hemoglobina po Drabkinu

Hb pretvorimo z Drabkinovim reagentom v cianmethemoglobin. Reakcija poteka po enačbi:



a) Material:

- Drabkinov reagent (natrijev bikarbonat 1 g, kalijev karbonat 0,1 g, kalijev cianid 0,05 g, kalijev fericianid 0,2 g, destilirana voda do 1 L), mikropipete, avtomatska brizga, kiveta, fotometer.

b) Postopek:

1. V epruveto s 5 ml Drabkinovega reagenta dodamo 0,02 ml krvi in dobro premešamo.
2. Po 5 minutah fotometriramo pri 540–546 nm. Ničlišče naravnamo z reagentom.
3. Koncentracijo Hb izračunamo po formuli:

$$\text{Hb (g/L)} = e \times 368$$

(Hb (g/L) – koncentracija Hb v g/L krvi, e – izmerjena ekstinkcija vzorca)

Č) Določanje koncentracije oksihemoglobina

Pri tej metodi preide Hb iz predhodno hemolizirane krvi ob stiku z zrakom v oksihb, ki ga določamo fotometrično.

a) Material:

- Raztopina amonijaka (4 ml koncentrirane raztopine amonijaka z gostoto $0,88 \text{ g/cm}^3$, razredčene z destilirano vodo do 1 L), mikropipeta, fotometer.

b) Postopek:

1. V epruveto s 5 ml raztopine amonijaka dodamo 0,02 ml krvi, ki hemolizira. Hb pri tem preide v oksihb.
2. Raztopino fotometriramo pri 578 nm (ničlišče nastavimo z raztopino amonijaka).

D) Ostale metode določanja koncentracije hemoglobina

- **Določanje koncentracije hemoglobina po Tallquistu** služi le za grobo oceno vrednosti koncentracije Hb. Kapljico krvi kanemo na filtrirni papir, kjer nastane madež. Barvno nianso madeža primerjamo s standardno barvno skalo.
- **Določanje koncentracije hemoglobina po količini železa v krvi** temelji na določanju količine železa v Hb na osnovi dejstva, da 1 g Hb vsebuje 3,35 mg železa.
- **Določanje koncentracije hemoglobina na osnovi plinometrije:** Metoda temelji na določanju količine na Hb vezanega kisika po principu, da 1 g Hb veže nase 1,34 ml kisika.

1.8.2 Določanje hemoglobinskega tipa pri ovcah

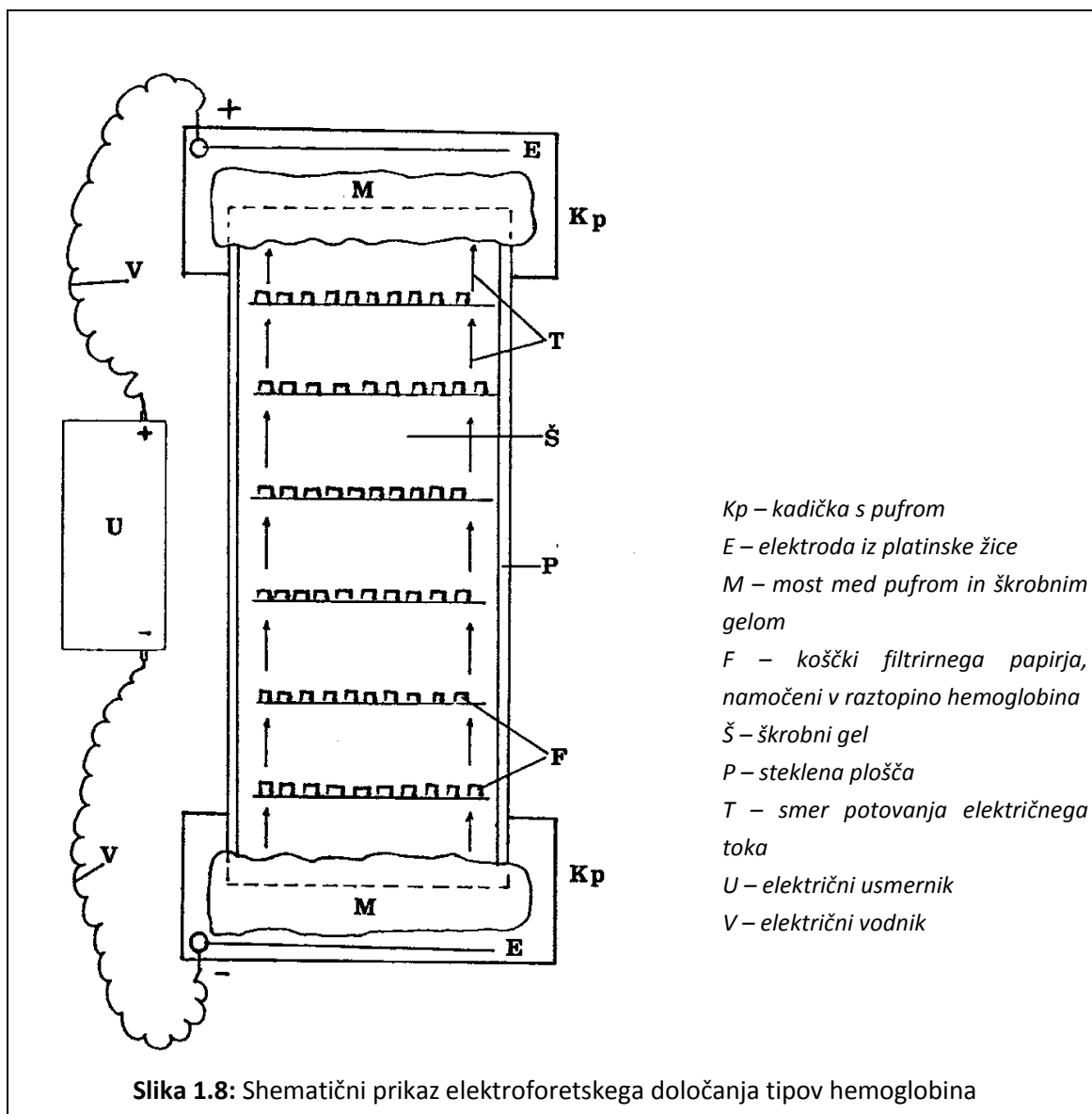
Molekula Hb je sestavljena iz nebeljakovinskega dela hema, ki je enak pri vseh vretenčarjih, in beljakovinskega globina, ki se razlikuje glede na zaporedje in vrsto aminokislin. Zaradi razlike v aminokislinski sestavi imajo hemoglobini različen naboj, zato se v električnem polju pri elektroforezi obnašajo različno. Zato obstajajo razlike med živalskimi vrstami, pasmami in tudi med živalmi iste vrste in pasme. Kadar pri Hb določene živalske vrste ali pasme opazimo razlike pri elektroforetski gibljivosti, govorimo o različnih tipih Hb.

Pri ovcah so ugotovili tipe Hb A, B, C, D in F. Najpogostejša sta tipa A in B, tipa C in D sta zelo redka. Tip F (fetalni tip) pa je ugotovljen samo pri fetusih in ga po rojstvu zamenja adultni Hb. Homozigotne živali imajo tip Hb A ali B, heterozigotne pa AB. Pri slovenskih avtohtonih pasmah ovc (jezersko-solčavski in bovški) je najpogostejši tip Hb A.

Tipe Hb najenostavneje določamo z elektroforezo na škrobnem gelu (slika 1.8).

a) Material:

- Hidrolizirani škrob, EDTA, H_3BO_3 , TRIS, steklena plošča velikosti $24 \times 14 \text{ cm}$, steklene ali plastične letvice (široke 2 in debele 0,3 cm), vakuumsko steklenica, vakuumsko črpalka, vodna kopel, pribor za elektroforezo (slika 1.8) z usmernikom, hemolizirana kri, koščki filtrirnega papirja ($0,7 \times 0,5 \text{ cm}$), penasta krpa.

**b) Postopek:****1. Priprava pufrov:**

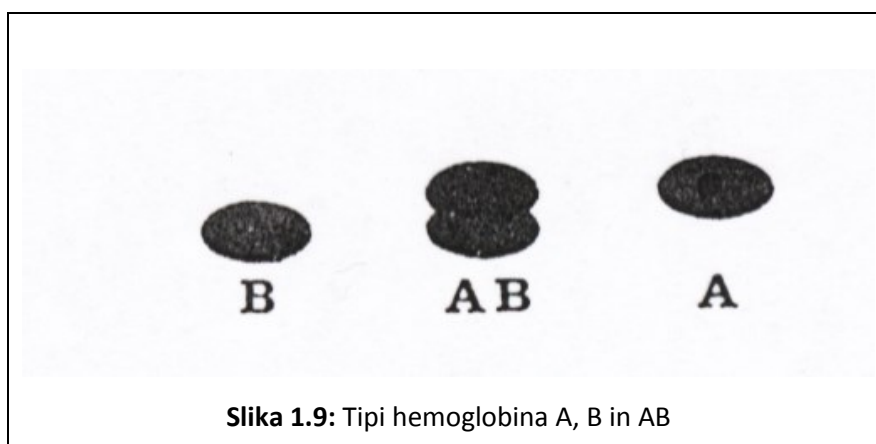
- Pufer za kadičke: 40,4 g TRIS pufrja, 4,0 g EDTA in 3,0 g H_3BO_3 raztopimo v 2000 ml destilirane vode; z 0,1 mol NaOH ali 0,1 mol HCl popravimo pH na 8,9.
- Pufer za pripravo gela: 150 ml pufrja za kadičke dodamo v 350 ml destilirane vode.

- 2. Priprava gel plošče:** V 150 ml pufrja za pripravo gela dodamo 50 g hidroliziranega škroba, suspenzijo vlijemo v vakuumsko steklenico, nato dodamo še 350 ml pufrja, ki smo ga nekaj minut segrevali v vreli vodni kopeli. Suspenzijo škroba segrevamo v vreli vodni kopeli 10 do 15 minut, do pojava mehurčkov, ki jih odstranimo z vakuumsko črpalko. Tako pripravljene gel enakomerno razlijemo po stekleni plošči. Ko se gel nekoliko strdi in postane opalescenten, ga pokrijemo s plastično folijo in obtežimo za 24 ur, da se dokončno strdi. Pred uporabo gel ploščo prečno razrežemo; prvi rez naredimo 5 cm od roba plošče, druge v razmaku 3 cm.

- 3. Izvedba postopka elektroforeze:** Koščke filtrirnega papirja pomočimo v vzorce krvi, jih osušimo na staničevini in vstavimo v zareze gel plošče. V eno vrsto postavimo 10 do 12 papirčkov. Kadički napolnimo s pufrom za kadičke in vzpostavimo mostove med gelom in

pufersko tekočino. Usmernik nastavimo na 200 V, ga vključimo in pustimo, da električni tok teče skozi sistem kakih 10 minut. V tem času Hb preide iz papirčkov na gel. Nato izključimo tok, odstranimo papirčke, pokrijemo gel s tanko plastično folijo in nadaljujemo z elektroforezo pri napetosti 200 V 2 uri.

4. **Branje rezultatov:** Rezultati so kvalitativni in so shematsko prikazani na sliki 1.9. Madež, ki zaostaja, je hemoglobin tipa Hb B, madež, ki potuje naprej, je tipa Hb A, če pa sta nastala dva madeža na mestu med pozicijo A in B, je to tip Hb AB.



Slika 1.9: Tipi hemoglobina A, B in AB

1.8.3 Nastanek kristalov klorhemina (Teichmanovi kristali)

Hemini so spojine porfirina z železom, v katerih je železo trovalentno, ker je tretja valenca vezana s katerimkoli negativnim ionom. Med heminskimi spojinami je najbolj poznan klorhemin, katerega kristalčke imenujemo Teichmanovi kristalčki. Opisani postopek je bil eden prvih, s katerim so v sodni medicini dokazovali prisotnost krvi v vzorcih materiala.

a) Material:

- Kapljica (osušene) krvi, NaCl v kristalčkih, očetna kislina, predmetno in pokrovno stekelce, skalpel, plinski gorilnik in kapalka.

b) Postopek:

S skalpelom ostrgamo osušeno kri in damo ostružke na predmetno steklo. Dodamo nekaj kristalčkov NaCl, vse dobro premešamo in pokrijemo s pokrovnim stekelcem. Od strani s kapalko dodamo očetno kislino, ki zaradi kapilarnosti vstopi pod krovno stekelce in prepoji vsebino. Nato preparat 30 do 60 sekund previdno segrevamo nad plamenom, pri čemer pazimo, da vsebina ne zavre. Če je očetna kislina izhlapela, jo ponovno dodamo, ker tako lažje nastopi kristalizacija. V ohlajenem preparatu pod mikroskopom opazujemo drobne rjavorumene kristalčke klorhemina.

Pri tem postopku najprej nastane hemoliza zaradi dodatka očetne kisline, pri segrevanju očetne kisline ob prisotnosti NaCl nastane HCl, ki hidrolizira hemoglobin in s tako nastalim heminom tvori klorhemin.

1.9 ŠTETJE KRVNIH CELIC

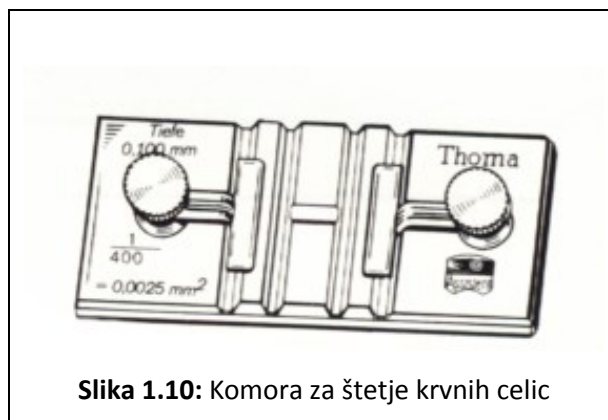
Krvne celice lahko štejemo z mikroskopom, z elektronskimi števci, eritrocite pa tudi fotometrično. Pred začetkom štetja mešamo kri s posebnimi raztopinami, s katerimi fiksiramo le tisto vrsto celic, ki jo želimo šteti, druge vrste celic pa razkrojimo.

1.9.1 Štetje krvnih celic z mikroskopom

A) Splošni principi štetja krvnih celic

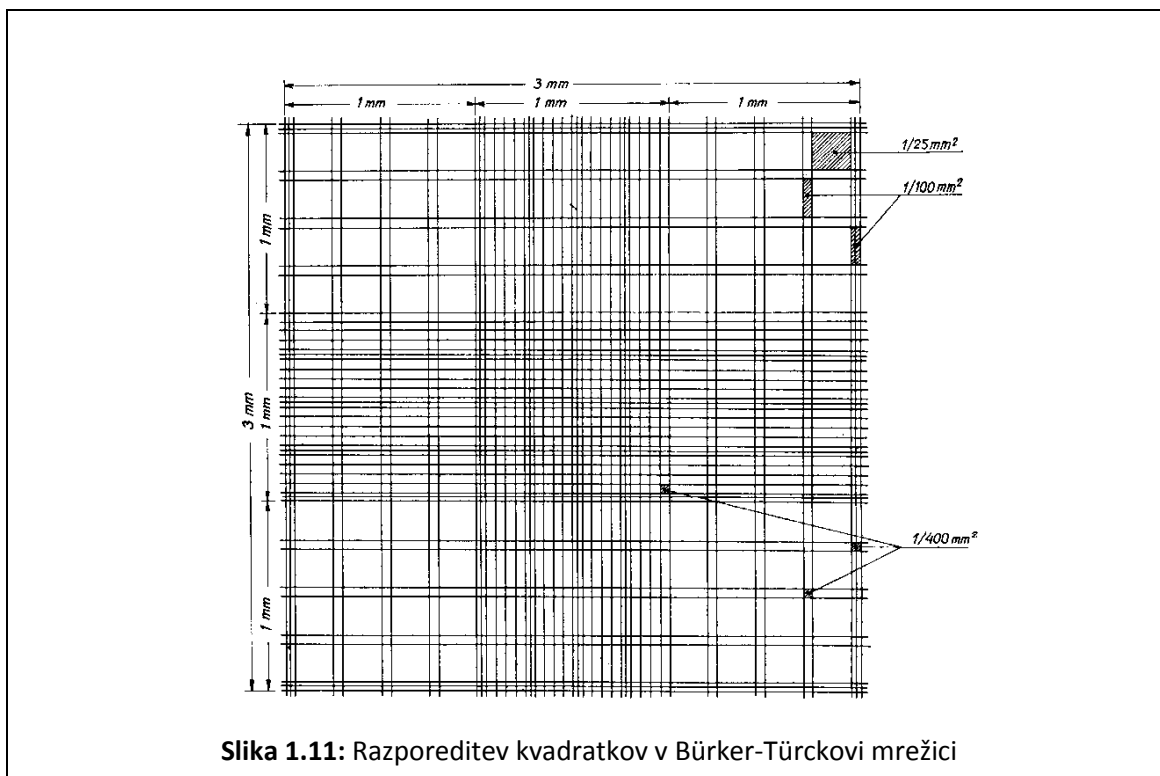
Nekateri pripomočki in splošni principi štetja so identični pri vseh metodah štetja krvnih in drugih celic.

Komora (*hemocitometer*, slika 1.10) je debelejša steklena ploščica, prečno razdeljena s štirimi kanalčki. Na sredini se nahaja poglobljen del (s podolžnim kanalčkom je razdeljen na dva dela), na vsaki polovici je vgravirana mrežica za štetje krvnih celic. Na hemocitometru so oznake za vrsto mrežice, globino in velikost največjih in najmanjših kvadratkov.



Slika 1.10: Komora za štetje krvnih celic

Mrežice se med seboj razlikujejo po številu in velikosti vrisanih likov. Imenujemo jih po avtorjih, npr. Bürkerjeva, Bürker-Türckova, Thomova, Neubauerjeva, Spencerjeva.

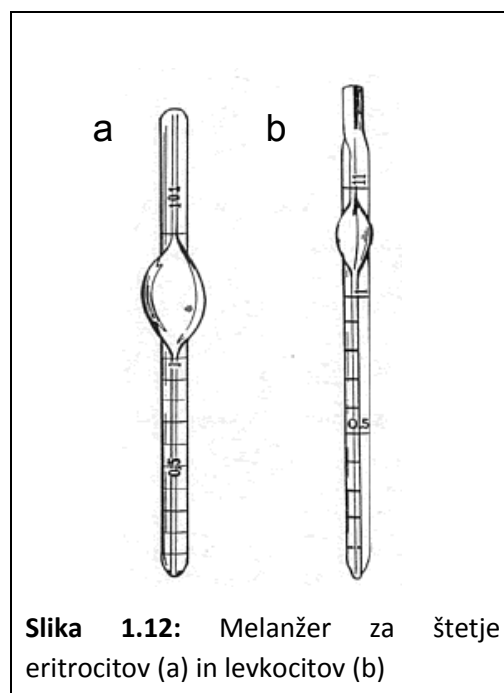


Slika 1.11: Razporeditev kvadratkov v Bürker-Türckovi mrežici

- **Mrežica po Bürker-Türcku** (slika 1.11) je kvadrat s stranico 3 mm, razdeljen na 9 kvadratov s površinami 1 mm². Vsak kvadrat s površino 1 mm² je razdeljen na 16 srednjih kvadratkov, ki jih omejujejo dvojne črte. Površina takega kvadratka znaša 1/25 mm², površina pravokotnika med dvojnima črtama pa 1/100 mm². Srednji kvadratki v osrednjem, večjem (1 mm²) kvadratu so s podolžnimi in navpičnimi črtami razdeljeni na najmanjše kvadratke v mrežici, katerih površina znaša 1/400 mm².

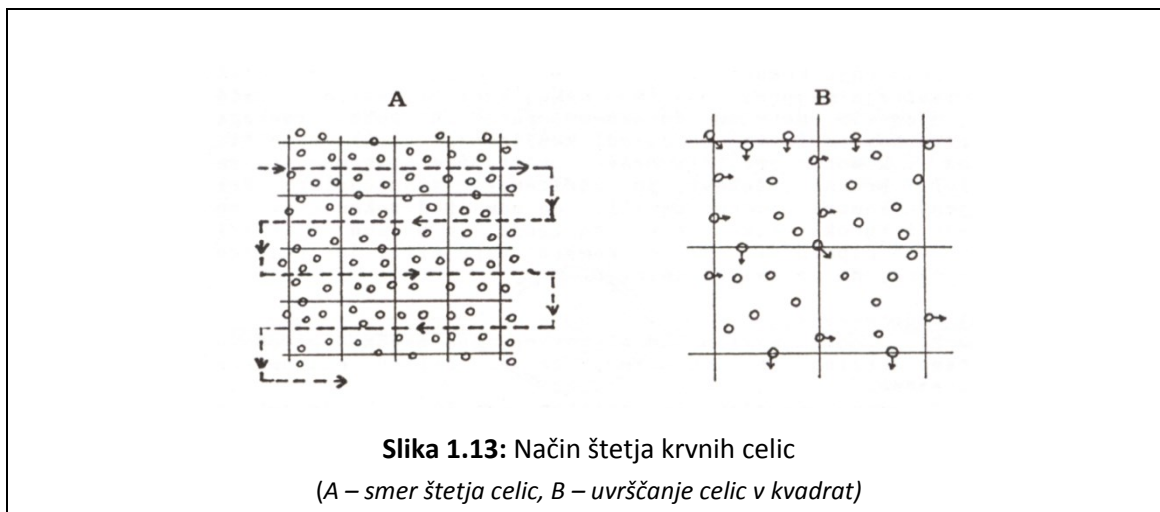
Melanžer je posebna mikropipeta z graduirano kapilarno cevčico, ki je v zgornjem delu trebušasto razširjena. Nad brušeno konusno konico je kapilarni del razdeljen na 10 enot. Označeni sta enoti 0,5 in 1. V trebušasti razširitvi se nahaja steklena kroglica, ki označuje, za katero vrsto melanžerja gre, omogoča mešanje vzorca v trebušasti razširitvi in se v suhem melanžerju ne lepi na steno. Melanžerje polnimo z gumijasto cevčico s plastičnim ustnikom, ki jo natakemo na zgornji del melanžerja.

- **Melanžer za štetje eritrocitov** (slika 1.12 (a)) ima v razširjenem delu, ki je 100-krat večji kot volumen kapilare, rdečo kroglico. Če kri potegnemo do oznake 1, z dodajanjem raztopine za štetje dosežemo razredčitev 1 : 100, če potegnemo kri do oznake 0,5, pa razredčitev 1 : 200.
- **Melanžer za štetje levkocitov** (slika 1.12 (b)) ima v razširjenem delu, ki je 10-krat večji od volumna kapilarne cevke, belo kroglico. Če kri potegnemo do oznake 1, dosežemo razredčitev 1 : 10, če jo potegnemo do oznake 0,5, pa razredčitev 1 : 20.



Slika 1.12: Melanžer za štetje eritrocitov (a) in levkocitov (b)

Princip štetja: Ob štetju krvnih celic moramo paziti na vrstni red štetja posameznih kvadratkov, prav tako pa je pomemben sistem štetja celic v posameznem kvadratu, da ne prihaja do napak pri štetju. Načine štetja prikazuje slika 1.13.



Slika 1.13: Način štetja krvnih celic
(A – smer štetja celic, B – uvrščanje celic v kvadrat)

B) Štetje eritrocitov z mikroskopom

Za štetje eritrocitov potrebujemo Haymovo raztopino, ki razkroji levkocite in trombocite ter fiksira eritrocite. Sestavljena je iz kristaliničnega natrijevega sulfata (2,5 g), NaCl (0,5 g), HgCl₂ (0,25 g), želatine (0,21 g) in destilirane vode (do 100 ml).

a) Priprava vzorca:

1. Kri vsesamo v melanžer do oznake 1 ali 0,5 (kri človeka) oziroma 0,3 (kri živali). Kri najprej vsesamo do izbrane oznake, nato konusni del obrišemo s staničevino, melanžer držimo vodoravno in se s staničevino narahlo dotikamo njegove konice, tako da se stebriček krvi spusti do zaželenne oznake.
2. Previdno in hitro vsesamo Haymovo raztopino do oznake 101. Pri tem pazimo, da v cevčico ne pride zrak ali da kri ne izteče. Z dodajanjem Haymove raztopine dosežemo razredčitev krvi 1 : 100, 1 : 200 oziroma pri živalih 1 : 333,3.
3. Stresanje vsebine v melanžerju traja 3 minute. Stresamo lahko ročno, tako da melanžer držimo med palcem in kazalcem, ali pa s posebnim mešalcem.
4. Priprava komorice za štetje celic: Komorico pokrijemo s pokrovnico, ki jo čvrsto pritrdimo s prijemalkami (peresi), tako da se na obeh straneh pokažejo mavrične barve (Newtonovi pasovi).
5. Polnjenje komorice: Iz melanžerja najprej spustimo nekaj kapljic vsebine, nato se z njegovim konusom dotaknemo reže ob robu krovnega stekelca komore in ta se zaradi kapilarnega vleka napolni. Če smo v komoro spustili preveč raztopine oziroma so se napolnili prečni žlebovi, jo obrišemo s staničevino. Pri polnjenju komore moramo paziti, da nam pod pokrovnico ne zaidejo mehurčki zraka. Če se to zgodi, jo moramo očistiti in ponovno napolniti. Ko smo komoro napolnili, jo pustimo nekaj časa, da se celice umirijo.

b) Štetje celic:

1. Ploščico namestimo pod mikroskop, pod majhno povečavo poiščemo mrežico in preverimo, če so celice enakomerno razporejene.
2. Pod večjo povečavo poiščemo osrednji kvadrataček z najmanjšimi vrisanimi kvadratki. Preštejemo eritrocite v 80 najmanjših kvadratkih (1/400 mm²). Pri tem pazimo, da eritrocitov na črtah med kvadratki ne štejemo dvakrat.

c) Izračun:

Število eritrocitov v litru krvi izračunamo po formuli:

$$Er = (n/80) \times 400 \times 100 (200; 333,3) \times 10 \times 10^6$$

(Er – število eritrocitov v vzorcu; n – število eritrocitov, prešteti v 80 kvadratkih; 400 – ker je površina kvadratka 1/400 mm², po množenju dobimo število v 1 mm²; 100 (200, 333,3) – razredčitev krvi v melanžerju; 10 – ker je globina komorice 0,1 mm, pri množenju s tem številom dobimo število eritrocitov v 1 mm³; 10⁶ – ker se po SI število eritrocitov izraža v litru krvi)

č) Primer:

Kri smo redčili s Haymovo raztopino v razmerju 1 : 200, pri štetju v mrežici po Bürker-Türcku smo v 80 kvadratkih našli 500 eritrocitov.

$$Er = (500/80) \times 400 \times 200 \times 10 = 5 \times 10^6/\text{mm}^3 = 5 \times 10^{12}/\text{L}$$

C) Štetje levkocitov z mikroskopom

Za štetje levkocitov potrebujemo Türckovo raztopino, ki preparira in obarva jedra levkocitov ter razgradi eritrocite, trombocite in citoplazmo levkocitov. Sestavljena je iz ledocetne kisline (3 ml), raztopine gentiana violet (1 ml) in destilirane vode (do 100 ml).

a) Priprava vzorca:

1. Kri vsesamo v melanžer do oznake 1 ali 0,5 po enakem postopku kot za štetje eritrocitov.
2. Vsesamo Türckovo raztopino do oznake 11 in s tem dosežemo razredčitev krvi 1 : 10 ali 1 : 20.
3. Stresanje vsebine melanžerja: ker se levkociti lepijo na stene melanžerja, mora biti stresanje intenzivnejše kot pri eritrocitih.
4. Priprava komore za štetje: postopek je enak kot za štetje eritrocitov.
5. Polnjenje komore: postopek je enak kot za štetje eritrocitov.

b) Štetje celic:

Levkocite štejemo v kvadratih s površino $1/16 \text{ mm}^2$ (Neubauerjeva komora) ali $1/25 \text{ mm}^2$ (Bürcker-Türckova komora). Preštejemo vse celice v 16 ali 25 kvadratih srednje velikosti.

c) Izračun:

Število levkocitov v litru krvi izračunamo po formuli:

$$L = n \times 10 (20) \times 10 \times 10^6$$

(L – število levkocitov; n – število celic, prešteti v 16 (1 mm²); 10 (20) – razredčitev krvi v melanžerju; 10 – globina komorice je 0,1 mm, pri množenju s tem številom dobimo število levkocitov v 1 mm³; 10⁶ – ker se po SI število eritrocitov izraža v litru krvi)

č) Primer:

V 25 kvadratih srednje velikosti Bürker-Türckove mrežice smo prešteli 98 celic. V melanžerju je bila kri razredčena v razmerju 1 : 10.

$$L = 98 \times 10 \times 10 = 9800/\text{mm}^3 \text{ krvi} = 9,8 \times 10^9/\text{L krvi.}$$

Č) Štetje trombocitov

Za štetje trombocitov uporabljamo direktni ali indirektni postopek.

- **Direktni postopek:** Reagent za štetje trombocitov je sestavljen iz kokainovega hidroklorida (13 g), NaCl (0,2 g) in destilirane vode do 100 ml. Kri redčimo v silikoniziranem melanžerju za eritrocite ali silikonizirani epruveti z mikropipeto. Stabilizirane trombocite v suspenziji, s katero napolnimo komoro, opazujemo s faznim mikroskopom. Vidimo jih kot modre točke. Štejemo jih v velikih kvadratih (1 mm^2) v mrežici.
- **Indirektni postopek (po Foniu):** Pripravimo razmaz krvi, ki ga obarvamo po May-Grünwald-Giemsi. Hkrati preštejemo eritrocite v komorici. V obarvanem razmazu preštejemo število trombocitov na 1000 eritrocitov. Iz promilnih vrednosti trombocitov in s pomočjo števila eritrocitov izračunamo število trombocitov v 1 mm^3 krvi po formuli:

$$T = Er \times \frac{t}{1000}$$

(T – število trombocitov v 1 mm^3 , Er – število eritrocitov v 1 mm^3 (prešteto v komorici), t – število trombocitov v razmazu)

Primer:

- V komorici smo prešteli 4×10^6 Er/mm³ krvi, v krvnem razmazu pa smo prešteli 50 trombocitov.

$$T = 4 \times 10^6 \times (50/1000) = 200 \times 10^3/\text{mm}^3 = 200 \times 10^9/\text{L} \text{ krvi}$$

D) Štetje krvnih celic pri perutnini

V krvi ptic imajo jedra razen levkocitov in trombocitov tudi eritrociti, zato metode, ki jih uporabljamo za štetje krvnih celic pri sesalcih, za ptice niso uporabne. Za štetje krvnih celic pri perutnini se uporabljata direktna ali indirektna metoda.

Indirektna metoda: Preiskovano kri perutnine mešamo v melanžerju za eritrocite s Haymovo raztopino v razmerju 1 : 200. Celice preštejemo v komorici in ugotovimo njihovo skupno število. Pripravimo tudi krvni razmaz, obarvan po Pappenheimu, v katerem štejemo krvne celice. Preštejemo skupaj 3000 krvnih celic tako, da si ločeno zapisujemo število posameznih vrst. Število posameznih vrst krvnih celic izračunamo po formulah:

$$Er = S \times \frac{n_{Er}}{3000} ; \quad L = S \times \frac{n_L}{3000} \quad \text{ozioroma} \quad Tr = S \times \frac{n_{Tr}}{3000}$$

(*S – število vseh celic, prešteti v komori v 1 mm³, Er – število eritrocitov v mm³, n_{Er} – število eritrocitov v razmazu, L – število levkocitov v mm³, n_L – število levkocitov v razmazu, Tr – število trombocitov v mm³, n_{Tr} – število trombocitov v razmazu*)

Direktna metoda temelji na principu, da se posamezne vrste krvnih celic v razmazu ptičje krvi različno obarvajo z reagentom po Nattu in Herricku. Po redčenju krvi z reagentom v eritrocitnem melanžerju v razmerju 1 : 100 in 5-minutnem mešanju štejemo krvne celice v komorici. Število celic v mm³ izračunamo po formulah:

$$Er = (Z/80) \times 400 \times 100 \times 10 \times 10^6$$

$$L = (N/9) \times 10 \times 100 \times 10^6$$

$$Tr = (N/9) \times 10 \times 100 \times 10^6$$

(*Z – število eritrocitov, prešteti v 80 kvadratih v mrežici, N – število celic (levkocitov ali trombocitov), prešteti v kvadratih s površino 1 mm², 10⁶ – ker se po SI število krvnih celic izraža v litru krvi*)

1.9.2 Štetje krvnih celic s hematološkimi analizatorji

Hematološki analizatorji omogočajo hitro in natančno štetje in oceno lastnosti krvnih celic na principih električnih, optičnih ali kombiniranih načinov detekcije. Ne glede na način detekcije aparature delujejo tako, da vsesajo določen volumen native ali razredčene krvi v sistem tankih cevk, ki vzorec usmeri skozi senzor.

Električne meritve temeljijo na merjenju električnega upora pri prehodu celic skozi električno polje. Ker krvne celice slabo prevajajo električni tok, pretok suspenzije celic v elektrolitski raztopini poveča električni upor. Število sprememb upora v časovni enoti je sorazmerno s številom celic, velikost spremembe upora pa je sorazmerna z njihovo velikostjo. Pri optičnih meritvah pa vzorec krvi potuje v enakomernem toku skozi področje detekcije z žarkom vidne svetlobe ali laserskim žarkom. Sipano svetlobo, ki nastane, če žarek zadane celico, registrirajo posebni detektorji in jo spremenijo v električni impulz.

S hematološkimi analizatorji je mogoče z visoko natančnostjo prešteti število eritrocitov, trombocitov in levkocitov, pri katerih je mogoče določiti tudi subpopulacije na osnovi njihovih fizikalnih in kemičnih lastnosti. Hematološki analizatorji omogočajo tudi merjenje vrednosti hematokrita in koncentracije hemoglobina in izračunajo oziroma izmerijo eritrocitne konstante.

Tabela 1.9: Število krvnih celic (povprečje in razpon normalnih vrednosti) pri domačih živalih in človeku

Vrsta živali	Eritrociti [$\times 10^{12}/L$]	Levkociti [$\times 10^9/L$]	Trombociti [$\times 10^9/L$]
govedo	7,0 (5,0–9,8)	8 (4–12)	400 (100–600)
ovca	11,5 (9,0–15,0)	8 (4–10)	400 (250–750)
prašič	6,8 (5,5–8,5)	16 (11–22)	505 (252–650)
konj	8,6 (6,5–12,5)	9 (5–13)	240 (110–360)
pes	6,6 (5,0–8,5)	12 (8–18)	200–600
mačka	7,2 (5,0–9,5)	12 (5–19)	450 (300–750)
kunec	5,2 (4,0–6,5)	8 (5–12)	
kokoš	2,4 (1,9–3,2)	26 (10–35)	35,8 (19–41)
raca	2,1 (1,8–2,3)	23 (9–28)	
človek	5,0 (4,2–6,3)	7 (4–10)	200–500

1.10 ERITROCITNI INDEKSI

Z eritrocitnimi indeksi (citarnostnimi konstantami, konstantami eritrocitov) ugotavljamo povprečni volumen, velikost, debelino eritrocitov in njihovo napolnjenost s hemoglobinom. V veterinarski praksi se uporabljajo za diagnostiko anemij, saj nam omogočajo presojanje velikosti eritrocitov in njihove napolnjenosti s hemoglobinom. Za izračun eritrocitnih indeksov moramo poznati število eritrocitov, vrednost hematokrita in koncentracijo hemoglobina v preiskovanem vzorcu krvi.

Eritrocitni indeksi so: povprečni volumen eritrocitov, povprečna absolutna količina hemoglobina, povprečna relativna količina hemoglobina, povprečni premer eritrocitov in povprečna debelina eritrocitov.

- **Povprečni volumen eritrocitov – MCV (*Mean Corpuscular Volume*)** pokaže povprečno prostornino enega eritrocita. Da nam podatke o vrsti anemije glede na velikost celice (npr. makrocitna, mikrocitna, normocitna). Izračunamo ga po formuli:

$$MCV = \frac{Ht \times 1000}{Er} \quad [fL]$$

(*Ht* – vrednost hematokrita (l/l), *Er* – število eritrocitov ($10^{12}/L$), *fL* – femtolitri ($1 fL = 10^{-15} L$))

Primer: $Ht = 0,35$

$$Er = 7 \times 10^{12} / L$$

$$MCV = \frac{0,35 \times 1000}{7} = 50 fL$$

- **Povprečna absolutna količina hemoglobina – MCH (*Mean Corpuscular Haemoglobin*)** pokaže povprečno količino hemoglobina v posameznem eritrocitu. Na osnovi MCH lahko ugotovimo, ali je anemija normo-, hipo- ali hiperhromna. Izračunamo jo po formuli:

$$MCH = \frac{Hb}{Er} \quad [pg]$$

(*Hb* – koncentracija hemoglobina (g/L), *Er* – število eritrocitov ($10^{12}/L$), *pg* – pikogrami ($1 pg = 10^{-12} g$))

Primer: $Hb = 140 g/L$

$$Er = 7 \times 10^{12} / L$$

$$MCH = \frac{140}{7} = 20 pg$$

- **Povprečna relativna količina hemoglobina – MCHC (*Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration*)** izraža količino hemoglobina v določenem volumnu eritrocitov. Je boljši indikator vsebnosti hemoglobina v eritrocitih kot MCH, ker ta ne upošteva velikosti celice. Izračunamo jo po formuli:

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht} \quad [g/L]$$

(*Hb* – koncentracija hemoglobina (g/L), *Ht* – vrednost hematokrita (l/l))

Primer: $Hb = 140 g/L$

$$Ht = 0,35$$

$$MCHC = \frac{140}{0,35} = 400 g/L Er$$

- **Povprečni premer eritrocitov – MCD (*Mean Corpuscular Diameter*)** se meri mikroskopsko – z mikrometrsko skalo, ki se vstavi v okular mikroskopa (50 µm v okularju se mora ujemati s stranico malega kvadrata v komori za štetje eritrocitov). Rezultat izrazimo v µm, izmeriti pa moramo večje število eritrocitov in izračunati srednjo vrednost. Krvni razmaz, v katerem merimo MCD, obarvamo po May-Grünwald-Giemsi.

Tabela 1.10: Povprečne vrednosti eritrocitnih indeksov pri domačih živalih

Vrsta živali	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/L]	MCD [µm]
konj	45,5	15,9	352	5,5
govedo	52,0	14,0	315	5,8
ovca	34,0	10,0	325	3,2–6,0
koza	19,5	6,5	330	2,5–3,9
prašič	60,0	19,0	320	6,0
pes	70,0	22,8	340	7,0

- **Povprečna debelina eritrocitov – MCT (*Mean Corpuscular Thickness*)** se izračuna po formuli:

$$MCT = \frac{MCD}{\left(\frac{MCD}{2}\right)^2 \times \pi}$$

- **PCV (*Packed Cell Volume*)** je izraz za hematokrit in ga predvsem ameriški avtorji prištevajo med eritrocitne indekse.

1.11 KRVNE SKUPINE

Eritrociti domačih živali in človeka imajo na svoji površini številne specifične antigene, ki pripadajo različnim sistemom krvnih skupin. Krvne skupine se med seboj razlikujejo po lastnostih, ki jih pogojujejo na eritrocite vezani antigeni (**aglutinogeni**) in protitelesa v plazmi (**aglutinini**). Aglutinogeni so vezani tudi na nekatere druge celice organizma, npr. na levkocite, trombocite in epitelijske celice. So genetsko pogojeni in se dedujejo po Mendlovih pravilih. V organizmu živali in človeka obstaja večje število sistemov krvnih skupin.

Krvne skupine moramo upoštevati pri dajanju transfuzij. Če prejemnik transfuzije prejme inkompatibilno kri, v kateri so protitelesa (aglutinini) proti aglutinogenom na njegovih eritrocitih, lahko v nekaj minutah pride do t. i. transfuzijske reakcije. Ta je posledica hemolize in aglutinacije eritrocitov, ki povzročijo cirkulacijski šok in koagulopatije, ki so lahko za prejemnika take krvi usodni. Čeprav se na celični membrani eritrocitov nahajajo številni aglutinogeni, najmočnejšo transfuzijsko reakcijo povzročajo tisti iz sistemov ABO in Rh.

Določanje krvnih skupin se uporablja tudi v genetiki, ker so genetsko pogojene in se dedujejo po Mendlovih pravilih, v kriminalistiki za identifikacijo oseb na osnovi krvi, slin, sperme in v sodni medicini in veterini za ugotavljanje očetovstva.

Pri ljudeh je znanih 14 sistemov krvnih skupin, med katerimi so najpomembnejši ABO, Rh in MNS.

- Znotraj **sistema ABO** so štiri krvne skupine – A, B, AB in O s podskupinami. Protitelesa za ta sistem krvnih skupin v krvi ljudi pričnejo nastajati prve mesece po rojstvu brez predhodne senzibilizacije. V serumu ima človek protitelesa proti tistim antigenom sistema ABO, ki jih nima na lastnih eritrocitih. V Evropi ima približno 40 % populacije krvno skupino A, 15 % krvno skupino B, 7 % krvno skupino AB in 38 % krvno skupino O.

Krvna skupina	Aglutinogeni (na eritrocitih)	Aglutinini (v serumu)
A (A ₁ –A ₅)	A	anti B (β)
B	B	anti A (α)
AB (A ₁ B–A ₅ B)	A in B	–
O	–	anti A in anti B

- **Sistem Rh:** Znotraj tega sistema sta krvni skupini Rh+ (Rh pozitivna) in Rh– (Rh negativna). Eritrociti Rh+ ljudi vsebujejo določene antigene ("D"). Če Rh– oseba (teh je v Evropi približno 15 %) pride v stik z Rh+ krvjo, npr. s transfuzijo ali v nosečnosti, pride v njeni krvi do tvorbe protiteles proti Rh+, kar ob ponovnem stiku z Rh+ krvjo povzroči hemolizo te krvi. Če je npr. mati Rh–, otrok pa Rh+, predhodno nastala protitelesa v krvi matere lahko povzročijo hemolizo pri otroku, kar vodi do težkih obolenj ali smrti novorojencev.
- **Sistem MNS** je manj pomemben, upošteva se ga ob natančnem določanju krvnih skupin.

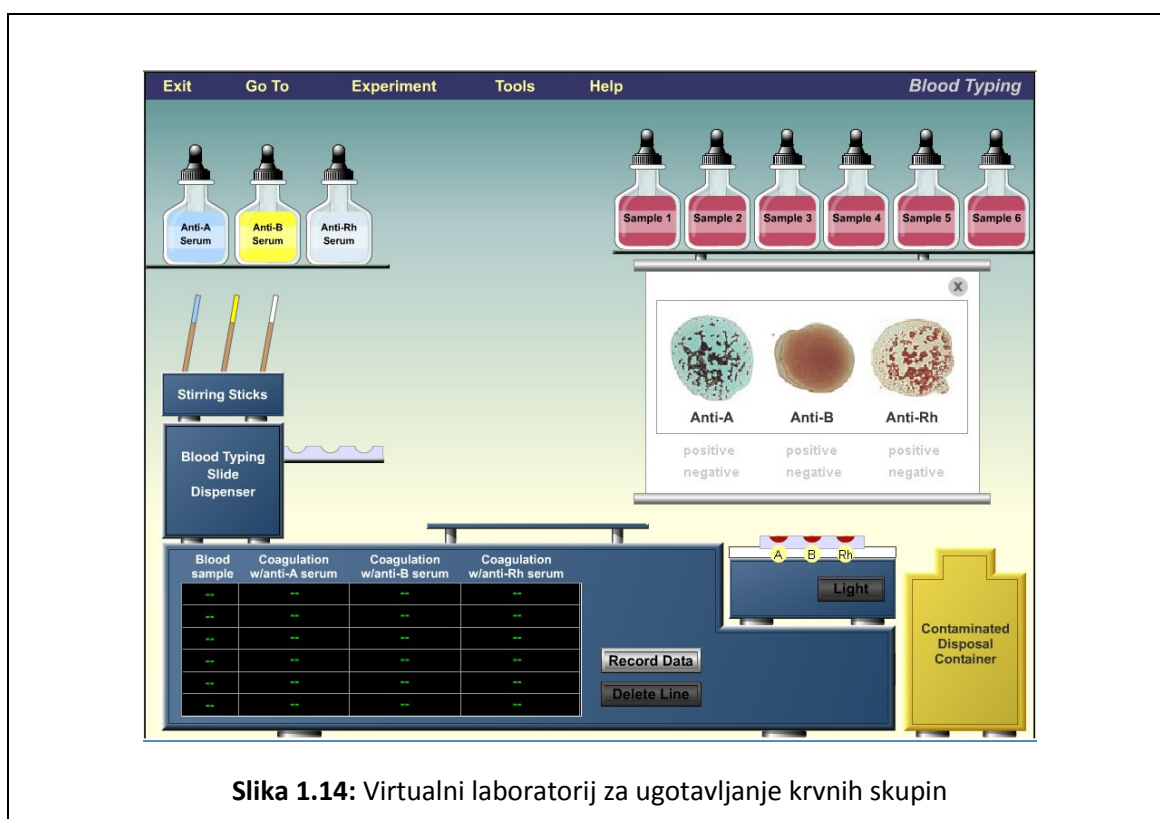
Krvne skupine pri živalih se ne pojavljajo na osnovi predhodno formiranih protiteles (kot je to sistem ABO pri človeku), pač pa so vezane na aglutinogene, ki se nahajajo na eritrocitih (so podobne sistemu Rh pri človeku). Pri domačih živalih se krvne skupine označujejo z velikimi tiskanimi črkami, začenši z A. Med enako poimenovanimi krvnimi skupinami različnih vrst živali ni

nobene povezave. V literaturi obstajajo različni podatki o številu sistemov krvnih skupin pri posameznih vrstah domačih živali. Po Jainu je to število pri konju 8 (po podatkih drugih avtorjev 25), pri govedu 12 (z več kot 80 krvnimi skupinami), pri ovci 8, pri prašiču 15 in pri psu 8.

V veterinarski medicini velja, da prvo transfuzijo krvi lahko damo živalim brez nevarnosti ne glede na krvni tip, če pa transfuzijo želimo ponavljati, obstaja nevarnost transfuzijske reakcije, ker žival s prvo transfuzijo senzibiliziramo (povzročimo tvorbo protiteles).

1.11.1 Prikaz določanja krvnih skupin sistemov ABO in Rh

Krvne skupine sistemov ABO in Rh določamo z antiserumi, ki vsebujejo protitelesa proti antigenom A, B oziroma Rh (D). Reakcija aglutinacije dokazuje prisotnost določenega tipa antigenov.



Slika 1.14: Virtualni laboratorij za ugotavljanje krvnih skupin

Določanje krvnih skupin pri človeku lahko prikažemo z računalniško simulacijo PhysioEx. Poskus odpremo z ukazom **Poskus/Določanje krvnih skupin (Experiment/Blood Typing)** v poglavju **Krvne analize (Blood Analyses)**. V virtualnem laboratoriju (slika 1.14) je zgoraj desno 6 vzorcev krvi, levo pa so stekleničke z antiserumi anti-A, -B in -Rh). Spodaj levo je enota za zapisovanje rezultatov, nad njo pa laboratorijska mizica, na kateri pripravljamo vzorce. Levo od mizice je posoda s predmetnimi stekli za določanje krvnih skupin, nad njo pa palčke za mešanje vzorcev. Modro palčko uporabljamo za mešanje vzorca s serumom anti-A, rumeno za mešanje vzorca s serumom anti-B, belo pa za mešanje vzorca s serumom anti-Rh. Desno od mizice je osvetljena plošča za opazovanje vzorcev. Ob odčitavanju rezultatov se pod poličko s krvnimi vzorci odpre slika preparata. V spodnjem desnem kotu je posoda za odlaganje s krvjo kontaminiranega materiala.

a) Postopek:

1. Predmetno steklo premaknemo na laboratorijsko mizico (vdolbine na njem so označene od leve proti desni z A, B in Rh).
2. Iz prve stekleničke z vzorcem premaknemo zamašek s kapalko nad levo jamico predmetnega stekla (kapljica krvi kane vanjo). Z istim vzorcem napolnimo še ostali dve jamici.
3. Pokrovček stekleničke anti-A premaknemo nad levo jamico (vanjo kane kapljica seruma anti-A). Postopek ponovimo še z ostalima antiserumoma (anti-B v srednjo in anti-Rh v desno vdolbinico).
4. S palčkami ustrezne barve premešamo vzorce. Uporabljene palčke premaknemo v posodo za kontaminirane odpadke.
5. Predmetnico s pripravljenimi vzorci premaknemo nad osvetljeno ploščo in izberemo ukaz **Osvetli (Light)**. Nad predmetnico se odpre slika, na kateri si lahko ogledamo vzorec.
6. Pod vsako kapljico izberemo oznako »**positive**« (če je prisotna aglutinacija (koagulacija)) oziroma »**negative**« (če je vzorec homogen). Rezultate zapišemo.
7. Z izbiro oznake »**X**« zapremo prikaz.
8. Postopek ponovimo še z ostalimi vzorci.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo ((+) aglutinacija, (-) aglutinacije ni)!
2. Odgovorite na spodnja vprašanja:
 - kateri antigeni so na eritrocitih oseb s krvno skupino AB?
 - katera protitelesa so v krvi oseb s krvno skupino AB?
 - ali ima oseba s krvno skupino 0 na eritrocitih antigene?

Številka vzorca	Aglutinacija s serumom anti-A	Aglutinacija s serumom anti-B	Aglutinacija s serumom anti-Rh	Krvna skupina
1				
2				
3				
4				
5				
6				

1.11.2 Določanje krvnih skupin sistema ABO pri človeku

a) Material:

- Serumi za določanje krvnih skupin, predmetnice, lancete, alkohol, vata.

b) Postopek:

1. Na predmetnico kanemo po eno kapljico seruma anti-A in anti-B.
2. Poleg kapljice seruma kanemo kapljici krvi ter ju z vogalom predmetnice ali s stekleno palčko zmešamo.
3. Opazujemo nastanek aglutinacije (izkosmičenja), če kri vsebuje antigene, ki se vežejo na protitelesa v serumu.

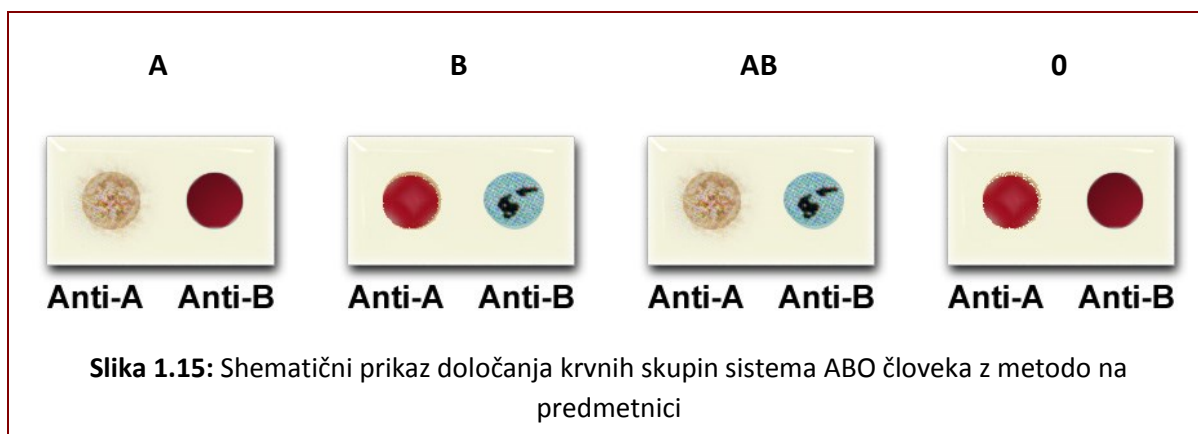
c) Naloge:

- Z metodo na predmetnici določite svojo krvno skupino!

OPOZORILO:

Zaradi nevarnosti okužbe z virusom HIV ali hepatitisa uporabljamo material za enkratno uporabo in gumijaste rokavice, s krvjo onesnažene površine pa razkužimo.

Rezultata ne navajajte kot svojo krvno skupino! Uradno določitev krvne skupine lahko opravi le pooblaščen zavod.



1.12 LASTNOSTI KRVNE PLAZME/SERUMA

1.12.1 Pufrska kapaciteta krvne plazme/seruma

Kri, ki kroži v ožilju, vzdržuje svoj pH v zelo ozkih mejah (7,3 do 7,5) kljub neprestanemu prihajanju bazičnih in kislih snovi v organizem s hrano in nastajanju različnih metabolitov. Vzdrževanje acidobaznega ravnotežja omogočajo puferski sistemi krvi in funkcija nekaterih organov (dihala, ledvice). Glavni puferski sistemi krvi so **bikarbonatni**, **fosfatni**, **proteinski pufer** in **hemoglobin eritrocitov**.

- **Bikarbonatni** pufer (natrijev bikarbonat (NaHCO_3) in ogljikova kislina (H_2CO_3) v razmerju 20 : 1) je najvažnejši; ima 65 % pufrske kapacitete krvi in je bolj učinkovit za kisline kot za baze.
- **Fosfatni** pufer (primarni natrijev fosfat (NaH_2PO_4) – kislil in sekundarni natrijev fosfat (Na_2HPO_4) – bazični) ima v krvi razmeroma majhno pufersko kapaciteto (1 %), važnejša pa je njegova vloga v celici.
- **Proteinski** pufer ($-\text{NH}_3^+$ in $-\text{COO}^-$) je v primerjavi z anorganskimi bolj sposoben vzdrževati stalen pH, nanj pa odpade 6 % pufrske kapacitete krvi).
- **Hemoglobin** eritrocitov pa ima 28 % pufrske kapacitete krvi.

a) Material:

- Krvni serum/plazma, raztopina HCl snkc 0,1 mol/L (mkc 3,6 g/L), metiloranž, destilirana voda, fiziološka raztopina, bireta, dve Erlenmeyerjevi bučki.

b) Postopek:

1. V prvo erlenmajerico odpipetiramo 2 ml krvnega seruma in 1 ml destilirane vode ter dodamo 1 kapljico metiloranža.
2. V drugo erlenmajerico odpipetiramo 2 ml fiziološke raztopine in 1 ml destilirane vode ter dodamo 1 kapljico metiloranža.
3. Vsebinsko obeh erlenmajeric titriramo s HCl do rdečega obarvanja raztopine in izmerimo porabo HCl.

c) Naloge:

1. Izmerite porabo HCl pri titraciji krvnega seruma in fiziološke raztopine!
2. Razložite vzroke za nastalo razliko!

1.12.2 Ločitev beljakovinskih frakcij krvne plazme z obarjanjem

Beljakovine krvne plazme delimo na enostavne in sestavljene.

- K enostavnim sodijo: **fibrinogen**, ki sodeluje pri procesih koagulacije krvi, **albumini**, ki omogočajo vzpostavljanje koloidnoosmotskega tlaka na kapilarni membrani, in **globulini (α in β)**, ki sodelujejo pri prenosu snovi in so substrat za različne biokemične reakcije, **γ globulini** pa imajo obrambno funkcijo – protitelesa).
- K sestavljenim beljakovinom pa sodijo **lipoproteidi** in **glikoproteidi**. Med seboj jih lahko ločimo z različnimi metodami, npr. z elektroforezo, ultracentrifugiranjem, raztapljanjem v organskih topilih ali s sedimentacijo z različnimi solmi.

Frakcije plazemskih beljakovin imajo različne specifične lastnosti. Zaradi svojih fizikalno-kemičnih posebnosti se obnašajo različno v prisotnosti nekaterih kemičnih snovi oziroma njihovih raztopin: fibrinogen aglutinira pri polovični nasičenosti plazme z NaCl, globulini aglutinirajo pri polovični nasičenosti plazme z raztopino amonijevega sulfata, albumini pa pri popolni zasičenosti z amonijevim sulfatom.

a) Material:

- Krvna plazma (oksalatna ali citratna), krvni serum, nasičena raztopina NaCl, nasičena raztopina amonijevega sulfata $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, amonijev sulfat v kristalih, pipete, epruvete, lijaki, filtrirni papir, centrifuga.

b) Postopek:

1. V prvo epruveto odpipetiramo 5 ml krvne plazme in enako količino nasičene raztopine NaCl (s tem dosežemo polovično nasičenost plazme z NaCl); vsebino epruvete dobro premešamo, nastale kosmiče pa izločimo s centrifugiranjem.
2. V drugo epruveto odpipetiramo 5 ml seruma in enako količino nasičene raztopine amonijevega sulfata (s tem dosežemo polovično zasičenost plazme z amonijevim sulfatom); nastalo oborino filtriramo.
3. Filtratu dodajamo amonijev sulfat v substanci toliko časa, dokler se kristali v vodi ne topijo več (nasičenost!); nastalo oborino ponovno filtriramo.

c) Naloge:

- Shematično narišite in izvedite postopek!

2 FIZIOLOGIJA KRVNEGA OBTOKA

Fiziologija krvnega obtoka ali kardiovaskularna fiziologija obravnava procese delovanja srca in krvnega obtoka in zakonitosti gibanja krvi v ožilju – hemodinamiko.

2.1 ŽABJE SRCE KOT MODEL ZA ŠTUDIJ DELOVANJA SRCA

Srčna mišica se od skeletne razlikuje tako po histološki zgradbi kot po mehanizmi delovanja. Skeletna mišica se krči pod vplivom živčnih dražljajev, medtem ko se srčna depolarizira spontano, v rednih presledkih in stalno. Glavni notranji dejavnik, ki vpliva na frekvenco srca, je depolarizacija ritmovnika, ki se prenaša po ostalem prevodnem sistemu srca. Čeprav delovanje srca zaradi avtomatizma ni odvisno od živčnih dražljajev, pa na frekvenco njegovega delovanja lahko vplivajo dražljaji, ki pridejo v srce po vegetativnem živčnem sistemu.

Poskusi s področja kardiovaskularne fiziologije so tehnično težko izvedljivi ali problematični iz etičnih razlogov. V praksi se največkrat izvajajo na srcu hladnokrvnih živali (žab, krastač, želv), ki tako kot drugi organi hladnokrvnih živali deluje še dolgo po izolaciji iz organizma. Pri tem jih ni treba oskrbovati s hranilnimi snovmi in kisikom ter jih držati na konstantni telesni temperaturi, kar je potrebno za organe toplokrvnih živali.

Morfološko se srce hladnokrvnih živali nekoliko razlikuje od srca sesalcev in ptic, osnovni principi njegovega delovanja pa so enaki. Glavni deli žabjega srca so *sinus venosus*, dva preddvora (atrija) in en prekat (ventrikel). Na ventralni strani srca iz prekata izhaja arterijsko deblo (*truncus arteriosus*), ki se takoj razdeli na pljučno arterijo in aorto. Na dorzalni strani srca pa se nahaja venozni sinus, v katerega se vlivajo telesne vene. Iz tega prehaja kri v desni preddvor. V levi preddvor se skozi pljučne vene vlija oksigenirana kri iz pljuč. V prekatu se arterijska in venska kri delno mešata.

2.1.1 Prikaz delovanja srca žabe

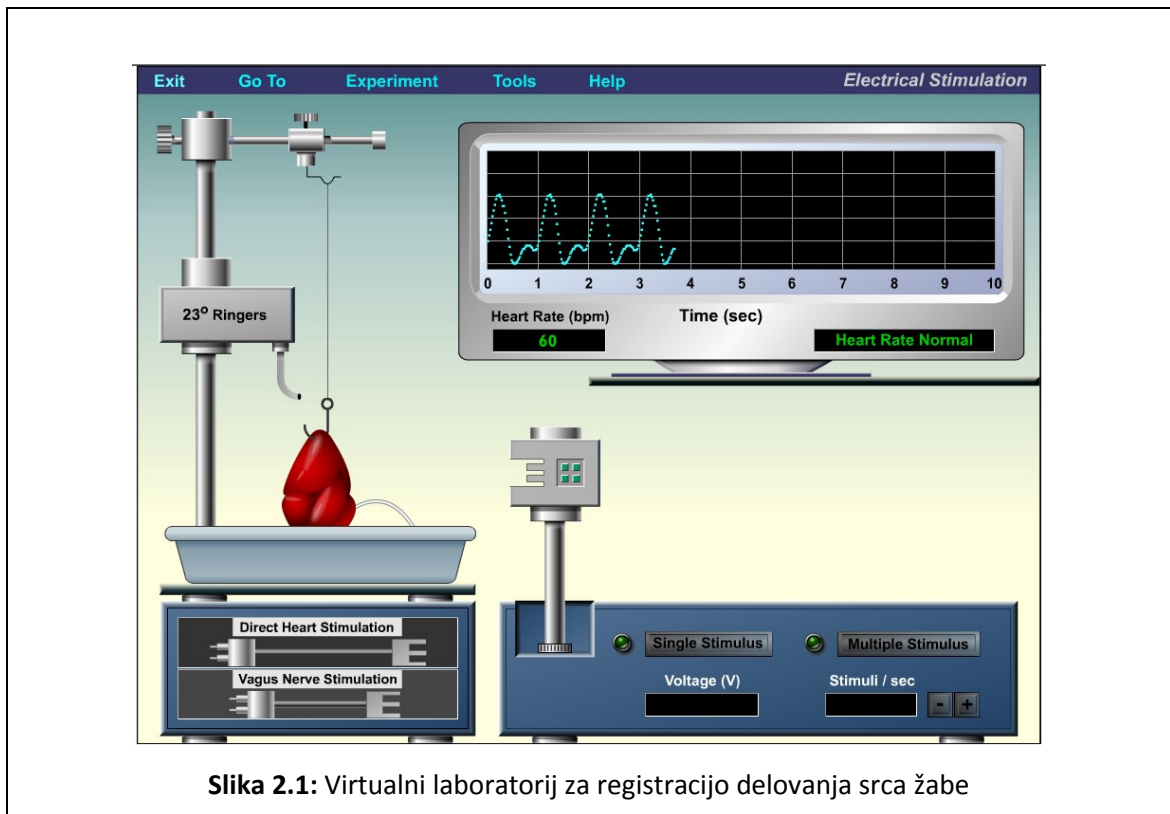
Namesto poskusov na živih živalih se v pedagoške namene uporabljajo računalniške simulacije delovanja srca in vplivov različnih dejavnikov nanj. Simulacije so bile razvite na osnovi meritev, opravljenih na izoliranih srcih žab ali sesalcev, zlasti podgan. Za prikaz delovanja srca bomo uporabili računalniški program PhysioEx.

Iz glavnega menija programa izberemo poglavje **Kardiovaskularna fiziologija žabe (*Frog Cardiovascular Physiology*)**. V virtualnem laboratoriju (slika 2.1) je v zgornjem desnem kotu osciloskop, ki na ekranu zapisuje delovanje srca. Hitrost registracije uravnavamo z ukazom **Orodja/Prilagodi prikaz (*Tools/Modify Display*)**. Frekvenca srca (število utripov v minuti) je prikazana pod ekranom osciloskopa levo, podatki o trenutnem delovanju srca pa so prikazani pod ekranom osciloskopa desno, in sicer:

- normalno delovanje srca (***heart rate normal***) – srce deluje normalno,
- delovanje srca se spreminja (***heart rate changing***) – število utripov se povečuje ali zmanjšuje oz.
- delovanje srca je stabilno (***heart rate stable***) – delovanje srca je enakomerno, vendar je frekvenca večja ali manjša od normalne.

Pod osciloskopom je električni stimulator. Srce lahko dražimo s posameznimi dražljaji (**Single Stimulus**) ali s serijo dražljajev (**Multiple stimulus**). Če srce dražimo s serijo dražljajev, je njihova frekvenca prikazana v okencu pod tipko (**Stimuli/sec**); uravnavamo jo z izbiranjem tipk (+) ali (-) ob prikazu frekvence. Ob izbiri ukaza **Multiple Stimulus** se ta spremeni v ukaz **Stop Stimulus**, ki omogoča prekinitev draženja v kateremkoli trenutku. Električna napetost impulzov je navedena v prikazu **Voltage** in se uravnava samodejno. Iz stimulatorja zgoraj levo izhaja nosilec za elektrode, v katerega prenesemo elektrodo iz omarice v spodnjem levem kotu. Zgornjo elektrodo uporabljamo za neposredno draženje srca (**Direct Heart Stimulation**), spodnjo pa za draženje vagusa (**Vagus Nerve Stimulation**).

Na levi strani je enota za vzdrževanje delovanja srca. Srce je iz telesa žabe dvignjeno s kaveljčkom. Ta je povezan s pretvornikom na vrhu nosilne ročice, ki mehanske spremembe ob krčenju srca pretvarja v električne impulze, ti pa se prenašajo v osciloskop. Med poskusi na srce neprekinjeno kaplja Ringerjeva raztopina, segreta na 23 °C, ki preprečuje izsušitev preparata in omogoča njegovo normalno delovanje.



Slika 2.1: Virtualni laboratorij za registracijo delovanja srca žabe

A) Osnovna registracija delovanja srca žabe

a) Postopek:

1. Nekaj časa opazujemo delovanje preparata.
2. Na prikazu frekvence srca odčitamo število kontrakcij v minuti.

b) Naloge:

- Izmerite in zapišite frekvenco delovanja srca!

B) Prikaz nastanka ekstrasistol

Ekstrasistole ali prezgodnje srčne kontrakcije so sistolična krčenja srca, ki izstopajo iz njegovega običajnega ritma. Nastopijo, kadar nastane dodaten impulz zunaj normalnega ritma v samem sistemu za nastanek in prevajanje impulzov srca ali kadar v srce pride kak dodaten impulz iz okolja. Ekstrasistola lahko nastane v fazi diastole ali pavze, ne pa v fazi sistole (zaradi neobčutljivosti srca v celotni sistoli). Velikost kontrakcije v ekstrasistoli je enaka ali manjša, kot je sistolična kontrakcija, pavza, ki sledi, pa je daljša od normalne (*kompensatorna pavza*).

a) Postopek:

1. Elektrodo za direktno stimulacijo srca premaknemo v nosilec za elektrode.
2. S posameznimi dražljaji stimuliramo srce v različnih obdobjih krčenja (ob začetku in na višku ventrikularne sistole, med diastolo). Ob tem lahko opazimo nastanek ekstrasistol – dodatnih kontrakcij, ki sledijo ventrikularni sistoli. Prav tako opazujemo kompensatorno pavzo, ki sledi ekstrasistoli in omogoča, da srce ponovno ujame normalni ritem.
3. Srce dražimo z zaporednimi dražljaji s frekvenco 20 v sekundi. Z ukazom **Stop Stimulus** ustavimo draženje.

b) Naloge:

1. Ugotovite, med katerim obdobjem ventrikularne kontrakcije je mogoče izzvati ekstrasistolo in razložite vzroke za nastale pojave!
2. Ugotovite, kaj se zgodi ob draženju srca z večjim številom zaporednih dražljajev!

C) Učinek draženja *n. vagusa* na delovanje srca

Čeprav srce lahko deluje tudi, kadar so njegovi živci prerezani (*denervacija*), je v intaktnem organizmu njegovo delovanje pod stalnim vplivom živčnih impulzov. Ta vpliv je najbolj očiten na frekvenco srca in moč njegove kontrakcije. Učinek *n. vagusa* je bil odkrit l. 1845 na žabjem srcu in tedaj so prvič dokazali, da stimulacija živca lahko povzroči tudi upočasnitev delovanja organa, ne le pospešitev.

Parasimpatična živčna vlakna vstopajo v srce kot *rami cardiaci n. vagi*, vpliv pa imajo na sinusni vozle (desni vagus), atrioventrikularni vozle (levi vagus) ter na mišičnino atrijskega mišičnega ventrikla, ne pa ventriklov. Parasimpatikus deluje zaviralno na delo srca. Simpatikus (iz cervikalnih in torakalnih ganglijev) vpliva na oba vozla in mišičnino ventriklov ter spodbuja delovanje srca.

a) Postopek:

1. V nosilec prenesemo elektrodo za stimulacijo *n. vagusa*.
2. S pritiskanjem na tipki (+) in (-) uravnamo stimulator na 50 dražljajev v sekundi.
3. Srce stimuliramo s serijo dražljajev, dokler se ne ustavi in nato ponovno začne delovati (vagusni pobeg).

b) Naloge:

- Razložite, kakšen je učinek stimulacije vagusa na srce!

Č) Vplivi fizikalnih in kemičnih dejavnikov na delovanje srca

Za izvedbo te serije poskusov iz glavnega menija izberemo poglavje **Vplivi na frekvenco srca (Modifiers of Heart Rate)**. Virtualni laboratorij je identičen kot pri prejšnjih poskusih, dodatno pa so v njem različne raztopine, ki vplivajo na delovanje srca. Spreminjamo lahko tudi temperaturo Ringerjeve raztopine za prelivanje srca.

- **Vpliv temperature na delovanje srca**

Po Van't Hoffovem zakonu dvig temperature za 10 °C povzroči dva- do trikratno povečanje hitrosti delovanja organov. Spreminjanje temperature vpliva tudi na delovanje srca. Če sinus venosus prelivamo s hladno Ringerjevo raztopino, se delo srca upočasni, pod vplivom tople Ringerjeve raztopine pa se pospeši. Prelivanje drugih delov srca nima vpliva na frekvenco njegovega delovanja.

a) Postopek:

1. Zapišemo frekvenco srca:
2. Na prikazu temperature Ringerjeve raztopine izberemo 5 °C. Na srce začne kapljati hladna Ringerjeva raztopina. Opazujemo spremembe na zapisu delovanja srca.
3. Ko se na prikazovalniku aktivnosti srca prikaže sporočilo, da je delovanje srca stabilno, ponovno zapišemo njegovo frekvenco:
4. Nato na prikazu temperature Ringerjeve raztopine izberemo 23 °C. Na srce začne kapljati raztopina s sobno temperaturo.
5. Ko se prikaže sporočilo, da je delovanje srca normalno, na prikazu temperature Ringerjeve raztopine izberemo 32 °C, tako da na srce začne kapljati topla raztopina. Opazujte spremembe na zapisu delovanja srca!
6. Ko se na prikazovalniku aktivnosti srca prikaže sporočilo, da je delovanje srca stabilno, ponovno zapišemo njegovo frekvenco delovanja:
7. Ob koncu poskusa srce ponovno prelivamo z Ringerjevo raztopino, segreto na 23 °C. S poskusi lahko nadaljujemo, ko se delovanje srca normalizira, kar razberemo z zapisa na osciloskopu.

b) Naloge:

- Opišite in razložite, kako spreminjanje temperature Ringerjeve raztopine vpliva na delovanje srca!

- **Prikaz učinka pilokarpina na srce**

Prelivanje srca z raztopino pilokarpina učinkuje enako kot stimulacija parasimpatikusa (vagusa).

a) Postopek:

1. Zapišemo frekvenco srca:
2. S kapalko prelijemo srce z nekaj kapljicami raztopine pilokarpina.
3. Opazujemo zapis delovanja srca na ekranu osciloskopa.
4. Ko se na prikazovalniku osciloskopa izpiše obvestilo, da je delovanje srca stabilno, zapišemo frekvenco srca:
5. Nato prelivamo srce z Ringerjevo raztopino (23 °C). Ko se prikaže obvestilo, da je frekvenca srca normalna, je preparat pripravljen za naslednji poskus.

b) Naloge:

- Razložite, kako na srce učinkuje pilokarpin!

- **Prikaz učinka adrenalina**

Adrenalin (epinefrin) je hormon sredice nadledvične žleze. Pospešuje delo srca, povzroča dvig krvnega tlaka in pospešuje pretok krvi skozi skeletne mišice, srce in možgane. Podoben učinek ima draženje simpatikusa.

a) Postopek:

1. Zapišemo frekvenco srca:
2. S kapalko prelijemo srce z nekaj kapljicami raztopine adrenalina.
3. Opazujemo zapis delovanja srca na ekranu osciloskopa.
4. Ko se na prikazovalniku osciloskopa izpiše obvestilo, da je delovanje srca stabilno, ponovno zapišemo frekvenco srca:
5. Prelivamo srce z Ringerjevo raztopino (23 °C). Ko se prikaže obvestilo, da je frekvenca srca normalna, je preparat pripravljen za naslednji poskus.

b) Naloge:

- Opišite in razložite, kaj se zgodi po prelivanju srca z adrenalinom!
- Zakaj je učinek adrenalina enak kot draženje simpatikusa?

- **Prikaz učinka različnih ionov na delovanje srca**

Na delovanje srca vplivajo ioni nekaterih soli: najbolj izrazito K^+ , Ca^{2+} , pa tudi Mg^{2+} in Na^+ . Koncentracija ionov K^+ in Ca^{2+} v izvencelični tekočini ima tolikšen učinek na delovanje srca zaradi vloge pri nastanku in prenosu akcijskega potenciala.

Višek ionov K^+ zmanjša negativnost membranskega potenciala v mirovanju, ob tem pa slabi tudi akcijski potencial, višek ionov Ca^{2+} pa ima obraten učinek. Ioni K^+ zato zmanjšajo moč krčenja srca, zavirajo prevajanje srčnih impulzov preko atrio-ventrikularnega vozla in s tem upočasnijo delovanje srca ter povzročijo njegovo ustavitev v diastoli (če se normalna koncentracija poveča za 2- do 3-krat). Ioni Ca^{2+} povečajo moč krčenja srca, velike količine pa lahko povzročijo bradikardijo, aritmijo in zaustavitev delovanja srca v sistoli. V organizmu ta učinek normalno ni možen: deficit ionov Ca^{2+} vodi v tetanije, višek pa se nalaga v kosteh in drugih tkivih. Na^+ ioni pa zmanjšujejo učinek Ca^{2+} na krčenje po nastanku akcijskega potenciala.

a) Postopek:

1. Zapišemo frekvenco srca:
2. Srce prelijemo z nekaj kapljicami raztopine Ca^{2+} in opazujemo zapis njegovega delovanja na ekranu osciloskopa.
3. Ko se na prikazovalniku osciloskopa izpiše obvestilo, da je delovanje srca stabilno, ponovno zapišemo frekvenco srca:
4. Prelivamo srce z Ringerjevo raztopino (23 °C). Ko se prikaže obvestilo, da je frekvenca srca normalna, je preparat pripravljen za naslednji poskus.
5. Po enakem postopku (točke 1. do 4.) najprej ponovimo poskus z raztopino, ki vsebuje Na^+ in nazadnje še z raztopino, ki vsebuje K^+ . Zapišemo frekvenco srca po prelivanju z Na^+ : in K^+ :,

b) Naloge:

Opišite in razložite, kako ioni Ca^{2+} , K^+ in Na^+ vplivajo na delovanje srca!

2.1.2 Lokalizacija srčnega avtomatizma (*Stanniusove ligature*)

Avtomatizem je sposobnost organa, da lahko deluje brez vplivov živčnega sistema in da impulzi za njegovo delovanje nastajajo v njem samem. V srcu sesalcev je glavni center avtomatizma srca (ritmovnik) **sinusni (Keith-Flackov) voz**el v steni desnega preddvora, med ustjema *v. cavae cranialis* in *caudalis*. Depolarizacija, ki nastane v njem, se v obliki koncentričnih valov širi po mišičju preddvorov. Nato doseže **atrioventrikularni (Aschov-Tawarov) voz**el v septumu med desnim preddvorom in desnim prekatom. Od tega se impulz širi po **Hissovem snopu** do miokarda prekatov. Prenos impulzov med muskulaturo preddvorov in prekatov ni mogoč zaradi atrioventrikularne pregrade. Čeprav v žabjem srcu sistem za nastajanje in prevajanje impulzov morfološko ni popolnoma jasn, deluje na podoben način kot pri sesalcih.

Stanniusove ligature so dokaz, da impulzi za delo srca nastajajo v sami srčni mišici. Stannius je proučeval prevodnost srca tako, da ga je na različnih mestih podvezoval in opazoval njegovo delovanje. Pri originalnem delu je namestil 25 ligatur. Za razumevanje prevodnosti srca so pomembne tri, ki jih namestimo na žabje srce.

a) Material:

- izolirano žabje srce, kimograf, sukanec, štoparica.

b) Postopek:

Izolirano žabje srce obesimo na kimograf in nanj namestimo posamezne ligature.

1. **Prvo Stanniusovo ligaturo** namestimo na prehodu sinusa venosusa v srčna preddvora. Ob pravilni namestitvi se srce ustavi, venozni sinus pa deluje naprej.
2. **Drugo Stanniusovo ligaturo** namestimo enako kot v prvem primeru, poleg tega pa še drugo na prehodu iz preddvorov v prekat (v atrio-ventrikularni žleb). Srce se po namestitvi prve ligature ustavi, po namestitvi druge pa začne ponovno delovati, vendar v drugačnem ritmu kot pred tem.
3. **Tretjo Stanniusovo ligaturo** namestimo na atrio-ventrikularnem žlebu. Srce se najprej ustavi, nato pa začneta sinus venosus in preddvor delovati v svojem, prekat pa v svojem ritmu.

c) Naloge:

1. Shematično prikažite namestitev posameznih Stanniusovih ligatur!
2. Razložite vzroke za spremembe v delovanju srca po namestitvi posameznih ligatur!

2.2 ELEKTROKARDIOGRAFIJA

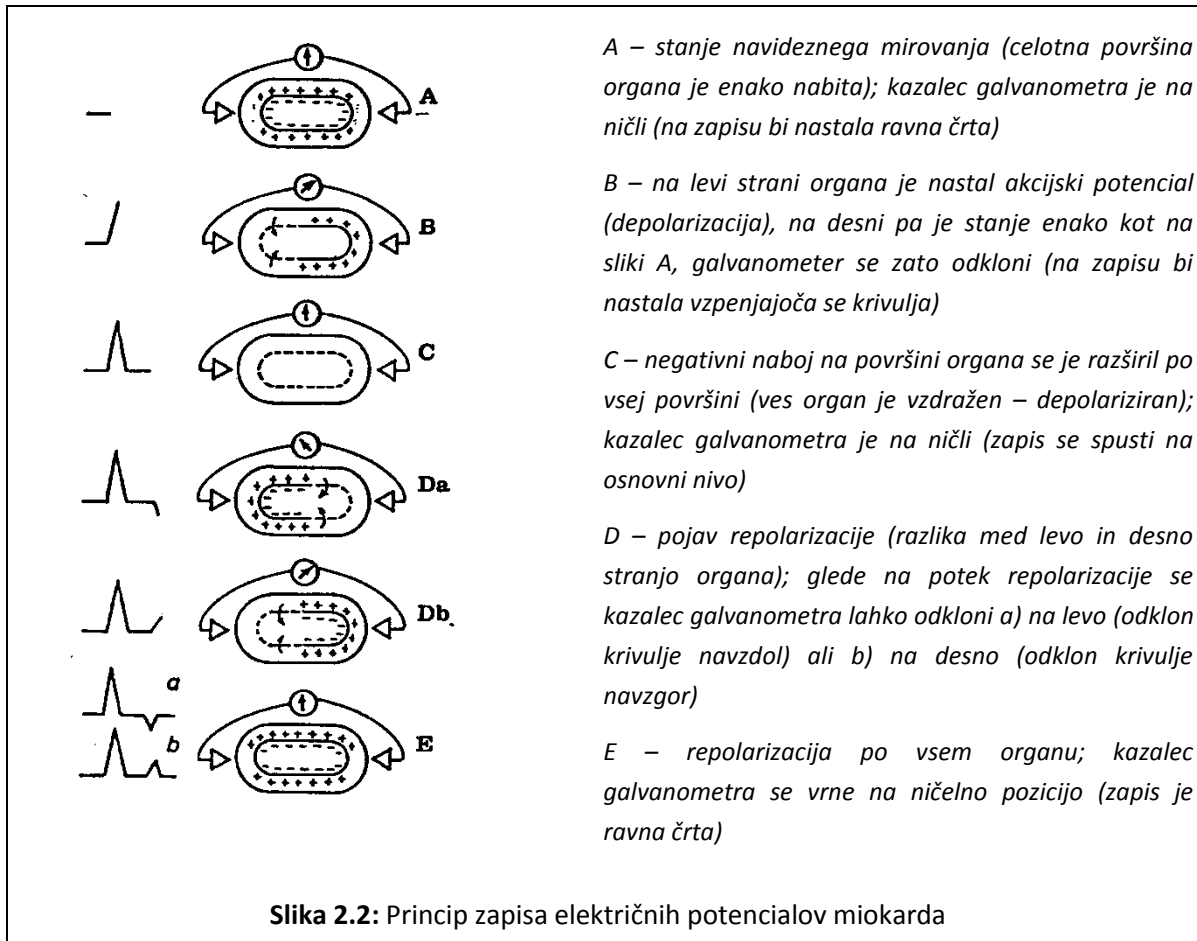
Pri krčenjih miokarda nastajajo električni tokovi, ki se preko pljuč in okolnega tkiva prevajajo na telesno površino. Tu jih ob uporabi posebnega aparata lahko tudi zapišemo. Aparat, ki registrira električne spremembe pri delovanju srca, se imenuje elektrokardiograf, zapis elektrokardiogram, metoda pa elektrokardiografija ali skrajšano EKG. Elektrokardiograf je v osnovi voltmeter z ojačevalcem, ki električno informacijo kot funkcijo časa posname na papir ali prikaže na osciloskopu.

Prvi zapis električnih pojavov pri delovanju srca je opravil nizozemski fiziolog Einthoven že leta 1903. Aparat, ki ga je pri tem uporabil, je bil galvanometer z napeto žico. Delovanje te naprave temelji na fizikalnem principu, da se električni vodnik, ki se nahaja v magnetnem polju in skozi katerega spustimo električni tok, odmakne pravokotno na smer magnetnega polja in električnega toka. Na tej osnovi so kasneje proizvajalci razvili različne tipe EKG aparatov. Sodobni EKG aparati so opremljeni z osciloskopom, napravami za zapisovanje ali shranjevanje zapisa, lahko pa tudi za prenos zapisa po telefonu.

2.2.1 Registracija EKG

A) Princip EKG

Princip elektrokardiografskega zapisa lahko ponazorimo z izoliranim miokardom v raztopini NaCl (slika 2.2).

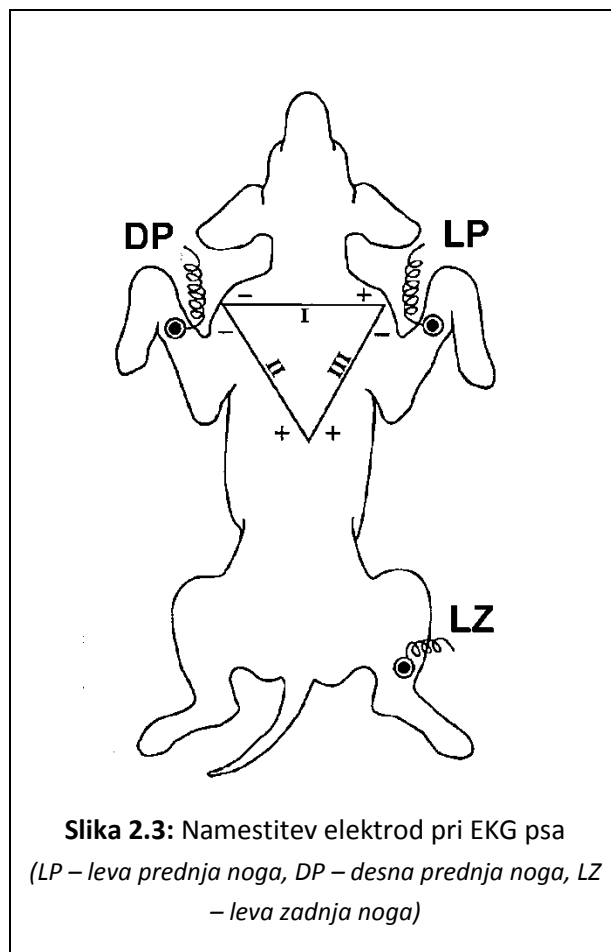


Zapis akcijskih potencialov, ki izvirajo iz srca, je drugačen kakor zapis bioelektričnih potencialov drugih organov (npr. mišic ali živcev). Vzrok posebnosti zapisa je predvsem posledica specifičnega načina širjenja impulza v srcu.

B) Odvodi

Na telesni površini obstaja nepregledna množica točk, na katerih je mogoče meriti akcijske potenciale srca, zato so mesta za njihovo merjenje natančno določena. Mesta, na katera nastavimo merilne elektrode, s katerimi odvajamo potenciale iz telesa na aparat, imenujemo odvode. Poznamo tri vrste odvodov: standardne odvode iz okončin, pojačane unipolarne odvode iz okončin in prekordialne odvode.

- Pri EKG človeka ali drugih sesalcev nastavimo tri **standardne odvode iz okončin**, ki ustvarijo trikotnik okoli srca. Pri prvem namestimo elektrodi na desno in levo sprednjo okončino. Za drugi odvod namestimo elektrodi na sprednjo desno in zadnjo levo okončino, za tretji odvod pa na prednjo in zadnjo levo okončino. Namestitev elektrod na okončine pri psu prikazuje slika 2.3. Te odvode se najpogosteje uporabljaja za zajemanje EKG v veterinarski diagnostiki srčnih obolenj.
- **Ojačani unipolarni odvodi iz okončin** registrirajo spremembo napetosti ene okončine glede na povprečno napetost drugih dveh. Tehnično je to izvedeno tako, da sta dve okončini preko električnih uporov vezani z negativnim, ena pa s pozitivnim polom merilnega aparata.



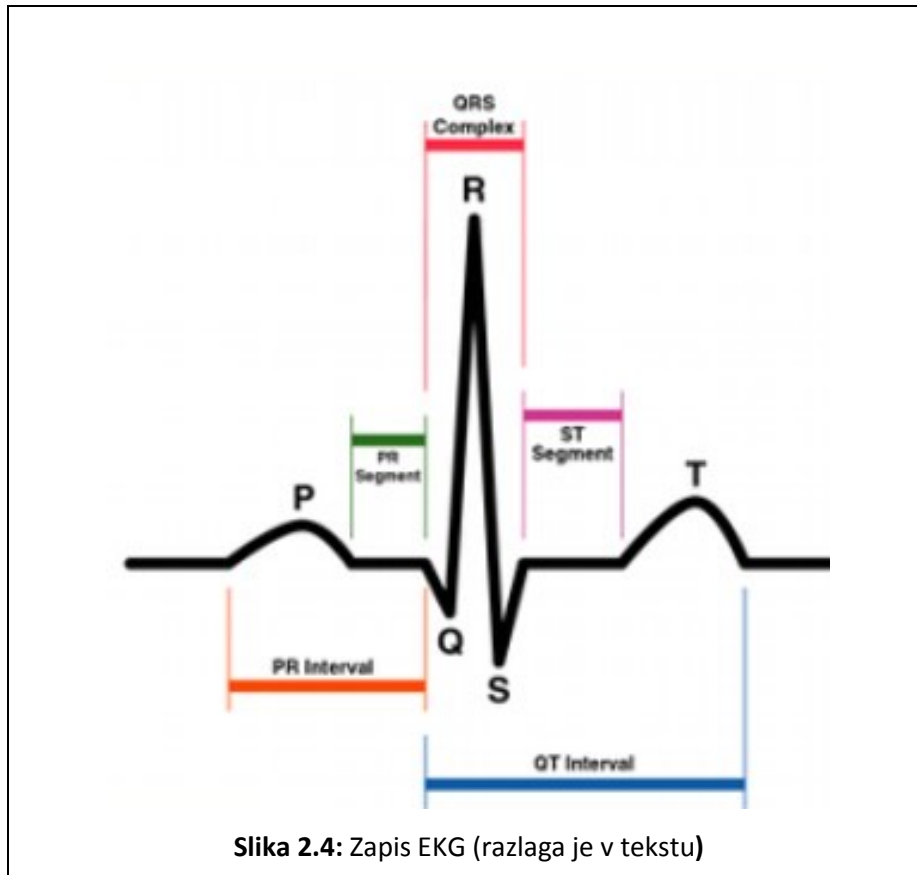
Kadar je pozitivni pol spojen z desno sprednjo okončino, se odvod označi kot aV_R . Drugi odvod je označen kot aV_L in registrira napetost na prednji levi okončini, tretji pa je aV_F odvod, ki registrira napetost na levi zadnji okončini (a = *augmented* /pojačan/, R = *right*, L = *left*, F = *foot*).

- **S prekordialnimi odvodi** (odvodi s prsnega koša) registriramo EKG z elektrodo s 6 ločenimi točkami, ki jih postavimo na točno določena mesta na prsnem košu v področju srca. Elektroda je spojena s pozitivnim polom elektrokardiografa, negativna (indiferentna) elektroda pa je preko uporov zvezana z obema prednjima in levo zadnjo okončino. Ker je površina srca zelo blizu stene prsnega koša, vsak prekordialni odvod registrira električni potencial tistega dela miokarda, ki je neposredno pod elektrodo. Prekordialni odvodi se uporabljajo predvsem v humani medicini za diagnostiko specifičnih motenj v delovanju srca.

C) Zapis EKG

Pri pravilni namestitvi elektrod dobimo značilen zapis oz. krivuljo EKG (glej sliki 2.4 in 2.5).

Na krivulji so razvidni zobci, ki jih po Einthovenu označujemo P, Q, R, S in T. Navzgor obrnjene zobce opredeljujemo kot pozitivne, navzdol obrnjene pa kot negativne. P, R, S in T zobci so v fizioloških pogojih pozitivni, Q in S pa sta negativna. Na krivulji EKG ločimo poleg valov tudi intervale.

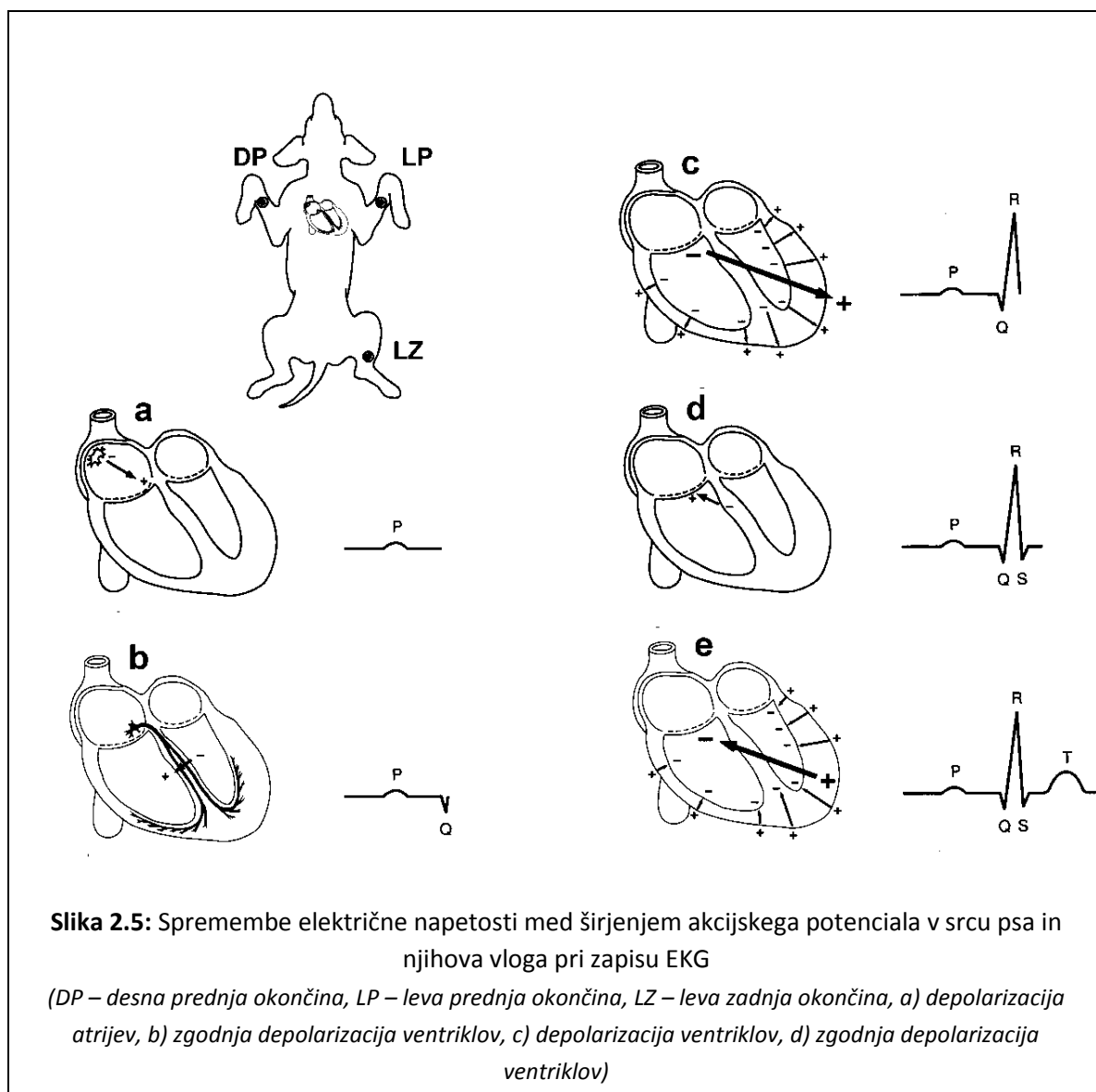


Slika 2.4: Zapis EKG (razlaga je v tekstu)

- **Val P** (slika 2.5 (a)) označuje proces depolarizacije atrijev. Odklon povzroči pozitivni naboj v prednji levi okončini glede na prednjo desno. Ob koncu depolarizacije atrijev se napetost povrne na 0. V tem trenutku se akcijski potencial širi skozi atrioventrikularni vozle in začetni del Hisovega snopa. Ta tkiva so tako majhna, da sprememb napetosti na površini telesa ni mogoče zaznati. Če depolarizacija zajame hkrati oba atrija, je zobec enoten, kadar pa se pojavi časovna razlika med depolarizacijo levega in desnega atrija, se pojavi P zobec z dvema vrhovoma. Proces repolarizacije atrijev (ki bi ga lahko imenovali atrijski T val) v fizioloških pogojih ne vidimo, ker je prekrit s procesom depolarizacije ventriklov. Pri človeku in govedu val P traja okoli 0,1, pri mesojedih 0,04 in pri konju 0,2 sekundi.
- **Interval P–R (atrioventrikularni interval)** je proces od začetka električne aktivnosti atrijev do nastanka depolarizacije ventriklov in ustreza procesu širjenja depolarizacijskega vala preko atrijev, atrioventrikularnega vozla, Hisovega snopa in Purkinjejevih vlaken. Trajanje je odvisno od frekvence srca: večja, kot je frekvenca, krajši je interval. Če je interval daljši, pomeni, da se impulz dalj časa prevaja preko atrioventrikularnega vozla.

Naslednje zaznavne spremembe na površini telesa so povezane z **depolarizacijo ventriklov**.

- Prvi del tega procesa je depolarizacija, ki se širi z leve na desno preko interventrikularnega septuma (slika 2.5 (b)). Ta prva faza ventrikularne depolarizacije običajno povzroči majhno razliko v napetosti med prednjima okončinama, pri čemer je prednja leva rahlo negativna. Negativni odklon, ki nastane, se imenuje **val Q**.
- Naslednja faza ventrikularne depolarizacije povzroči velik pozitiven naboj v prednji levi okončini glede na prednjo desno, ker se med ventrikularno depolarizacijo impulz širi do apeksa srca, nato po Purkinjejevih vlaknih navzgor po notranji strani sten ventriklov in iz notranjosti na površino ventriklov (slika 2.5 (c), male puščice). Skupni učinek teh akcijskih potencialov je velik električni dipol, ki je obrnjen diagonalno navzdol in proti levi (zaradi takega položaja srca v prsnem košu) in zaradi masivne stene levega ventrikla). Pozitivni odklon, ki nastane, se imenuje **val R**.



- Potem, ko se je akcijski potencial razširil skozi stene obeh ventriklov, se razlika med naboji povrne na 0. Na koncu ventrikularne depolarizacije se pojavi kratkotrajen, majhen naboj v LP glede na DP okončino, katerega fizikalne osnove niso znane (slika 2.5 (d)). Odklon, ki nastane, se imenuje **val S**.

- Posledica ventrikularne depolarizacije je **kompleks QRS**, v katerem je zobec R pozitiven, ostala dva pa negativna. Podaljševanje te faze pomeni, da je proces depolarizacije upočasnen ali da je depolarizacija obeh ventriklov asinhrona. Ravna črta na koncu tega kompleksa pomeni, da je proces depolarizacije zajel celotni miokard obeh ventriklov.
- Električni pojavi, ki sledijo, so posledica repolarizacije ventriklov. Val repolarizacije se širi s površine v notranjost, zato nastane dipol z negativno stranjo, obrnjeno navzgor in proti desni (slika 2.5 (e)). Zato med ventrikularno repolarizacijo pride do pozitivnega naboja v prednji levi glede na prednjo desno okončino. Rezultat tega je pozitiven **val T**.
- **Segment S–T** predstavlja depolarizacijo ventriklov do začetka ventrikularne repolarizacije. Traja od konca QRS kompleksa do začetka T vala.
- **Interval Q–T** je celotni zapis od pričetka depolarizacije do konca repolarizacije ventriklov. Imenujemo ga tudi električna sistola.
- **Interval P–P** ustreza času med dvema kontrakcijama atrijev. Uporablja se za izračun števila kontrakcij atrijev na minuto.
- **Interval R–R** ustreza času med dvema kontrakcijama ventriklov. Uporablja se za izračun števila kontrakcij ventriklov na minuto.

Tabela 2.1: Trajanje valov in intervalov EKG zapisa pri nekaterih vrstah domačih živali in pri človeku

Vrsta živali	Val oz. interval [s]			
	P	P–R	Q–R–S	Q–T
pes	0,04	0,06–0,13	0,05–0,06	0,15–0,25
mačka	0,04	0,05–0,09	0,04	0,12–0,18
konj	0,20	0,22–0,56	0,08–0,17	0,32–0,64
govedo	0,10	0,16–0,30	0,08–0,14	0,32–0,64
človek	0,10	0,12–0,21	0,08	

2.2.2 Klinična uporaba EKG

Z merjenjem električne aktivnosti srca lahko ugotovljamo izvor električnega dražljaja, širjenje depolarizacije in potek repolarizacije miokarda. Dobljene rezultate primerjamo z normalno aktivnostjo srčne mišice. Elektrokardiografija je v klinični praksi uporabna predvsem pri diagnostiki aritmij (z EKG lahko ugotovimo izvor in frekvenco impulzov) in pri ugotavljanju stanja miokarda (odkloni EKG so pogosto spremenjeni zaradi patoloških, lahko pa tudi psiholoških dejavnikov). Snemanje EKG je potrebno izvesti ob spremembah v frekvenci delovanja srca ali dihanja, šoku, omedlevicah, nezavesti, krčih, ob pojavu srčnih šumov, spremembah v velikosti srca, ob cianozi, motnjah v elektrolitskem ravnotežju (npr. v zvezi z boleznimi ledvic), ob nekaterih sistemskih in kužnih boleznih (npr. piometra, vnetje pankreasa, borelioza, parvoviroza). Prav tako se praviloma izvaja pred operativnimi posegi, med njimi in po njih (kardiološki monitoring).

2.3 KARDIOVASKULARNA DINAMIKA

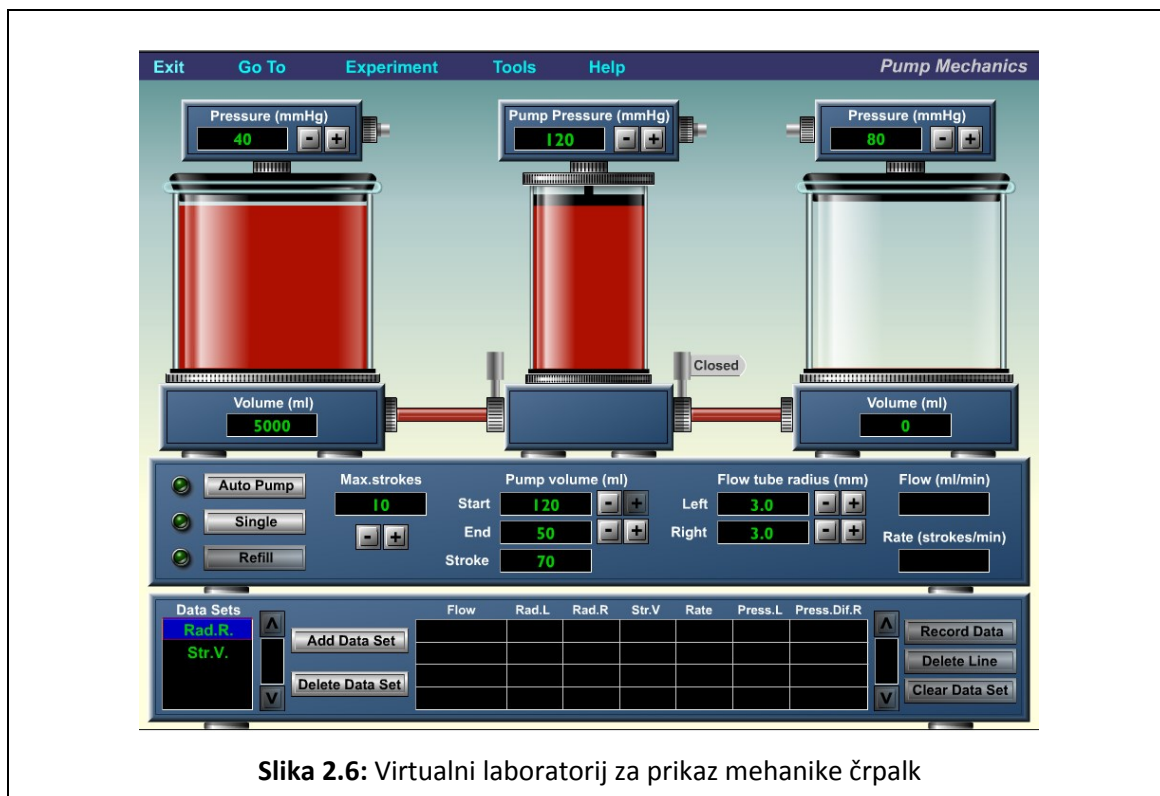
Fiziologijo krvnega obtoka delimo na dve različni, a med seboj povezani skupini procesov: 1. delovanje srca kot črpalke in 2. transport krvi po krvnih žilah.

2.3.1 Mehanika črpalk

Srce je kompleksen organ, sestavljen iz štirih komor, ki delujejo kot dve zaporedno vezani črpalci (leva in desna polovica srca). Desno srce črpa kri v pljuča in nato v levo srce, ki s krvjo oskrbuje telo, nato pa se kri vrača v desno srce.

Vsak utrip srca sestavljata **diastola** in **sistola**. Med diastolo se srce sprosti in napolni s krvjo, med sistolo pa skrči in iztisne kri v arterijski in pljučni krvni obtok. Dolžina diastole je eden od dejavnikov, ki določajo količino krvi v srcu ob koncu obdobja polnjenja. Volumen prekatov na koncu diastole, tik pred srčno sistolo, se imenuje **končni diastolični volumen**. Kljub iztiskanju krvi ob sistoli prekata se ta nikoli ne izprazni do konca, pač pa manjša količina krvi (**končni sistolični volumen**) ostane v njem. Razlika med končnim diastoličnim in končnim sistoličnim volumnom je **udarni (sistolični) volumen**. To je količina krvi, ki se iztisne v krvni obtok ob sistoli prekata. Če udarni volumen pomnožimo s frekvenco srca (število utripov v minuti), dobimo **minutni volumen srca**. To je količina krvi, ki jo srce prečrpa v eni minuti.

Z računalniško simulacijo lahko prikažemo delovanje enostavne črpalke z eno komoro, fizikalne koncepte simulacije pa lahko uporabimo pri razlagi delovanja srca sesalcev pri črpanju krvi.



Slika 2.6: Virtualni laboratorij za prikaz mehanike črpalk

Simulacijo poženemo z izbiro poglavja **Mehanika črpalk (Pump Mechanics)** iz glavnega menija programa. V virtualnem laboratoriju (slika 2.6) sta dve kontrolni enoti: zgoraj enota za kontrolo opreme, ki se uporablja za nastavitve eksperimentalnih pogojev, spodaj pa enota za zbiranje rezultatov, kjer se zapisujejo rezultati meritev. Nad kontrolno enoto so nameščeni trije stekleni

valji. Tekočina se pretaka iz levega v desni valj skozi srednjega, ki deluje kot enostavna črpalka. Levi valj in cev, ki vodi iz njega, ponazarjata venski krvni obtok, črpalka eno polovico srca (ali le en prekat), desna cev in valj pa arterijski krvni obtok. Enosmerni pretok tekočine zagotavljata ventila na ceveh ob vstopu in izstopu iz črpalke. Če bi črpalka predstavljala levi prekat, potem bi bil levi ventil bikuspidalna, desni pa aortna (semilunarna) zaklopka. Črpalka se prazni ob pritisku bata navzdol (zaradi povečanja tlaka), njeno polnjenje in dviganje bata pa povzroča tlak v levem valju. Tlak v desnem valju deluje nasprotno tlaku črpalke. Razlika med tlakom v črpalke in desnem valju je prikazana na enoti za prikaz zbiranja rezultatov (**Pres.Dif.R.**).

Z ukazom **Samodejno črpanje (Auto Pump)** na zgornji kontrolni enoti poženemo črpalko, ki izvede izbrano število črpanj (**Max. Strokes**). Ukaz **Single** povzroči eno črpanje. Če je število črpanj 5 ali več, se po koncu poskusa v desnem delu zgornje kontrolne enote predvajata frekvenca črpanja (**Rate (strokes/min)**) in pretok (**Flow (ml/min)**). Polmer leve in desne cevi (**Flow tube radius (mm)**) določimo z izbiro oznak (+) oziroma (-). Začetni (**Start**) in končni (**End**) volumen črpalke (**Pump volume (ml)**) določimo z izbiro oznak (+) ali (-) na kontrolni enoti. Udarni volumen črpalke (količina tekočine, iztisnjena ob enem črpanju) se avtomatsko izračuna z odštevanjem končnega volumna od začetnega in se izpiše v oknu (**Stroke**).

Enota za zbiranje podatkov zapisuje in prikazuje rezultate, ki jih zbiramo med poskusom. Z ukazom **Record Data** rezultate shranimo, z ukazom **Delete Line** izbrišemo vrstico, z ukazom **Clear Data Set** pa odstranimo iz spomina vse podatke.

A) Učinek polmera cevi na delovanje črpalke

Čeprav bomo spreminjali samo polmer desne (odvodne) cevi, skušajte predvideti, kaj bi se zgodilo, če bi spreminjali polmer leve (dovodne) cevi.

a) Postopek:

1. Iz menija poskusa izberemo ukaz **Pump Mechanics**. V seznamu nastavitvev na levi strani spodnje kontrolne enote izberemo nastavitvev **Rad.R.** (obarva se modro). Kontrolna enota bo registrirala spremembe pretoka krvi glede na spremembe premera cevi.
2. Z izbiro oznak (+) oz. (-) določimo polmer leve (3 mm) in desne cevi (2 mm). Med celotnim poskusom naj bo tlak v levem valju 40 mm Hg, tlak črpalke 120 mm Hg in tlak v desnem valju 80 mm Hg. Začetni volumen črpalke naj bo 120 ml (končni diastolični volumen), končni 50 ml (končni sistolični volumen), število črpanj pa 10.
3. Z ukazom **Auto Pump** poženemo črpalko. Tekočina se skozi črpalko prečrpa iz levega v desni valj. Po 10 črpanjih se v oknih **Flow** in **Rate** izpišeta vrednost pretoka krvi (ml/min) in frekvence črpalke (črpanja/min). Rezultate zapišemo. Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj.
4. Polmer **desne** cevi postopoma povečujemo za 1 mm in vsakič ponovimo postopek, opisan v 3. točki, dokler ne dosežemo največjega polmera (6 mm). Rezultate zapišemo v spodnjo tabelo.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev uporabite za pripravo grafikona, ki prikazuje učinek polmera cevi na pretok krvi (abscisa: polmer cevi [mm], ordinata: pretok krvi [ml/min])!
2. Na osnovi dobljenih rezultatov odgovorite na spodnja vprašanja:

- Kaj bi se zgodilo s pretokom krvi, če bi spreminjali (povečevali ali zmanjševali polmer leve cevi?
- Kaj bi se zgodilo s pretokom krvi in frekvenco srca, če bi se spremenil (povečal ali zmanjšal) levi polmer?

Meritev	1.	2.	3.	4.	5.
polmer desne cevi [mm]	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6 mm
pretok krvi [ml/min]					
frekvenca [n/min]					

B) Učinek udarnega volumna na delovanje črpalke

Pri živalih v mirovanju srce iztisne iz prekata približno 60 % krvi (udarni volumen), 40 % pa je ostane v njem. Čeprav preprosta črpalka ne deluje popolnoma enako kot srce, pa rezultate meritev vseeno lahko uporabimo za razlago delovanja srca. S poskusom bomo ugotavljali, kako spreminjanje začetnih in končnih volumnov črpalke vpliva na njeno delovanje.

Meritev	Udarni volumen [ml]	Frekvenca [n/min]	Pretok krvi [ml/min]
1	10		
2	20		
3	30		
4	40		
5	50		
6	60		
7	70		
8	80		
9	90		
10	100		
11	110		
12	120		

a) Postopek:

1. Iz menija poskusa izberemo ukaz **Mehanika črpalk (Pump Mechanics)**. V seznamu nastavitvev na levi strani kontrolne enote izberemo nastavitvev udarni volumen (**Str.V.**) – obarva se modro. Kontrolna enota bo zapisovala spremembe pretoka krvi glede na spremembe udarnega volumna.
2. Z izbiro oznak **(+)** oz. **(-)** nastavimo začetni volumen (**Start**) na 120 ml in končnega (**End**) na 110 ml, zato je udarni volumen 10 ml. Med celotnim poskusom naj bo tlak v levem valju 40 mm Hg, tlak črpalke 120 mm Hg in tlak v desnem valju 80 mm Hg. Polmer obeh cevi naj bo

3 mm, število črpanj pa 10.

3. Z ukazom **Auto Pump** poženemo črpalko. Tekočina se skozi črpalko prečrpa iz levega v desni valj. Po 10 črpanjih se v prikazih **Flow** in **Rate** prikaže vrednost pretoka krvi (ml/min) in frekvence črpalke (črpanja/min). Rezultate zapišemo. Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj.
4. Z zmanjševanjem končnega volumna postopoma povečujemo udarni volumen za 10 enot, dokler ni dosežen največji možni udarni volumen (120 ml).
5. Rezultate zapišemo v spodnjo tabelo.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev uporabite za pripravo grafikona, ki prikazuje učinek udarnega volumna na frekvenco srca (abscisa: udarni volumen [ml], ordinata: frekvenca srca [n/min])!
2. Na osnovi dobljenih rezultatov odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kaj se zgodi s frekvenco črpalke, če se njen udarni volumen poveča?
 - Kaj bi se zgodilo s tlakom med polnjenjem črpalke, če desni ventil ne bi tesnil? Če to apliciramo na srce, kaj bi se zgodilo, če ne bi tesnila aortna zaklopka?
 - Kaj bi se zgodilo, če bi se aortna zaklopka slabo odpirala?

2.3.2 Pretok krvi po žilah

Dejavniki, ki vplivajo na kroženje krvi po krvnem obtoku, so krvni tlak, periferni odpor in viskoznost krvi. Razmerje med njimi opisuje Poiseuilleva enačba:

$$\Delta Q = \frac{\Delta P r^4}{8 \eta l}$$

(ΔQ – pretok krvi, ΔP – razlika v krvnem tlaku med dvema koncema žile, r – polmer žile, η – viskoznost krvi, l – dolžina žile)

Iz enačbe lahko vidimo, da je pretok krvi premo sorazmeren polmeru krvne žile na 4. potenco, kar pomeni, da že majhne spremembe polmera vodijo v velike spremembe pretoka krvi. V organizmu je spreminjanje polmera krvnih žil učinkovit in občutljiv način uravnavanja pretoka krvi.

Najpomembnejši dejavnik uravnavanja pretoka krvi pa je periferni odpor, ker lahko uravnava cirkulacijo v posameznih organih neodvisno od sprememb systemskega krvnega tlaka. Viskoznost in dolžina krvnih žil se pri zdravih osebkih le malo spreminjata, zato je njun vpliv na pretok krvi majhen.

Virtualni laboratorij za proučevanje odpora krvnih žil, ki ga prikazuje slika 2.7, odpremo z izbiro poglavja **Kardiovaskularna dinamika (Cardiovascular Dynamics)** v glavnem meniju programa. V virtualnem laboratoriju sta dva steklena valja, nameščena nad kontrolno enoto aparature. Z ukazom **Start** (pod levim valjem) začne kri teči iz levega valja (ki predstavlja srce) v desnega (ki predstavlja katerikoli organ) skozi cev, ki ju spaja in predstavlja aorto. Z ukazom **Refill** (pod ukazom **Start**) ponovno napolnimo levi valj in izpraznimo desnega. Eksperimentalne pogoje uravnavamo z izbiro oznak **(+)** ali **(-)** ob vsakem od ukazov, ki so na zgornjem delu kontrolne enote (**Polmer (Radius)**, **Viskoznost (Viscosity)** in **Dolžina (Length)**). Pod kontrolno enoto je enota za zapisovanje rezultatov. Te shranimo z ukazom **Shrani rezultate (Record Data)**, zbrisemo pa z ukazom **Odstrani vrstico (Delete Line)** ali **Odstrani rezultate (Clear Data Set)**.



Slika 2.7: Virtualni laboratorij za proučevanje pretoka krvi po žilah

A) Učinki polmera cevi na pretok tekočine

Z osnovnim poskusom bomo prikazali, kako na pretok krvi vpliva polmer krvnih žil.

a) Postopek:

1. Iz menija poskusa izberemo ukaz **Odpor žil (Vessel Resistance)**. V seznamu nastavitvev na levi strani kontrolne enote izberemo nastavitvev **Polmer (Radius)**; oznaka se obarva modro. Kontrolna enota bo zapisovala spremembe pretoka krvi glede na spremembe polmera cevi.
2. Z izbiro oznak **(+)** oz. **(-)** izberemo polmer cevi 1 mm in viskoznost 1. Med celotnim poskusom naj bo krvni tlak 100 mm Hg, dolžina cevi pa 50 mm.
3. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Ko se vsa kri pretoči iz levega v desni valj, na prikazu za pretok krvi (**Flow (ml/min)**) odčitamo vrednost pretoka in ga zapišemo. Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj.
4. Polmer cevke postopoma povečujemo za 1 mm in vsakič ponovimo postopek, opisan v 3. točki, dokler ne dosežemo največjega polmera (6 mm). Rezultate zapišemo v spodnjo tabelo.

Meritev	1.	2.	3.	4.	5.	6.
polmer cevke [mm]	1	2	3	4	5	6
pretok krvi [ml/min]						

b) Naloge:

1. Rezultate meritev uporabite za pripravo grafikona, ki prikazuje vpliv polmera krvne žile na pretok krvi (abscisa – polmer krvne žile [mm], ordinata – pretok krvi [ml/min])!
2. Na osnovi dobljenih rezultatov odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kaj se je dogajalo s pretokom krvi, ko smo povečevali premer cevi?
 - V poskusu smo simulirali mehansko spreminjanje premera cevi. Kako ta pojav poteka v organizmu?

B) Učinek viskoznosti na pretok tekočin

Kri je 3- do 4-krat bolj viskozna kot voda, katere relativna viskoznost je 1 (gl. vajo 6.3). Čeprav na viskoznost krvi vplivajo številni dejavniki, npr. dehidracija ali sprememba števila eritrocitov, je zaradi homeostatskih mehanizmov organizma zelo stabilna. Namen poskusa je prikazati, kaj se zgodi v kardiovaskularnem sistemu, kadar se ravnotežje mehanizmov za vzdrževanje viskoznosti krvi poruši.

a) Postopek:

1. Izberemo izhodiščne pogoje poskusa, in sicer krvni tlak 100 mm Hg, polmer cevi 5 mm, viskoznost 1 in dolžino cevi 50 mm.
2. V seznamu nastavitvev na levi strani kontrolne enote izberemo nastavitev **Viscosity**; oznaka se obarva modro. Kontrolna enota bo zapisovala spremembe pretoka krvi glede na spremembe viskoznosti tekočine.
3. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Ko se vsa kri pretoči iz levega v desni valj, na prikazu za pretok krvi (**Flow (ml/min)**) odčitamo vrednost pretoka in ga zapišemo (**Record Data**). Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj.
4. Viskoznost tekočine postopoma povečujemo za 1 enoto in vsakokrat ponovimo postopek, opisan v 3. točki, dokler ne dosežemo največje viskoznosti (10). Rezultate zapišemo v spodnjo tabelo.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev uporabite za pripravo grafikona, ki prikazuje vpliv viskoznosti na pretok krvi (abscisa – relativna viskoznost krvi, ordinata – pretok krvi [ml/min])!
2. Na osnovi rezultatov poskusa odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kako spreminjanje viskoznosti krvi vpliva na njen pretok?
 - Ali je spreminjanje pretoka tekočine premo ali obratno sorazmerno z viskoznostjo?
 - Kaj se zgodi s pretokom krvi, če se poveča/zmanjša število krvnih celic?
 - Kaj se zgodi s pretokom krvi, če v organizmu pride do dehidracije?
 - Razmislite, ali je spreminjanje viskoznosti smiselno za uravnavanje pretoka krvi po organizmu?

Meritev	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
viskoznost krvi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pretok krvi [ml/min]										

C) Učinek dolžine cevi na pretok tekočin

Razen v obdobju rasti organizma se dolžina krvnih žil ne spreminja bistveno. V tem poskusu bomo proučevali fizikalno razmerje med dolžino cevi in pretokom tekočine in prikazali, kako se razlikuje pretok krvi v žilah enakega polmera, a različne dolžine.

a) Postopek:

1. Nastavimo izhodiščne pogoje poskusa, in sicer krvni tlak 100 mm Hg, polmer cevi 5 mm, viskoznost 3,5 in dolžino cevi 10 mm.
2. V seznamu nastavitvev na levi strani kontrolne enote izberemo nastavitev dolžine (**Length**); oznaka se obarva modro. Kontrolna enota bo zapisovala spremembe pretoka krvi glede na spremembe dolžine cevi.
3. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Ko se vsa kri pretoči iz levega v desni valj, na prikazu za pretok krvi (**Flow (ml/min)**) odčitamo vrednost pretoka in ga zapišemo (**Record Data**). Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj.
4. Dolžino cevi postopoma povečujemo za 5 mm in vsakič ponovimo postopek, opisan v 3. točki, dokler ne dosežemo največje dolžine (50 mm). Rezultate zapišemo v spodnjo tabelo.

Meritev	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
dolžina cevi [mm]	10	15	20	25	30	35	40	45	50
pretok krvi [ml/min]									

b) Naloge:

1. Rezultate meritev uporabite za pripravo grafikona, ki prikazuje vpliv dolžine žile na pretok krvi (abscisa – dolžina žile [mm], ordinata – pretok krvi [ml/min])!
2. Na osnovi dobljenih rezultatov odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kako dolžina cevi vpliva na pretok tekočine?
 - Razmislite, zakaj spreminjanje dolžine krvnih žil ni primeren način uravnavanja pretoka krvi v organizmu?

Č) Učinek tlaka na pretok tekočin

Razlike v krvnem tlaku na različnih področjih krvnega obtoka omogočajo tok krvi po žilah. S poskusom bomo prikazali, kako naraščanje krvnega tlaka vpliva na pretok krvi.

a) Postopek:

1. Nastavimo izhodiščne pogoje poskusa, in sicer krvni tlak 25 mm Hg, polmer cevi 5 mm, viskoznost 3,5 in dolžino cevi 50 mm.
2. V seznamu nastavitvev na levi strani kontrolne enote izberemo nastavitev tlaka (**Pressure**); oznaka se obarva modro. Kontrolna enota bo registrirala spremembe pretoka krvi glede na spremembe krvnega tlaka.
3. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Ko se vsa kri pretoči iz levega v desni valj, na prikazu za pretok krvi (**Flow (ml/min)**) odčitamo vrednost pretoka in ga zapišemo (**Record Data**). Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj.
4. Tlak postopoma povečujemo za 25 mm Hg in vsakič ponovimo postopek, opisan v 3. točki,

dokler ne dosežemo največjega tlaka (225 mm Hg). Rezultate zapišemo v spodnjo tabelo.

Meritev	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
tlak [mm Hg]	25	50	75	100	125	150	175	200	225
pretok krvi [ml/min]									

b) Naloge:

1. Rezultate meritev uporabite za pripravo grafikona, ki prikazuje vpliv tlaka na pretok krvi (abscisa – krvni tlak [mm Hg], ordinata – pretok krvi [ml/min])!!
2. Na osnovi dobljenih rezultatov odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kako krvni tlak vpliva na pretok krvi?
 - Kakšen je potek krivulje na grafikonu v primerjavi z ostalimi poskusi?
 - Čeprav spreminjanje krvnega tlaka vpliva na pretok krvi, razmislite, zakaj ni tako učinkovito kot spreminjanje polmera žil!

2.3.3 Merjenje hitrosti gibanja krvi

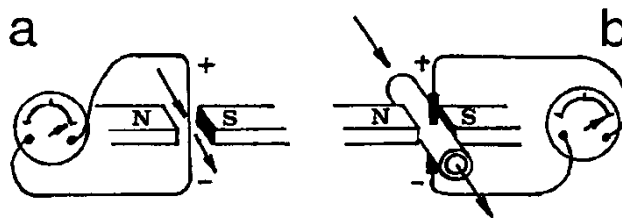
Hitrost gibanja krvi je odvisna od delovanja srca in stanja v krvnih žilah. V aorti je hitrost največja v času sistole, v času diastole pa pada. Poleg pulznih oscilacij na hitrost vpliva tudi oddaljenost od srca, zato je v aorti in velikih venah največja, v kapilarah pa najmanjša.

Pri merjenju hitrosti pretoka krvi ločimo volumensko in linearno hitrost. **Volumenska hitrost** je količina krvi, ki preteče v časovni enoti skozi krvno žilo določenega premera, **linearna hitrost** pa je hitrost, s katero kri oziroma delec krvi preide pot med dvema mestoma v žili.

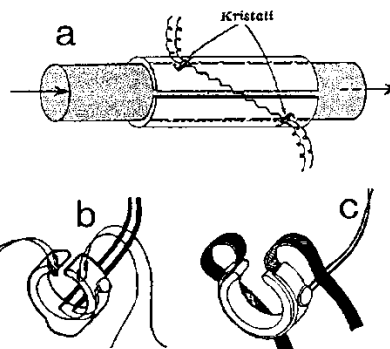
Za merjenje hitrosti pretoka krvi se uporabljajo različne aparature oziroma metode. Ena od skupin aparatov deluje **na principu merjenja spremembe temperature**. Aparati so izdelani tako, da preparirano žilo segrevamo na enem koncu in s termoelementom merimo temperaturo krvi na drugem. Temperaturna razlika je sorazmerna količini tekočine, ki preide skozi žilo. Poleg tega se uporablja tudi t. i. termična sonda. To je z električnim tokom segreti igla, ki jo vstavimo v krvno žilo. Hlajenje sonde merimo s termoelementom. Stopnja hlajenja je sorazmerna količini krvi, ki preide skozi žilo.

V zadnjem času so izdelali naprave, s katerimi je mogoče meriti pretok krvi v intaktni žili. Ena od teh naprav je tudi **elektromagnetni merilec pretoka krvi**. Princip njegovega delovanja temelji na pojavu indukcije. Če naglo premikamo žico med poloma močnega magneta, se v vodniku pojavi indukcijski tok (slika 2.8). Podoben učinek dobimo, če postavimo žilo v magnetno polje. Ker se v krvi nahaja zelo veliko nabitih delcev, se pri gibanju teh skozi magnetno polje pojavi indukcijski tok, ki ga lahko zaznamo z ustreznim aparatom. Električna napetost je sorazmerna pretoku krvi.

Ultrazvočni merilec hitrosti pretoka (slika 2.9) deluje na principu Dopplerjevega efekta. V osnovi aparat deluje kot proizvajalec ultrazvoka. Ta nastane zaradi delovanja električnega toka na kristal, ki prične vibrirati in oddajati ultrazvok frekvence nekaj milijonov Hz. Kristal je nameščen tako, da oddaja ultrazvok v smeri toka krvi. Zvok potuje vzdolž žile in pri tem zadene eritrocite, ki se oddaljujejo od izvora zvoka. Ko se zvok od njih odbije, potuje odbiti zvok nazaj proti kristalu. Frekvenca odbitih valov je nižja od emitiranih. Z merjenjem razlike v frekvenci oddanih in odbitih valov je možno določiti hitrost toka krvi.



Slika 2.8: Princip delovanja elektromagnetnega merilca pretoka krvi
(a – nastanek elektromotorne sile v žici, ki se pomika skozi elektromagnetno polje, b – nastanek elektromotorne sile v elektrodah, nameščenih na krvni žili)



Slika 2.9: Ultrazvočni merilec hitrosti pretoka krvi (kristali)
(a – osnovna konstrukcija, b in c – moderna merilca pretoka krvi v velikih krvnih žilah)

2.3.4 Merjenje časa obtoka krvi

Čas obtoka krvi je čas, ki je potreben, da kri preide celotni obtok in se vrne v isto žilo. Opisanih je nekaj metod določanja časa obtoka pri živalih in ljudeh.

Pri živalih je bila dolgo časa poznana le metoda z uporabo Evansovega modrila. Po tej metodi je bilo potrebno anestezirani živali preparirati obe jugularni veni in v njiju vstaviti trajni kanili. V eno od ven so aplicirali barvilo, iz druge pa pustili počasi odtehati kri. Istočasno, ko so dajali barvilo, so sprožili štoparico. Ko se je v iztekajoči krvi pojavilo barvilo, so štoparico ustavili in izmerili čas. Pri modificirani metodi se živali preparira obe jugularni veni, pod eno se namesti belo (papirnat) podlago, v drugo pa vbrizga modrilo. Ob pojavu modre barve v veni z belo podlago se izmeri čas.

Podobna je metoda z uporabo radioaktivnih izotopov. V eno od jugularnih ven damo izotop, na drugi pa merimo radioaktivnost. Kot izotop lahko uporabljamo $K^{125}J$ ali $K^{131}J$, z radioaktivnim fosforjem (^{32}P) ali tehnecijem (^{99m}Tc) markirane eritrocite in z radioaktivnim jodom (^{125}J ali ^{131}J) ali tehnecijem markirane serumske albumine. Pri tem je potrebno hitro injiciranje (v bolusu).

Podobna je metoda za določanje časa obtoka pri laboratorijskih glodavcih z uporabo fluorescentnega uranina. Anestezirani podgani ali miši vbrizgamo v repno veno 0,5 ml uranina (natrijev fluorescinat 0,53 mol/l oz. 20 g/l) in ob dajanju vključimo štoparico. Zatem žival dvignemo tako, da visi s smrčkom navzdol. V zatemnjeni sobi ob osvetlitvi živali z ultravijolično svetlobo opazimo najprej fluorescenco uhljev, oči in smrčka, zatem prednjih in končno še zadnjih okončin. Ko se pojavi fluorescenca na zadnjih nogah, štoparico ustavimo.

2.4 SRČNI TONI

Srčni toni so zvočni pojavi, ki spremljajo delo srca. So posledica delovanja srčnih zaklopk in vibracij, ki nastanejo ob delu srca. Te se prenašajo po tkivih, ki ležijo med srcem in površino prsnega koša, ta pa pri tem deluje kot resonator (jih ojača).

Srčne tone lahko poslušamo neposredno (s stetoskopom) ali posredno (s fonendoskopijo in fonokardiografijo).

2.4.1 Poslušanje srčnih tonov

Ob poslušanju dela srca lahko slišimo dva srčna tona: prvega ali sistoličnega in drugega ali diastoličnega, pri nekaterih živalskih vrstah pa še vzporedne srčne tone (tretjega in četrtega). Srčne tone moramo razlikovati od srčnih šumov – patoloških zvokov, ki nastajajo ob delu srca, če so npr. okvarjene srčne zaklopke.

Prvi (sistolični) srčni ton nastane v času sistole prekatov, ko se srčna mišica skrči in se zapirajo atrioventrikularne zaklopke. Dejavniki za njegov nastanek so zapiranje atrioventrikularnih zaklopk in napenjanje kitastih vrvic (*chorde tendineae*), vibriranje miokarda prekata, odpiranje semilunarnih zaklopk ter vibriranje aorte in *a. pulmonalis* neposredno po zapiranju zaklopk. Vpliv na intenzivnost tona imajo ekstrakardialni faktorji (debelost, razvitost prsnih mišic) in kardialni faktorji (položaj zaklopk, intenzivnost fizičnega dela).

Drugi (diastolični) srčni ton nastane ob diastoli prekatov, ko se srčna mišica sprosti in se zapirajo semilunarne zaklopke pod vplivom pritiska krvi iz *a. pulmonalis* in aorte. Faktorji za njegov nastanek so zapiranje semilunarnih zaklopk, vibracije krvi, sten pljučne arterije in aorte. Vpliv na jakost drugega srčnega tona ima višina arterijskega tlaka.

Tretji srčni ton nastane v zgodnji fazi diastole zaradi predhodnega odpiranja atrioventrikularnih zaklopk in vibracij sten prekata ob polnjenju s krvjo. Pogost je pri konju in muli.

Četrty srčni ton nastane med sistolo preddvorov; slišimo ga lahko pri konju, muli, oslu, mački in govedu.

Naloge:

- S stetoskopom poslušajte srčne tone pri človeku in različnih vrstah domačih živali!

2.4.2 Fonokardioskopija in fonokardiografija

Registracija srčnih tonov je možna tudi z električnim ojačanjem zvoka, ki ga izvajamo s fonendoskopom. Mikrofon fonendoskopa namestimo na površino prsnega koša. Srčne tone lahko tudi grafično zapišemo z aparatom, imenovanim **fonokardiograf**; metoda se imenuje **fonokardiografija**, zapis pa **fonokardiogram**. S fonokardiografijo lahko zapišemo in natančneje analiziramo srčne tone, njihov pričetek v srčnem ciklusu, trajanje in natančno število kakor tudi amplitudo in frekvenco vibracij v posameznem tonu. S srčnim katetrom, ki ga uvedemo neposredno v srce, pa izvajamo intrakardialno fonokardiografijo.

Zapis srčnih tonov temelji na sledečem principu. Vibracije, ki bi sicer delovale na timpanično membrano ušesa pri avskultaciji ali fonendoskopiji, zazna mikrofon, katerega nihanje lahko registriramo z ustreznim elektronskim sistemom. Sodobni, računalniško podprti fonokardiografi lahko ojačajo in ustrezno analizirajo poljuben sektor zapisa.

Normalni fonokardiogram običajno prikaže **prvi srčni ton** kot samostojno skupino hitrih vibracij, kjer hitro nastopi maksimalna amplituda in prav tako naglo izgine. Traja običajno 0,10 do 0,17 sekund s frekvenco oscilacij med 25 in 50 v sekundi. Pričetek prvega srčnega tona sovпада s pričetkom ventrikularne sistole. Natančnejše analize prvega srčnega tona so pokazale, da sestoji iz dveh delov. Prvi del se ujema z izometrično kontrakcijo ventrikla, zato se imenuje izometrična komponenta, drugi del pa se ujema z ejakcijo krvi iz ventrikla, zato ga imenujemo ejakcijska komponenta prvega srčnega tona.

Drugi srčni ton je zapisan kot skupina štirih do šestih vibracij z velikimi amplitudami in traja okoli 0,14 do 0,16 sekund. Njegov pričetek se ujema s pojavom zobca na zapisu aortnega oziroma centralnega arterijskega pulza (glej vajo 2.6). Tudi drugi srčni ton se na fonokardiogramu pogosto prikaže kot skupina dveh ločenih zapisov. Nastane kot posledica asinhronnega zapiranja semilunarnih zaklopk na aorti in pljučni arteriji.

Tretji srčni ton se ujema s končno fazo hitrega polnjenja srca. Medtem ko nekateri avtorji menijo, da je ton samostojen, ga drugi prištevajo k drugemu srčnemu tonu.

Četrti srčni ton je po nekaterih avtorjih dejansko začetni ton in ga imenujejo fiziološki avrikularni ali atrijski ton. Nastane kot posledica vibracije ventriklov po vstopu krvi iz atrijskih. Pri natančni analizi je ugotovljeno, da vsebuje do štiri komponente.

Naloga:

- Shematično narišite fonokardiogram in označite elemente!

2.5 MINUTNI VOLUMEN SRCA

Količino krvi, ki izhaja iz srca, lahko izrazimo kot sistolični ali kot minutni volumen. **Sistolični ali udarni volumen srca** je količina krvi, ki jo srce iztisne v eni sistoli. Z drugimi besedami je to razlika med volumnom srca na koncu diastole (**končni diastolični volumen**) in volumnom srca na koncu sistole (**končni sistolični volumen**). **Minutni volumen** pa je količina krvi, ki jo srce prečrpa v času ene minute. Soodvisnost med sistoličnim in udarnim volumnom lahko izrazimo takole:

$$MV = SV \times fs$$

(*MV* – minutni volumen srca, *SV* – sistolični volumen srca, *fs* – frekvenca srca)

Ker je tehnično lažje izvedljivo merjenje minutnega volumna srca kot sistoličnega, običajno izmerimo minutni volumen, sistoličnega pa izračunamo. Za merjenje minutnega volumna so znane neposredne (kirurške ali krvave) in posredne (kemične in dilucijske) metode.

2.5.1 Kirurške metode merjenja minutnega volumna srca

Pri kirurških metodah lahko uporabljamo merilce pretoka krvi (opisani v vaji 2.3.3), ki jih vstavimo neposredno v aorto. Metode so grobe, zato so uporabne samo za nekatere poskuse.

2.5.2 Kemične metode merjenja minutnega volumna srca

Kemične metode so uporabne pri živalih in tudi pri ljudeh. Temeljijo na direktnem **Fickovem principu**, ki izhaja iz dejstva, da je pri uravnovešeni porabi O_2 oziroma nastajanju CO_2 količina O_2 , ki se veže v pljučih, ali količina CO_2 , osvobodjena v eni minuti, enaka količini O_2 , ki se je vezala na hemoglobin, ali volumnu CO_2 , ki je nastal v istem času. Primer opisuje določanje minutnega volumna na osnovi določanja O_2 .

Volumen O_2 , vezanega v pljučih, znaša:

$$V_p O_2 = (F_{ins} O_2 - F_{exp} O_2) \times V_{min}$$

($V_p O_2$ – količina kisika, vezanega v pljučih, $F_{ins} O_2$ – volumen kisika v vdihanem zraku, $F_{exp} O_2$ – volumen kisika v izdihanem zraku, V_{min} – minutni volumen ventilacije)

Količina kisika v krvi znaša:

$$V_k O_2 = (F_a O_2 - F_v O_2) \times MV$$

($V_k O_2$ – količina kisika v krvi, $F_a O_2$ – koncentracija kisika v arterijski krvi, $F_v O_2$ – koncentracija kisika v venski krvi, MV – minutni volumen)

Če torej menimo, da sta vrednosti količine kisika v pljučih in količina kisika v krvi enaki, lahko to zapišemo:

$$(F_{ins} O_2 - F_{exp} O_2) \times V_{min} = (F_a O_2 - F_v O_2) \times MV$$

torej je minutni volumen

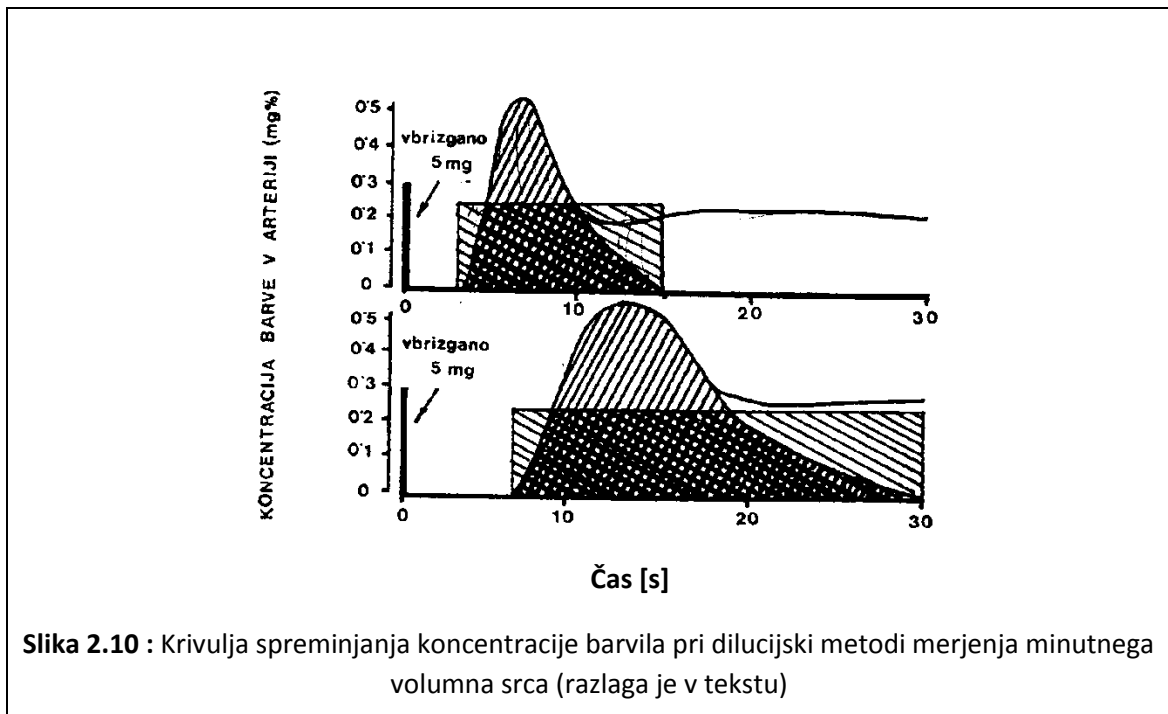
$$MV = \frac{(F_{ins} O_2 - F_{exp} O_2)}{(F_a O_2 - F_v O_2)} \times V_{min}$$

Določanje minutnega volumna se tehnično izvede tako, da se izmeri minutni volumen pljučne ventilacije, koncentracija O_2 v vdihanem in izdihanem zraku ter v arterijski in venski krvi. Izmerjene vrednosti se vstavi v formulo. Na podoben način lahko določimo minutni volumen tudi z merjenjem CO_2 . Metode na osnovi indirektnega Fickovega principa so izvedene tako, da oseba ali žival vdihne točno določeno količino nekega nevtralnega plina, kot npr. acetilena ali N_2O , nakar se izmeri njegova koncentracija v krvi in izdihanem zraku.

2.5.3 Dilucijske metode merjenja minutnega volumna srca

Dilucijske metode temeljijo na določanju stopnje razredčitve (dilucije) v kri vbrizganega indikatorja. Kot indikator lahko uporabljamo koloidna barvila, npr. Evansovo modrilo, srčno zelenilo (*cardio green*) ali serumske albumine, označene z radioaktivnim izotopom.

Indikator je potrebno vbrizgati v veno ali s katetrom neposredno vnesti v desno srce. Poleg tega pa je potrebno kanilirati arterijo in iz nje v krajših časovnih zaporedjih jemati vzorce krvi, v katerih se določi koncentracija barvila. Na absciso koordinatnega sistema nanašamo čas odvzema posameznih vzorcev, na ordinato pa koncentracije barvila v njih. Tako dobimo parabolično krivuljo, ki ponazarja spremembo koncentracije barvila v določenem časovnem obdobju.



Slika 2.10 : Krivulja spreminjanja koncentracije barvila pri dilucijski metodi merjenja minutnega volumna srca (razlaga je v tekstu)

Na zgornji krivulji na sliki 2.10 vidimo, da se je barvilo pojavilo v arterijski krvi približno 3 sekunde po injiciranju. Nato koncentracija barvila narašča in doseže maksimalno vrednost v približno 6 do 7 sekundah. Sledi nagel padec koncentracije, vendar se ne pade na ničlo, pač pa se za dalj časa ustali na določeni vrednosti. Vzrok temu je ponovno vračanje barvila s krvjo skozi srce v arterijski obtok. Da bi določili, kdaj bi se krivulja spustila na ničelno vrednost, padajoči del krivulje ekstrapoliramo do abscise. Tako lahko precej točno ocenimo čas, potreben, da srce odstrani vse vbrizgano barvilo. Nato izračunamo povprečno koncentracijo barve v mililitru krvi v času trajanja krivulje. Minutni volumen nato lahko izračunamo s formulo:

$$MV = \frac{B_i \times 60}{C \times t}$$

(*MV* – minutni volumen srca [*ml/min*], *B_i* – injicirano barvilo [*mg*], *C* – povprečna koncentracija barvila v *ml* krvi v času trajanja krivulje [*mg/ml*], *t* – čas trajanja krivulje [*s*])

Naloga:

- Izračunajte minutni volumen srca na osnovi obeh grafikonov dilucijske metode na sliki 2.10!

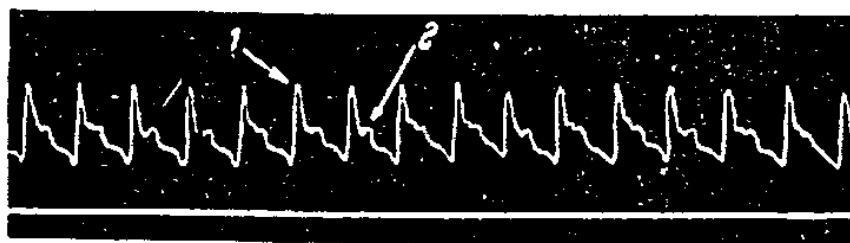
2.6 PULZ

2.6.1 Merjenje pulza pri domačih živalih in pri človeku

Pulz je posledica ritmičnih oscilacij arterijskih sten, ki nastane zaradi spreminjajočega se krvnega tlaka v njihovem lumnu. Dejansko gre za prenos širjenja sten aorte ob sistoli in njihovega vračanja v prvotni položaj ob diastoli. V obliki valov se to širjenje prenaša vzdolž arterij vse do arteriol. Število utripov v časovni enoti je identično številu srčnih kontrakcij.

Merjenje pulza se uporablja pri diagnostiki različnih bolezenskih stanj srca in krvnega obtoka. Pri pulzu ugotavljamo njegovo frekvenco (število utripov v minuti), ritem (kako si srčni utripi slede) in kvaliteto (jakost pulza, napolnjenost arterij). Pri nekaterih domačih živalih, npr. pri psu, ovci in kozi, je ritem fiziološko pogosto nepravilen. Pulz najenostavneje merimo s palpacijo na dostopnih, površinskih arterijah (pri konju in govedu – *a. mandibularis*, pri manjših živalih, npr. psu, mački – *a. femoralis*, pri človeku – *a. radialis*), kjer preštejemo število utripov v časovni enoti (v eni minuti).

Pulz lahko registriramo tudi mehansko, s pomočjo enostavnih ali tudi bolj zapletenih **sfigmografov**. Krivulja, ki jo pri tem dobimo, se imenuje **sfigmogram** in jo prikazuje slika 2.11. Vzpenjajoči se del krivulje imenujemo anakrotni, padajoči del pa katakrotni del. Anakrotni del je posledica naglega dviga tlaka v žili, ki nastane zaradi sistole srca. Na katakrotnem delu je najprej viden padec tlaka kot posledica odtekanja krvi na periferijo, zobec na tem delu krivulje (**katakrotna elevacija** ali **dikrotni zobec**) pa je posledica pulzacije aortne stene zaradi povečanja tlaka pri odbijanju krvi od zaprtih semilunarnih zaklopk.



Slika 2.11: Sfigmogram

1 – anakrotni del, 2 – dikrotni zobec na katakrotnem delu

Naloge:

1. Izmerite svoj pulz ob mirovanju in po fizičnem naporu!
2. Ugotovite, v kolikem času po fizičnem naporu se pulz vrne na začetno vrednost!

2.6.2 Hitrost širjenja pulznega vala

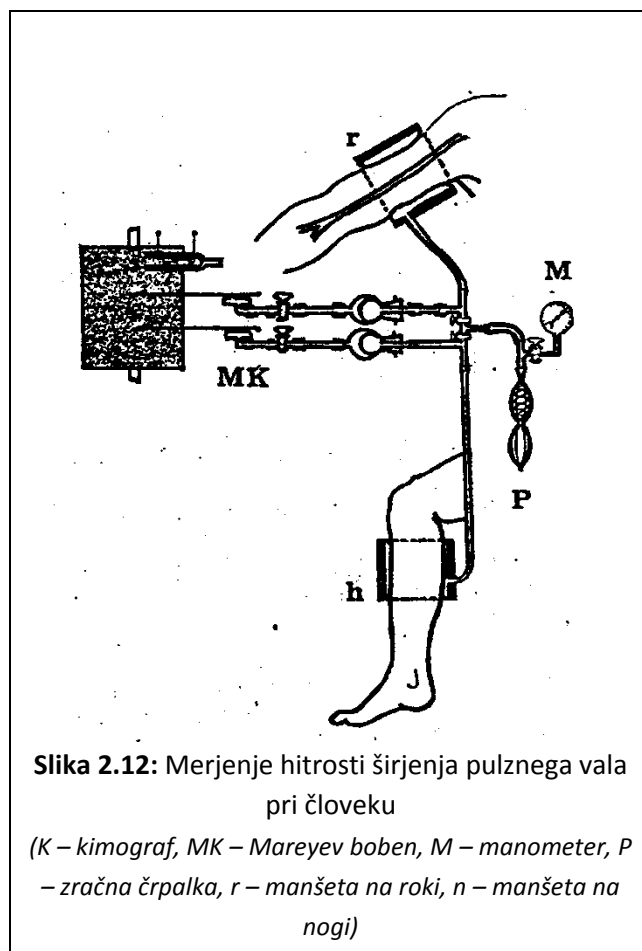
Pulzni val pomeni časovno zakasnitev pulza med dvema mestoma na ožilju. Hitrost širjenja pulznega vala izmerimo tako, da na dveh, od srca različno oddaljenih mestih istočasno registriramo pulz.

a) Material:

- poskusna oseba, kimograf, opremljen z Mareyevima bobnoma za registracijo pulza (slika 2.12), meter.

b) Postopek:

Nad arterijo radialis na nadlakti namestimo manšeto, ki je s cevjo povezana z enim od Mareyevih bobnov. Na goleni poskusne osebe namestimo manšeto, ki je po vmesnem delu povezana z drugim Mareyevim bobnom, in jo napolnimo z zrakom. Pisali obeh Mareyevih bobnov naj bosta eno nad drugim na isti navidezni vertikalni črti. Izmerimo razdaljo od srca do mesta meritve na *a. radialis* in do mesta meritve na *a. tibialis*. Ko sprožimo kimograf, obenem zapišemo čas. Pri zapisovanju pulzov na obeh mestih vidimo, da se pulz na *a. tibialis* pojavi kasneje kot na *a. radialis*.



Slika 2.12: Merjenje hitrosti širjenja pulznega vala pri človeku

(K – kimograf, MK – Mareyev boben, M – manometer, P – zračna črpalka, r – manšeta na roki, n – manšeta na nogi)

Zapišemo ali izračunamo časovni zaostanek na obeh mestih. Pri izračunu ocenjujemo, kot da sta obe mesti na isti žili in na osnovi časovne razlike in razdalje med njima izračunamo hitrost širjenja pulznega vala po formuli:

$$V_p = ds/dt$$

(V_p – hitrost širjenja pulznega vala, ds – razdalja med obema mestoma, dt – časovna razlika pri registraciji obeh pulzov)

2.7 MERJENJE KRVNEGA TLAKA

2.7.1 Neposredno merjenje krvnega tlaka v arteriji karotis pri kuncu

Neposredno merjenje krvnega tlaka (krvava metoda) je bil prvi način, s katerim je bil leta 1776 izmerjen krvni tlak v *a. femoralis* pri konju. Danes se ta metoda uporablja pri eksperimentalnem delu, pri ugotavljanju vpliva nekaterih farmakoloških snovi na krvni tlak in pri dolgotrajnih kirurških posegih (v veterinarski medicini predvsem pri psih).

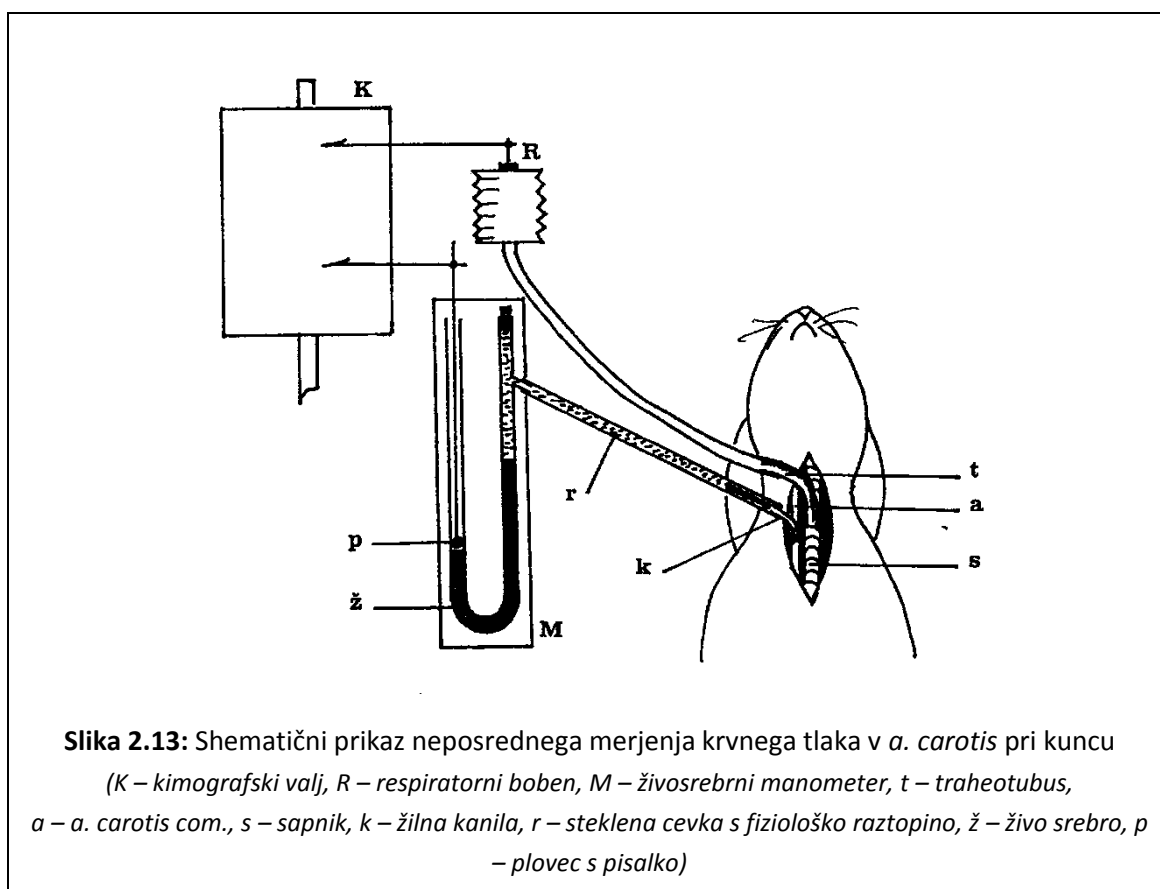
a) Material:

- kunec, operacijska mizica, pribor za operacijo, kimograf, živosrebrni manometer, respiratorni boben, stimulator, uretan (mkc 250 g/L), Ringerjeva raztopina za toplokrvne živali, acetilholin, adrenalin.

b) Postopek:

• Prepariranje:

1. Kunca narkotiziramo in ga fiksiramo na operacijsko mizico.
2. Pripravimo in izprepariramo operacijsko polje na vratu.
3. Izprepariramo *n. vagus*; z vodilom napeljemo pod živcem zanko, ne da bi jo zategnili.
4. Izprepariramo sapnik, ga prerežemo in vstavimo traheotubus.
5. Izprepariramo *a. carotis*: na dveh mestih pod žilo nastavimo zanki, s prijemalko za žilo pa preprečimo cirkulacijo v *a. carotis*. Nato zadrgnemo proksimalno zanko in zarežemo v arterijo; skozi zarezo vanjo potisnemo žilno kanilo in jo podvežemo z distalno zanko.



- **Namestitev na kimograf:**

1. Traheotubus povežemo z respiratornim bobnom. Ko vanj prihaja izdihani zrak, se nabori raztegnejo (dvig krivulje na kimografu), ob vdihu pa skrčijo (krivulja se spusti).
2. Žilno kanilo z gumijasto cevko, napolnjeno z Ringerjevo raztopino, povežemo z živosrebrnim manometrom. Odpremo prijemalko za žilo in omogočimo dotok krvi v cevko oziroma v manometer. Spremembe tlaka, ki nastajajo v *a. carotis*, se neposredno prenašajo po Ringerjevi raztopini na živo srebro v U cevki. V drugem kraku manometra je plovec s čvrstim pisalom, ki zapisuje spremembe na kimografski valj. Ob sistoli srca se zapis krivulje dvigne, ob diastoli pa pade.

- **Registracija:**

Na zapisu bomo opazovali dve krivulji: krivuljo krvnega tlaka in krivuljo dihanja. Ob zapisu krvnega tlaka registriramo 3 stopnje oscilacij:

- **Oscilacije I. reda (pulzne)** ustrezajo spremembam krvnega tlaka v času sistole in diastole levega ventrika. Arterijski tlak je največji v času sistole ventriklov, ko se pozitivni val tlaka z veliko hitrostjo prenese na arterije. V času diastole pa krvni tlak pade, vendar ne na 0 kot v ventriklih, pač pa zaradi elastičnosti arterij samo do neke določene, relativno visoke vrednosti (diastolični tlak).
- **Oscilacije II. reda (respiratorne)** so posledica sprememb krvnega tlaka zaradi dihanja. V času vdiha, ko se zniža intratorakalni tlak, je pritekanje krvi v srce olajšano in iztiskanje oteženo, v času izdiha pa je obratno. Na krvni tlak vpliva dihanje tudi po živčnem sistemu zaradi draženja presoreceptorjev v loku aorte in karotidnem sinusu ob širjenju pljuč med vdihom. Glede na to, kateri od faktorjev prevladuje, se krvni tlak nekoliko poveča med vdihom ali izdihom. Pri človeku nastopi rahel dvig krvnega tlaka (za nekaj mm Hg) ob vdihu, padec pa ob izdihu. Pri živalih pa pride do padca krvnega tlaka ob vdihu (ob tem se pri kanidih poveča tudi frekvenca srca), in do dviga krvnega tlaka ob izdihu.
- **Oscilacije III. reda (vazomotorične)** so odvisne od vzdraženja vazomotoričnih centrov in v zvezi s tem od vzdraženja vazomotoričnih vlaken krvnih žil. Lahko jih opazimo le pri dolgotrajnem registriranju krvnega tlaka ali pa pri umetno izzvanih spremembah v vazomotorni regulaciji krvnega tlaka.

- **Vpliv različnih faktorjev na arterijski tlak:**

- **Draženje vagusa:** Z elektrodo se dotaknemo izprepariranega živca. Nastopi padec krvnega tlaka zaradi upočasnjene delovanja srca (zmanjšanje minutnega volumna srca, periferna vazodilatacija).
- **Dajanje adrenalina:** Zaradi pojačanega dela srca in krčenja perifernih krvnih žil nastopi hiter dvig krvnega tlaka. Podoben učinek bi izzvalo draženje simpatikusa.
- **Dajanje acetilholina:** Zavira delo srca, povzroča delno širjenje sistemskih krvnih žil in zato nastopi padec krvnega tlaka.

c) Naloge:

1. Narišite registracijske zapise krvnega tlaka takoj po preparaciji in ob delovanju različnih faktorjev!
2. Na osnovi kimografskega zapisa ugotovite in izračunajte spremembe v krvnem tlaku in dihanju po draženju vagusa in dajanju obeh raztopin!
3. Razložite nastale spremembe!

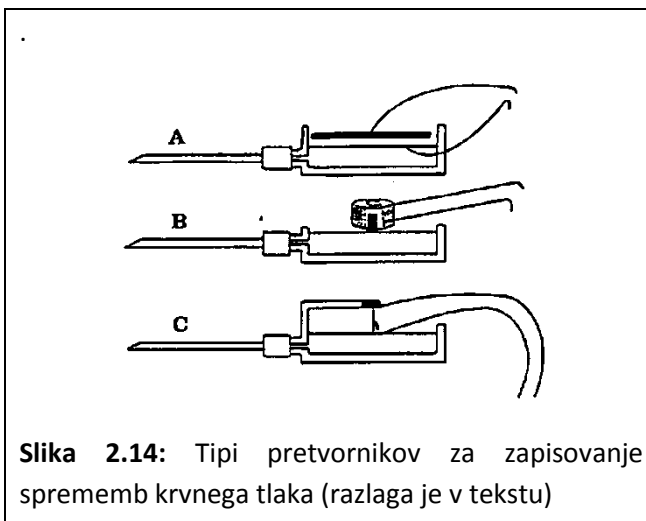
2.7.2 Natančno merjenje krvnega tlaka

Z neposrednimi (krvavimi) metodami je mogoče meriti majhne in nagle spremembe krvnega tlaka. Meritve omogočajo posebne naprave – pretvorniki (*transducerji*), ki mehanske spremembe tlaka pretvorijo v električne signale. Te ustrezni elektronski aparati zaznajo in registrirajo (npr. osciloskop in oscilograf) ali pretvorijo iz analogne v digitalno obliko.

Na sliki 2.14 so prikazani trije modeli pretvornikov. Vsem je skupno, da skozi iglo vstopa kri v majhno komorico, pokrito s tanko membrano. Sprememba tlaka v krvni žili povzroči spremembo tlaka v komorici, zato se membrana premakne.

Pretvornik A deluje na principu kondenzatorja. Nad membrano je kovinska plošča, kateri se membrana približa, kadar naraste tlak v komorici. Pri tem se spremeni električna kapaciteta med ploščo in membrano, ki jo primeren aparat lahko zazna.

Na membrani pretvornika B je drobna železna palčka, ki se skladno z membrano premika v tuljavo ali iz nje. Pri tem nastane indukcijski tok, ki ga je mogoče registrirati.



Slika 2.14: Tipi pretvornikov za zapisovanje sprememb krvnega tlaka (razlaga je v tekstu)

V pretvorniku C je nad membrano napeta tanka žica, ki deluje kot upornik. Ko se žica raztegne, njen upor raste, ko se krči, pa pada. Spremembe v upornosti zazna ustrezen elektronski sistem.

Prav tako je mogoče na membrano namestiti drobno zrcalo in vanj usmeriti snop svetlobnih žarkov. Ti se odbijajo in padajo na premikajoči se fotografski papir, na katerem puščajo sled.

2.7.3 Posredno merjenje krvnega tlaka

A) Posredno merjenje krvnega tlaka pri človeku

Krvni tlak je produkt dela srca (srčnega *outputa*) in odpora krvnega obtoka. Zaradi ritmičnega delovanja srca prihaja kri v krvni obtok v sunkih. S to metodo merimo krvni tlak v arterijah, pri čemer dobimo dve vrednosti: višji – sistolični tlak je posledica sistole ventriklov, nižji – diastolični tlak pa nastane v diastoli, tik pred naslednjo kontrakcijo ventrikla. Povprečni ali srednji krvni tlak izračunamo po formuli:

$$P = D + \frac{1}{3}(S - D)$$

(*P* – povprečni krvni tlak, *D* – diastolični tlak, *S* – sistolični tlak)

Na vrednosti krvnega tlaka vplivajo starost, spol, teža, zdravstveno stanje in fizično delo osebkov.

Vrednost krvnega tlaka se izraža v milimetrih živega srebra [mm Hg], po mednarodnem merskem sistemu (SI) pa v kilopaskalih [kPa]. Merjenje krvnega tlaka temelji na principu, da je tlak v manšeti, ki ovija roko, enak tistemu v žili (*a. brachialis*). Metodo je uvedel in izpopolnil italijanski zdravnik Riva-Rocci, po katerem se tudi imenuje. V humani medicini je posredno merjenje krvnega tlaka sestavni del vsakega pregleda, vedno pogosteje pa se uporablja tudi v veterinarski medicini.

Naprava za merjenje krvnega tlaka pri človeku (*sfigmomanometer*) je sestavljena iz gumijaste

manšete, ki se ovije okoli nadlakti, zračne tlačilke za vpihavanje zraka v manšeto, živosrebrnega manometra ali aneroida, sistema cevi in ventilov. Pri merjenju krvnega tlaka potrebujemo tudi stetoskop.

a) Postopek:

1. Manšeto ovijemo okoli nadlakti, medtem ko je roka naslonjena na mizo.
2. Z gumijasto črpalko napolnimo manšeto.
3. Z ventilom na črpalki pričnemo spuščati zrak iz manšete, obenem prislonimo stetoskop na notranjo stran komolčnega pregiba, kjer poteka *a. brachialis*.
4. Ko v določenem trenutku zaslišimo utripu podobne šume (Korotkove šume), odčitamo tlak. To je sistolični krvni tlak.
5. Nadaljujemo s spuščanjem zraka iz manšete, dokler šumi ne prenehajo; tedaj zopet odčitamo tlak – to je diastolični krvni tlak.

Razlaga: Ko smo napolnili manšeto z zrakom, se je pretok krvi v *a. brachialis* ustavil. Pri spuščanju zraka iz manšete popušča pritisk na arterijo, dokler tlak v arteriji ne prevlada tlaka v manšeti. Tedaj se arterija nekoliko odpre in v njej se prične vzpostavljati pretok krvi, vendar le ob največjem, torej sistoličnem tlaku. Pri tem nastajajo turbulentna gibanja krvi, ki jih slišimo s stetoskopom, imenujemo pa jih Korotkovi šumi. Pri nadaljnjem popuščanju tlaka v manšeti se arterija vedno bolj širi, dokler ne doseže normalnega premera; tedaj pretok krvi v njej postane laminaren, šumi pa izginejo, ker kri prehaja skozi arterijo tudi v fazi diastole (diastolični tlak).

b) Naloge:

1. Shematično narišite sfigmomanometer!
2. Izmerite sistolični in diastolični tlak v mirovanju in po obremenitvi in razložite nastale spremembe!

B) Posredno merjenje krvnega tlaka pri živalih

Krvni tlak pri velikih in majhnih sesalcih je približno enakega velikostnega reda. Ker so pri velikih živalih arterije bistveno daljše kot pri majhnih, bi pričakovali, da je pri velikih živalih tudi njihov odpor večji, kar pa ni res. Pri velikih živalih teče kri velik del krvnega obtoka po dolgih, širokih žilah, ki nudijo toku krvi le majhen odpor. Za premagovanje tega je potrebna le majhna sila. Dolžina arteriol in kapilar pa je pri vseh živalih približno enaka, zato je tudi odpor toku krvi v teh žilah približno enak. Zato pa tudi ni treba, da bi bil krvni tlak pri velikih živalih večji kot pri majhnih. Izjema pri tem je žirafa: zaradi premagovanja velike višinske razlike med srcem in možgani (približno 3 m) je potreben visok arterijski tlak.

Princip posrednega merjenja krvnega tlaka pri živalih je podoben kot pri ljudeh. Tlak merimo na *a. femoralis* pri psih ali na repni arteriji (*a. coccigealis*) pri velikih in nekaterih laboratorijskih živalih, npr. pri podganah. Aparat za merjenje krvnega tlaka pri živalih je podoben tistemu, ki se uporablja pri ljudeh in je sestavljen iz gumijaste manšete, zračne tlačilke, manometra in cevi, namesto stetoskopa pa uporabljamo ultrazvočni merilec, ki temelji na Dopplerjevem efektu. Sonda, ki jo prislonimo na žilo distalno od manšete, oddaja ultrazvočne signale in jih tudi sprejema. Te signale aparat pretvarja v zvočne, ki jih lahko poslušamo po zvočniku ali s sluškami. Pri tem načinu merjenja diastoličnega tlaka zvok ne izgine, pač pa se le spremeni njegova frekvenca. Zato je diastolični tlak nekoliko težje določiti kot pri ljudeh.

2.7.4 Vpliv nekaterih dejavnikov na delovanje srca in krvni tlak pri človeku

A) Opazovanje venskega tlaka

Razlike v krvnem tlaku v različnih venah so pomembne za tok krvi v smeri proti srcu. V najmanjših venah je tlak okoli 2 kPa (15 mm Hg), v večjih okoli 1 kPa (7,5 mm Hg), v velikih dovodnicah pa 0 kPa. V venskem obtoku je pomemben tudi vpliv hidrostatičnega tlaka. Ta je posledica delovanja sile težnosti na kri. V delih telesa, ki so nad nivojem desne polovice srca, hidrostatični tlak pripomore k boljšemu dotoku krvi proti srcu, v delih pod nivojem desne polovice srca pa se toku krvi zoperstavlja.

a) Postopek:

- Opazujte in zapišite stopnjo napolnjenosti ven na roki in dlani, ko roko držite:
 - iztegnjeno v višini srca:
 - nad glavo:
 - spuščeno ob telesu:
- Postavite se pred tablo s koščkom krede v roki. Držite roko spuščeno ob telesu, dokler se vene ne napolnijo. Dvignite iztegnjeno roko na višino srca (vene na roki bodo še vedno napolnjene) in označite položaj roke na tabli.
- Pomočnik naj vam dviga roko, dokler se vene ne izpraznijo. Višino naj označi na tabli.
- Izmerite razdaljo med obema točkama (v cm):

b) Naloga:

- Izračunajte venski tlak v mm Hg (kPa) po formuli:

$$P = (d - 10) \times \frac{1,055}{13,55} \times 10$$

(d – razdalja med obema točkama [cm], 10 – odpor krvnih žil [cm krvi], 1,055 – gostota krvi, 13,55 – gostota živega srebra)

B) Vpliv ohladitve na pulz in arterijski krvni tlak

Poskus prikazuje spremembo krvnega tlaka zaradi stresa, ki nastane pod vplivom okolja. Test so včasih uporabljali za odkrivanje potencialnega povišanega krvnega tlaka pri ljudeh, pri čemer je povišanje sistoličnega in/ali diastoličnega tlaka za več kot 23 mm Hg (3,06 kPa) pomenilo hiperreakcijo.

Povečanje udarnega volumna srca (pozitivno inotropno delovanje), ki nastane kot reakcija na stres, prispeva k povečanju sistoličnega tlaka. Spremembe frekvence srca in perifernega odpora pa povzročijo dvig diastoličnega tlaka. Ker se srčna frekvenca poveča, ko naraste arterijski tlak, te spremembe niso posledica refleksa mehanoreceptorjev (baroreceptorjev).

a) Ekipa:

- poskusna oseba, merilec pulza, merilec krvnega tlaka, časomerilec, zapisnikar.

b) Oprema:

- vedro ledeno mrzle vode, sfigmomanometer, stetoskop, štoparica.

c) Postopek:

- Poskusna oseba naj mirno sedi. Na levo roko ji namestimo manšeto sfigmomanometra. Izmerite (3- do 5-krat v obdobju 5 min):
 - normalen krvni tlak

- pulz.....
- 2. Poskusna oseba naj potopi prsto roko v ledeno vodo za 60 sekund. Izmerite (ob potopitvi, po 30 sekundah in po 1 minuti):
 - krvni tlak
 - pulz
- 3. Poskusna oseba naj vzame roko iz vode. Izmerite (v enominutnih intervalih, dokler se ne povrtneta na izhodiščno vrednost):
 - krvni tlak
 - pulz

č) Naloge:

1. Rezultate meritve vnesite v grafikon (čas – abscisa, krvni tlak – ordinata)!
2. Odštejte povprečni pulz oz. krvni tlak pred potopitvijo roke od vrednosti, izmerjenih po potopitvi roke! Ta vrednost predstavlja indeks labilnosti krvnega tlaka.

C) Valsalvin maneuver

Poskus prikazuje odvisnost med vračanjem venozne krvi v srce, udarnim volumnom in arterijskim tlakom. Po kompresiji abdominalne v. cave se vračanje venske krvi v srce najprej poveča (za 1–5 sekund), nato pa zmanjša (za 5–60 sekund), kar vodi do padca sistoličnega in diastoličnega tlaka. Padajoči venski tlak sproži refleks baroreceptorjev (mehanoreceptorjev) in poveča srčno frekvenco. Po sprostitvi abdominalne kontrakcije se proces obrne in opazimo lahko povečanje arterijskega tlaka.

a) Ekipa:

- poskusna oseba, merilec pulza, merilec krvnega tlaka, časomerilec, zapisnikar.

b) Oprema:

- sfigmomanometer, stetoskop, štoparica ali ura s sekundnim kazalcem.

c) Postopek:

1. Poskusna oseba naj udobno sedi. Izmerite 5 × v enominutnih intervalih:
 - krvni tlak
 - pulz
2. Poskusna oseba naj izdihne, močno napne abdominalno miškulaturo in zadrži dihanje 30 sekund. Izmerite (v času 5 min po koncu abdominalne kontrakcije):
 - krvni tlak (v 30-sekundnih intervalih)
 - pulz (v 10-sekundnih intervalih (utripi/10 sek × 6 = frekvenca na minuto))

č) Naloge:

- Zapišite rezultate in meritve vnesite v grafikon (čas – abscisa, krvni tlak – ordinata)!

Č) Vpliv položaja telesa na pulz in arterijski krvni tlak

Poskus prikazuje spremembe frekvence srca in krvnega tlaka zaradi sprememb v položaju telesa, ki jih večinoma povzroči ortostatična reakcija. Pri tem procesu inhibicija vračanja venske krvi v srce (ob ležanju) vzdraži baroreceptorje v karotidnem sinusu, ki preko vazomotoričnega centra povečajo vpliv simpatikusa na srce. Njegova hronotropna komponenta se kaže kot povečanje frekvence srca. Zato ima reakcija refleksno komponento. Nasprotno pa med vadbo povečan ergotropni učinek pospeši delovanje srca. Metabolične spremembe, ki ob tem nastanejo, potrebujejo določen čas, da se povrnejo na izhodiščno raven. Zato je upadanje frekvence srca po vadbi počasno.

a) Ekipa:

- poskusna oseba, časomerilec, merilec pulza, merilec krvnega tlaka, zapisnikar.

b) Oprema:

- sfigmomanometer, stetoskop, štoparica ali ura s sekundnim kazalcem.

c) Postopek:

1. Namestite sfigmomanometer na levo roko poskusne osebe in izmerite krvni tlak, kakor je navedeno v protokolu. Prav tako merite pulz na desni radialni arteriji eno celo minuto ali po navodilih v protokolu. **Ko začnete s poskusom, ga ne smete prekinjati.**
2. Poskusna oseba naj udobno sedi. Izmerite pulz in arterijski krvni tlak.
3. Poskusna oseba naj se uleže. Izmerite:
 - pulz prvo minuto ležanja
 - pulz drugo minuto ležanja
 - pulz in krvni tlak tretjo minuto ležanja
4. Poskusna oseba naj se usede. Izmerite:
 - pulz prvo minuto mirnega sedenja
 - pulz drugo minuto mirnega sedenja
 - pulz in krvni tlak tretjo minuto mirnega sedenja
5. Poskusna oseba naj vstane. Izmerite:
 - pulz prvo minuto stanja
 - pulz drugo minuto stanja
 - pulz in krvni tlak tretjo minuto stanja
6. Poskusna oseba naj teče na mestu 1 minuto. Izmerite:
 - pulz prvo minuto teka na mestu (preštejte pulz prvih 15 sek takoj po prenehanju teka, vrednost dobite tako, da št. utripov pomnožite s 4)
 - pulz in krvni tlak prvo minuto mirnega sedenja po vaji
 - pulz in krvni tlak drugo minuto mirnega sedenja po vaji
 - pulz in krvni tlak tretjo minuto mirnega sedenja po vaji

2.8 KAPILARNA CIRKULACIJA

2.8.1 Opazovanje kapilarne cirkulacije v mezenteriju žabe

Kapilarno cirkulacijo v organizmu si lahko predstavljamo na osnovi opazovanja cirkulacije v mezenteriju žabe.

a) Material:

- narkotizirana žaba, preparirna mizica z izrezom v sredini, igle, mikroskop.

b) Postopek:

1. Narkotizirano žabo položimo na preparirno mizico.
2. Na lateralni strani trebuha naredimo rez in skozenj izvlečemo črevo z mezenterijem.
3. Poiščemo primerno mesto na mezenteriju z lepo vidno mrežo žil in ga razpremo skozi okence na preparirni mizici.
4. Pod majhno povečavo mikroskopa opazujemo cirkulacijo v mezenteriju.

c) Naloge:

1. Opazujte preparat pod mikroskopom in na osnovi smeri pretoka krvi poiščite arterije in vene!
2. Narišite preparat in smer pretoka krvi v žilah!

3 FIZIOLOGIJA DIHANJA

Fazi dihanja (*pulmonarne ventilacije*) sta vdih in izdih. Ob vdihu se skrčijo zunanje medrebrne mišice in trebušna prepona, kar poveča volumen prsnega koša. Zato v njem nastane podtlak in zrak prodre v pljuča. Med normalnim izdihom se inspiratorne mišice sprostijo, diafragma se dvigne, stena prsnega koša pa se pomakne navznoter (oz. v normalen položaj). Ob tem tlak v prsnem košu in v pljučih naraste, zato se zrak iztisne. Izdih je običajno pasiven proces, lahko pa se intenzivira s krčenjem trebušnih in notranjih medrebrnih mišic.

3.1 DOLOČANJE FREKVENCE DIHANJA

Pod frekvenco dihanja razumemo število vdihov v časovni enoti (eni minuti). Na dihanje vplivajo številni zunanji in notranji dejavniki (npr. velikost telesa, starost, fizični napor, razburjenje, temperatura okolja, napolnjenost prebavnega trakta, vročinska stanja), ki povzročajo znatna nihanja v frekvenci dihanja določenega osebk.

Frekvenco dihanja najlaže ugotavljamo z opazovanjem in istočasno palpacijo prsnega koša ali trebuha z dlanjo ter štetjem števila vdihov (ali izdihov) v eni minuti. Ugotavljamo jo lahko tudi s pnevmografom.

Tabela 3.1: Frekvence dihanja pri nekaterih vrstah domačih živali in pri človeku

Vrsta	Frekvenca [vdihi/min]
konj	8–16
govedo	10–30
ovca, koza	12–20
prašič	8–18
pes	10–30
mačka	20–30
budra	10–50
kokoš	40–50
človek	15–20

3.2 MERJENJE PLJUČNIH VOLUMNOV IN KAPACITET

Metoda, s katero se merijo pljučni volumni in kapacitete, je **spirometrija**, naprava za merjenje pa se imenuje **spirometer**. Merjenje je lahko statično ali dinamično. Pri statičnem merjenju se določa končna velikost (volumen) izdiha, ne upošteva pa se hitrost, s katero se izdih odvija. S statičnim merjenjem lahko izmerimo naslednje pljučne volumne in kapacitete:

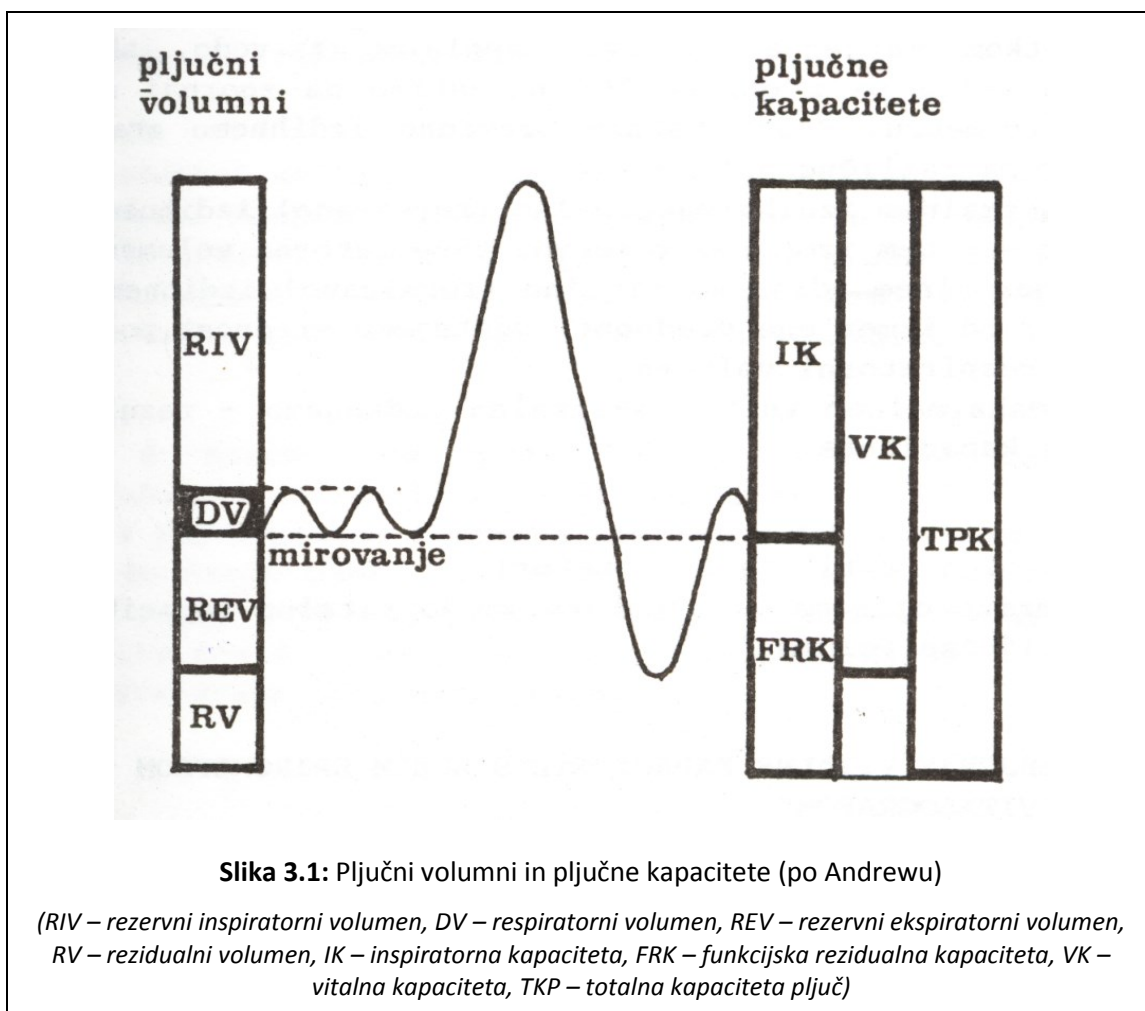
- **Respiratorni volumen** je količina zraka, ki se vdihne pri normalnem, mirnem vdihu ali izdihne pri normalnem izdihu. Vrednost pri konju je 6 L, pri ovci in kozi 300 ml, pri govedu 4 L in pri človeku 500 ml.
- **Rezervni inspiratorni volumen** (dopolnilni zrak) je volumen zraka, ki ga po normalnem vdihu še lahko vdihnemo z maksimalnim vdihom. Vrednost pri konju je 12 L, pri človeku pa 3 L.
- **Rezervni ekspiratorni volumen** (rezervni zrak) je volumen zraka, ki ga po normalnem izdihu še lahko izdihnemo s forsiranim, maksimalnim izdihom. Vrednost pri konju je 12 L, pri človeku pa 1 L.
- **Vitalna kapaciteta** je volumen zraka, ki ga žival (človek) lahko iztisne iz pljuč z maksimalnim izdihom, ki sledi maksimalnemu vdihu. Vitalna kapaciteta je vsota respiratornega volumna,

rezervnega inspiratornega volumna in rezervnega ekspiratornega volumna.

- **Inspiracijska kapaciteta** je maksimalna količina zraka, ki se lahko vdihne po normalnem izdihu. Je vsota rezervnega inspiratornega volumna in respiratornega volumna.

Če zrak še tako intenzivno izdihnemo, pa določenega volumna ne moremo iztisniti iz pljuč in zato tudi ne izmeriti s spirometrijo. Volumen tega zraka pa lahko določimo z nekaterimi drugimi metodami, npr. z redčenjem helija ali z metodo izpiranja dušika. K tem volumnom oziroma kapacitetam štejemo rezidualni volumen in funkcijsko rezidualno kapaciteto.

- **Rezidualni volumen** je količina zraka, ki ostane v pljučih tudi po najglobljem izdihu. Vrednost pri konju znaša 12 L, pri človeku pa 1,2 do 1,6 L (pri ženski približno 25 % vitalne kapacitete, pri moškem pa 33 %).
- **Funkcijska rezidualna kapaciteta** je količina zraka, ki ostane v pljučih po normalnem izdihu. Je vsota rezervnega ekspiratornega volumna in rezidualnega volumna.
- **Totalna kapaciteta pljuč** pa je količina zraka, ki jo vsebujejo pljuča po maksimalnem vdihu. Je vsota vseh štirih pljučnih volumnov.



3.2.1 Merjenje vitalne kapacitete s spirometrom po Hutchinsonu

Spirometer po Hutchinsonu sestavlja kovinski cilindar, napolnjen z vodo, v katerega je vstavljen oziroma potopljen nekoliko manjši kovinski cilindar s skalo (*graduacija*) v mililitrih. Na vrhu tega je odprtina, ki je z gumijasto cevjo povezana z ustnikom, skozi katerega se vpihava zrak v spirometer. Ob tem se graduirani valj dviga iz vode in na skali lahko neposredno odčitamo količino izdihanega zraka.

Vitalna kapaciteta ljudi je odvisna od položaja telesa v času merjenja, moči dihalnih mišic in raztegljivosti pljuč ter stene prsnega koša. Pri mladih moških je v povprečju 4,6 L, pri ženskah pa 3,1 L. Rezidualni volumen znaša pri ženskah približno 25 % vitalne kapacitete, pri moških pa 33 %.

a) Postopek:

1. Pred začetkom merjenja napravo napolnimo z vodo, skalo notranjega valja pa z oznako "0" namestimo na zgornji nivo vode v spirometru. Skozi ustnik previdno izdihnemo zrak v spirometer na različne načine.
2. Po normalnem izdihu maksimalno (forsirano) izdihnemo v spirometer – s tem izmerimo rezervni ekspiratorni volumen.
3. Po normalnem vdihu maksimalno (forsirano) izdihnemo v spirometer; od izmerjene vrednosti odštejemo vrednost pod 1. in dobimo respiratorni volumen.
4. Po maksimalnem vdihu maksimalno izdihnemo – rezultat je vitalna kapaciteta.

b) Naloge:

1. Shematično narišite spirometer!
2. Izmerite oziroma izračunajte svojo vitalno kapaciteto in druge pljučne volumne!

3.2.2 Merjenje vitalne kapacitete pljuč s suhim spirometrom (*vitalografom*)

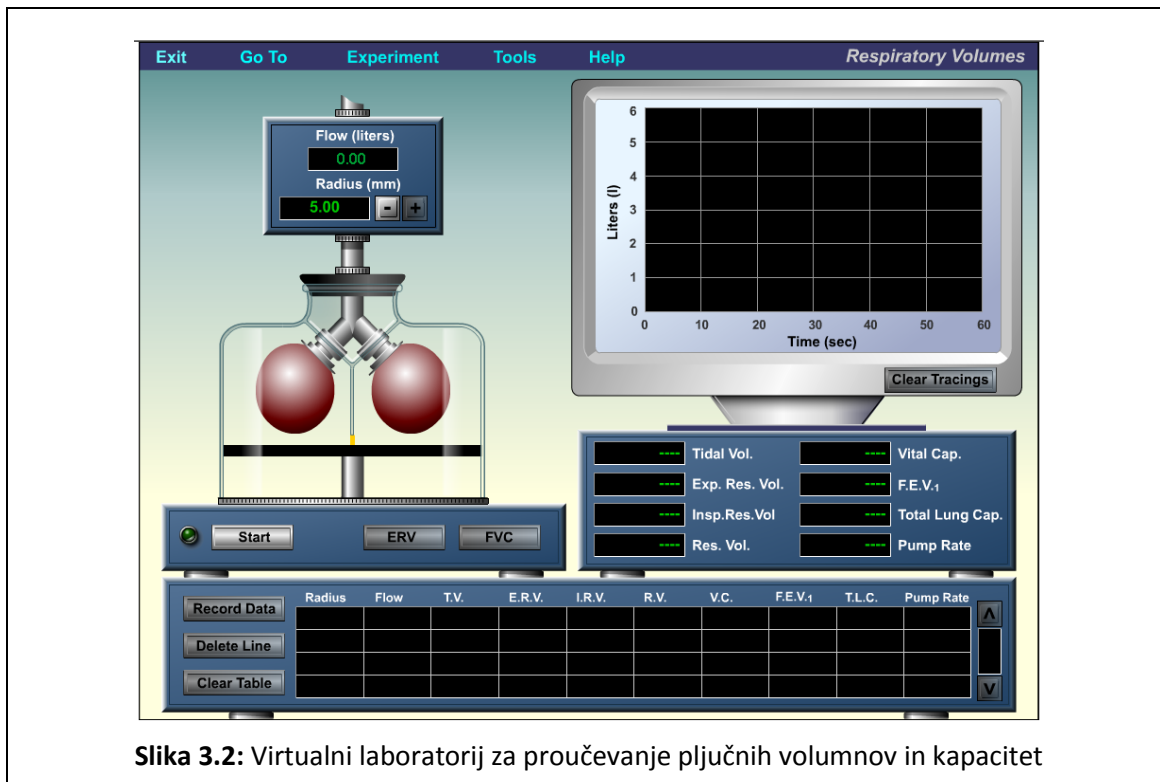
Za merjenje pljučnih volumnov in kapacitet lahko uporabljamo tudi t. i. suhi spirometer. Osnovni sestavni del suhega spirometra je gumijasta vreča, ki je na eni strani vezana na cev za dihanje, po drugi strani pa z napravo za registriranje. Poskusna oseba vdihuje zrak v gumijasti rezervoar, ki se razteza in premika pisalo po papirju za registracijo.

3.2.3 Prikaz merjenja pljučnih volumnov in kapacitet

Merjenje pljučnih volumnov in kapacitet lahko prikažemo tudi z računalniško simulacijo PhysioEx. Računalniška simulacija prikazuje osnovne mehanske funkcije respiratornega sistema. Po zagonu programa v glavnem meniju izberemo ukaz **Mehanika respiratornega sistema (*Respiratory System Mechanics*)**.

V virtualnem laboratoriju (slika 3.2) je v steklenem valju na levi strani ekrana model pljuč, na desni strani osciloskop s prikazom rezultatov, na dnu pa enota za shranjevanje podatkov. Gumijasta diafragma zapira dno steklenega valja in je nameščena na ročico črpalke pod valjem. Ročica dviga in spušča diafragma, pri čemer vsesava in iztiska atmosferski zrak. Pregrada med obema kriloma pljuč deli valj na dve ločeni polovici. Model pljuč je povezan s cevjo za zrak, katere premer se lahko spreminja z izbiranjem oznak (+) ali (–) pod oznako **Polmer (*Radius (mm)*)**. Pretok vdihanega oz. izdihanega zraka je prikazan pod oznako **Flow (*liters*)**.

Z ukazom **Start** pod steklenim valjem se prične meritev, med katero model pljuč »dih« z normalnim dihalnim volumnom. Zapis dihanja je prikazan na ekranu osciloskopa. Ukaza **ERV** (ekspiratorni rezervni volumen) in **FVC** (forsirana vitalna kapaciteta) pa omogočata izvedbo meritev različnih pljučnih volumnov in kapacitet, ki so ob koncu meritve prikazane v okencih pod osciloskopom. Z ukazom **Zapiši rezultate (Record Data)** se vsi podatki za posamezno meritev izpišejo na tabeli enote za shranjevanje podatkov. Podatke lahko v celoti izbrišemo (**Clear Table**) ali pa izbrišemo samo posamezne vrstice tabele (**Delete Line**).



Slika 3.2: Virtualni laboratorij za proučevanje pljučnih volumnov in kapacitet

a) Postopek:

1. Z izbiro (+) ali (-) nastavimo polmer cevi za zrak na 5 mm.
2. Z ukazom **Start** poženemo model, ki začne »dihati« zaradi premikov diafragme. Dihalni gibi pljuč se zapisujejo na ekranu osciloskopa. Na prikazu pretoka zraka nad modelom lahko opazujemo dihalni volumen. V prikazu rezultatov (pod osciloskopom) pa vidimo povprečni dihalni volumen in število vdihov (izdihov) na minuto (**Pump Rate**).
3. Z ukazom **Clear Tracing** izbrišemo zapis na osciloskopu.
4. Ponovno izberemo ukaz **Start**, nato pa čez nekaj sekund pritisnemo tipko **ERV** pod valjem, čez 2 sekundi pa še tipko **FVC**, da zaključimo meritve dihalnih volumnov. Ekspiratorni rezervni volumen, inspiratorni rezervni volumen in rezidualni volumen bodo avtomatsko izračunani in prikazani pod osciloskopom.
5. Rezultate meritev vnesemo v spodnjo tabelo.

TV:	ERV:	IRV:	RV:
VK:	TLC:	mRV:	

b) Naloge:

Na osnovi rezultatov meritev izračunajte vitalno kapaciteto pljuč, totalno pljučno kapaciteto in minutni respiratorni volumen (mRV); rezultate vnesite v tabelo!

3.3 VLOGA INTRAPLEVRALNEGA TLAKA IN SURFAKTANTA PRI MEHANIZMU PLJUČNE VENTILACIJE

Pljuča so elastičen organ, ki se širi in krči pod vplivom atmosferskega tlaka in negativnega tlaka v plevralni votlini, med porebrnico in popljučnico (intraplevralni tlak). Ta je manjši kot tlak v alveolih in je posledica tendence pljuč, da se zaradi svoje elastičnosti in površinske napetosti alveolarne tekočine sesedejo (kolabirajo), kar vleče pljuča od stene prsnega koša in na ta način v interplevralnem prostoru ustvarja podtlak. Zaradi tega podtlaka se pljuča prilegajo stenam prsnega koša in med dihanjem pasivno spreminjajo svoj volumen. Skupna tendenca pljuč, da bi se ločila od stene prsnega koša, je merilo velikosti intraplevralnega tlaka. Normalna vrednost je 4 mm Hg, ob globokem vdihu pa 9 do 12 mm Hg. Ker je tlak v interplevralnem prostoru nižji od atmosferskega, vsaka odprtina, ki nastane v steni prsnega koša, povzroči, da se intraplevralni tlak izenači z atmosferskim. Stanje imenujemo **pnevmotoraks**. Zaradi tega pljuča kolabirajo (*atelektaza*).

Na stiku tekočine in plina se molekule tekočine med seboj privlačijo močneje kot z molekulami plina, kar na površini tekočine povzroča nastanek površinske napetosti. Ker se površinska napetost upira silam, ki težijo k povečanju površine, deluje tako, da zmanjšuje velikost votlin, kot so npr. alveoli. Če bi bili alveoli prevlečeni z vodo, bi bilo polnjenje pljuč z zrakom zelo težko, če že ne nemogoče. Vendar pa vodna plast, ki pokriva površino alveol, vsebuje **surfaktant** (lipoprotein, podoben detergentu), ki zmanjšuje površinsko napetost z zmanjševanjem privlačnih sil med vodnimi molekulami.

3.3.1 Prikaz mehanizma pljučne ventilacije z Dondersonovim modelom

Mehanizem pljučne ventilacije na enostaven način lahko ponazorimo z **Dondersonovim modelom**. To je steklenica, ki ima namesto dna gumijasto opno, zamašena pa je z gumijastim zamaškom, skozi katerega je nameščena steklena cevka. Na to cevko namestimo sapnik z nepoškodovanimi pljuči kunca.

a) Postopek:

- S prsti premikamo gumijasto opno navzgor in navzdol in opazujemo spremembe oblike in velikosti pljuč.

b) Naloge:

1. Narišite shemo Dondersonovega modela!
2. Razložite spremembe, ki nastanejo ob dviganju in spuščanju gumijaste opne in jih primerjajte s spremembami v prsni votlini ob dihanju!

3.3.2 Prikaz dejavnikov, ki vplivajo na dihanje

Vlogo intraplevralnega tlaka in surfaktanta lahko prikažemo z računalniško simulacijo programa PhysioEx. Iz menija programa izberemo poglavje **Dejavniki, ki vplivajo na dihanje (Factors Affecting Respiration)**. Virtualni laboratorij je podoben kot pri prejšnji seriji poskusov (slika 3.2). Dodatno so v njem razpršilec surfaktanta nad steklenim valjem in ventili na vsaki strani valja. Z ukazom **Surfactant** v model pljuč razpršimo določeno količina surfaktanta, z ukazom **Izpiranje (Flush)** pa se surfaktant odstrani. Ob pritisku na ventil se ta odpre in tlak znotraj polovice valja se izenači z atmosferskim. Z ukazom **Reset** nad modelom ventila zapremo. Rezultati poskusov so prikazani pod osciloskopom, z izbiro ukaza **Record Data** pa se shranijo v tabelo na dnu ekrana. Na modelu dihal je interperitonealni prostor področje med stenami valja in modelom pljuč. Razlike v tlakih med vdihom in izdihom so za levo in desno polovico modela prikazane ločeno.

A) Opazovanje intraplevralnega tlaka

a) Postopek:

1. Z ukazom **Clear Tracing** izbrišemo predhodni zapis z ekrana osciloskopa, z ukazom **Flush** pa izperemo surfaktant iz pljuč.
2. Polmer zračne cevke nastavimo na 5 mm (z izbiro **(+)** oz. **(-)**).
3. Z ukazom **Start** poženemo model in zapišemo normalno dihanje. Po končani meritvi zapišemo izmerjene vrednosti.
4. S pritiskom na oznako **Valve Closed** na levi strani valja odpremo levi ventil in z ukazom **Start** poženemo simulacijo. Po končani meritvi zapišemo rezultate v spodnji tabeli.
5. Odprti ventil zapremo (s pritiskom na oznako **Valve Open**) in z ukazom **Start** poženemo novo meritev in zapišemo rezultate.
6. Z ukazom **Reset** (nad valjem) odstranimo zrak iz intraplevralnega prostora in poženemo naslednjo simulacijo (**Start**) in zapišemo rezultate.

Meritev	Tlak		Pretok zraka		
	levo	desno	levo	desno	skupaj
normalno dihanje					
pnevmotoraks					
zaprt pnevmotoraks					
normalno dihanje					

b) Naloge:

1. Na osnovi opazovanja obnašanja modela in rezultatov meritev odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kaj se zgodi s pljuči v levi polovici valja po odprtju ventila?
 - Kako se tlak v levi polovici pljuč razlikuje od tistega v desni? Razložite!
 - Kako se pretok zraka v levi polovici pljuč razlikuje od tistega v desni, zakaj nastane razlika?
 - Kaj bi se zgodilo, če pljučni krili ne bi bili ločeni s pregrado?
 - Ali so se kolabirana pljuča odzivala na gibe diafragme? Razložite!
 - Zakaj so se kolabirana pljuča v levi polovici valja povrnila v prvotno stanje, ko smo izbrali ukaz **Reset**?

B) Prikaz vpliva surfaktanta

Iz menija programa izberemo poglavje **Dejavniki, ki vplivajo na dihanje** (*Factors Affecting Respiration*). Virtualni laboratorij (slika 3.2) je podoben kot pri prejšnji seriji poskusov. Dodatno so v njem razpršilec surfaktanta nad steklenim valjem in ventili na vsaki strani valja. Z ukazom **Surfactant** povzročimo, da se v model pljuč razprši določena količina surfaktanta, z ukazom **Izpiranje** (*Flush*) pa se surfaktant odstrani. Ob pritisku na ventil se ta odpre in tlak znotraj polovice valja se izenači z atmosferskim. Z ukazom **Reset** nad modelom ventila zapremo. Rezultati poskusov so prikazani pod osciloskopom, z izbiro ukaza **Record Data** pa se shranijo.

Meritev	Frekvenca dihanja (n/min)	Tlak		Pretok zraka		
		levo	desno	levo	desno	skupaj
brez surfaktanta						
z dodatkom surfaktanta						

a) Postopek:

1. S tipkama **(+)** oz. **(-)** nad modelom pljuč uravnamo polmer zračne cevi na 5 mm.
2. Izvedemo osnovno meritev (**Start**) in zapišemo rezultate v spodnjo tabelo.
3. Dvakrat zapored izberemo ukaz **Surfactant**. Z ukazom **Start** ponovimo meritev in zapišemo rezultate.

b) Naloge:

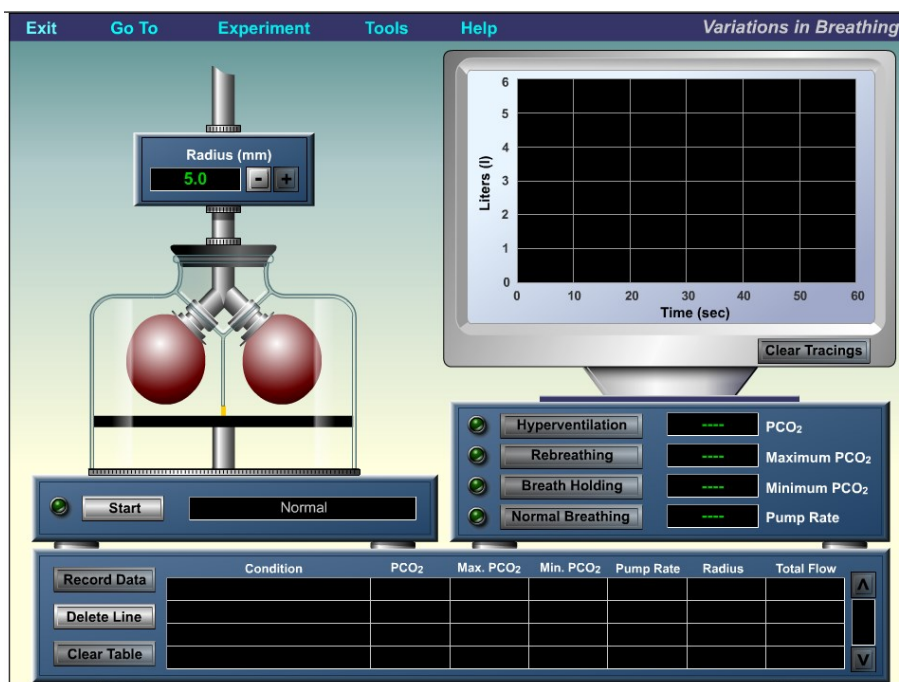
1. Kako se je zapis ob uporabi surfaktanta razlikoval od osnovnega zapisa delovanja pljuč?

3.4 NADZOR IN URAVNAVANJE DIHANJA

Hitrost in globina dihanja se prilagajata potrebam organizma po kisiku, urejajo pa ju parcialni tlak ogljikovega dioksida (P_{CO_2}) in kisika (P_{O_2}) ter pH krvi. Kemoreceptorji v možganih se aktivirajo ob dvigu P_{CO_2} v cerebrospinalni tekočini in vzdražijo center za dihanje, kar povzroči povečanje frekvence in globine dihanja, to pa vodi k povečanju alveolarne ventilacije in odstranjevanju CO_2 iz krvi. Periferni kemoreceptorji (v aorti in *a. carotis*) pa odgovarjajo na spremembe v P_{O_2} in pH krvi.

3.4.1 Prikaz učinkov različnih načinov dihanja na raven CO_2

Učinek različnih načinov dihanja na P_{CO_2} v krvi lahko prikažemo z računalniško simulacijo PhysioEx. V meniju poskusa izberemo poglavje **Spremembe dihanja** (*Variations in Breathing*). Osnovni elementi, ki se prikažejo na ekranu, so enaki kot pri prvi seriji poskusov, pod osciloskopom pa se nahajajo ukazi za izbiro različnih vzorcev dihanja (slika 3.3). Ukaz Hiperventilacija (*Hyperventilation*) povzroči, da pljuča dihajo hitreje kot normalno. Majhna vrečka samodejno prekrije cevko za dovod zraka, če izberemo ukaz **Predihavanje** (*Rebreathing*). Ukaz **Zadrževanje dihanja** (*Breathe Holding*) ustavi dihanje. Ukaz **Normalno dihanje** (*Normal Breathing*) pa v vsakem trenutku omogoči normalno dihanje. Prikazi pod osciloskopom kažejo parcialni tlak CO_2 v zraku, ki se nahaja v pljučih, maksimalni in minimalni parcialni tlak CO_2 in frekvenco dihanja. Podatke, ki jih zberemo med poskusom, shranimo v tabelo na dnu ekrana z ukazom **Record Data**.



Slika 3.3: Virtualni laboratorij za prikaz učinkov dihanja na raven CO_2

A) Hiperventilacija

Pri tem načinu dihanja sta frekvenca dihanja in s tem alveolarna ventilacija večji od potreb organizma.

a) Postopek:

1. Z izbiro oznak **(+)** oz. **(-)** uravnamo premer dovodne cevke na 5 mm.
2. Z ukazom **Start** poženemo meritev. Ukaz na tipki se spremeni v **Stop**, ki omogoča, da dihanje lahko kadarkoli ustavimo. Po končani meritvi shranimo parametre normalnega dihanja (**Record Data**) in izbrišemo zapis na osciloskopu.
3. Ponovno poženemo meritev in po nekaj sekundah izberemo ukaz **Hyperventilation**. Opazujemo prikaz P_{CO_2} in vzorec dihanja.
4. Z ukazom **Stop** ustavimo registracijo, preden zapis pride do konca ekrana osciloskopa, in zapišemo rezultate v tabelo.

Način dihanja	P_{CO_2}	Frekvenca dihanja	Pretok zraka
normalno dihanje			
hiperventilacija			
ponovno vdihavanje			
zadrževanje dihanja			

b) Naloge:

- Razložite, kaj se zgodi s P_{CO_2} med hiperventilacijo?

B) Ponovno vdihovanje

Pri tem načinu dihanja se ponovno vdihuje zrak, ki je bil izdihjen, zato se P_{CO_2} poveča.

a) Postopek:

1. Izberemo ukaz **Start** in po 2 sekundah še ukaz **Rebreathing**. Ob tem se nad cevjo za dovod zraka samodejno namesti balon, ki omogoča, da se iz pljuč izdihani zrak ponovno vrača v model.
2. Opazujemo vzorec dihanja na osciloskopu in P_{CO_2} med poskusom. Ko zapis pride do konca ekrana osciloskopa, z ukazom **Stop** ustavimo poskus.
3. Rezultate meritve zapišemo v tabelo pri poskusu A.

b) Naloge:

1. Kaj se dogaja s P_{CO_2} med poskusom?
2. Ali se globina in vzorec dihanja spreminjata?

C) Zadrževanje dihanja

Zadrževanje dihanja je ekstremna oblika prejšnjega poskusa, pri čemer ni izmenjave zraka med pljuči in zunanjo atmosfero.

a) Postopek:

1. Izberemo ukaz **Start** in po 2 sekundah še ukaz **Breath Holding**.
2. Počakamo približno 5 sekund, nato pa izberemo ukaz **Normal Breathing**. Opazujemo vzorec

dihanja na osciloskopu in P_{CO_2} med poskusom. Ko zapis pride do konca ekrana osciloskopa, z ukazom **Stop** ustavimo poskus.

3. Rezultate meritve zapišemo v tabelo pri poskusu A.

b) Naloge:

1. Kaj se dogaja s P_{CO_2} med zadrževanjem dihanja?
2. Kaj se zgodi z vzorcem dihanja, ko se začne normalno dihanje?

3.4.2 Vplivi na dihanje pri človeku

Med fizičnim naporom in drugimi fiziološkimi stanji, ki povečajo metabolično aktivnost organizma, mora respiratorni sistem tkiva oskrbeti z zadostno količino O_2 in odstraniti iz tkiv povečane količine CO_2 . Dihalni center v podaljšani hrbtenjači in mostu uravnava stopnjo ventilacije v skladu s potrebami telesa, tako da se P_{O_2} in P_{CO_2} le malo spreminjata tudi med intenzivnim delom ali drugimi tipi respiratornega stresa. Na dihanje vplivajo tudi zunanji (periferni) kemoreceptorji v karotidnem sinusu. Ti so občutljivi na kemične spremembe v krvi (P_{O_2} , P_{CO_2} , pH krvi) in prevajajo impulze v dihalni center ter na ta način pomagajo uravnovati respiratorno aktivnost. Porast P_{CO_2} , padec pH krvi ali P_{O_2} z vzdraženjem kemoreceptorjev in dihalnega centra pospešijo pljučno predihavanje.

a) Ekipa:

- poskusna oseba, merilec dihanja, časomerilec, zapisnikar.

b) Pripomočki:

- štoparica ali ura s sekundnim kazalcem.

c) Postopek:

- Frekvenca dihanja:

1. Z opazovanjem dviganja in spuščanja prsnega koša določite frekvenco dihanja pri poskusni osebi, ki mirno sedi.
2. Meritve izvedite trikrat zapored z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v tabelo!
3. Rezultate uporabite za primerjavo z rezultati naslednjih meritev!

- Hiperventilacija in apnea

1. Poskusna oseba naj z odprtimi usti globoko diha 2 minuti (hiperventilacija).
2. Ugotovite spremembo frekvenca dihanja po končani hiperventilaciji!
3. Meritev izvedite trikrat zapored z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v tabelo!

- Hipoventilacija

1. Poskusna oseba naj si na obraz namesti papirnato vrečko in z odprtimi usti 2 minuti diha vanjo.
2. Ugotovite spremembo frekvenca dihanja po končanem postopku!
3. Meritev izvedite trikrat z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v tabelo!

- Zadrževanje dihanja

1. Poskusna oseba naj s prsti stisne nosnice in zadrži dihanje za 0,5 do ene minute. Takoj nato ugotovite frekvenco dihanja!
2. Meritev izvedite trikrat z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v tabelo!

- Čas zadrževanja dihanja po normalnem dihanju

1. Poskusna oseba naj mirno sedi in normalno diha 2 do 3 minute. Nato naj s prsti stisne nosnice in zadržuje dihanje tako dolgo, kot zmore.

2. Izmerite čas zadrževanja dihanja! Meritev izvedite trikrat z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v spodnjo tabelo!

- Čas zadrževanja dihanja po pospešenem dihanju

1. Poskusna oseba naj 2 minuti globoko diha z odprtimi usti. Nato naj **takoj** s prsti stisne nosnice in zadrži dihanje tako dolgo, kot zmore.
2. Meritev izvedite trikrat z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v tabelo!

- Čas zadrževanja dihanja po telesni vadbi

1. Poskusna oseba naj 2 minuti teče na mestu ali izvaja počepe.
2. Takoj po končani vadbi naj s prsti stisne nosnice in zadrži dihanje tako dolgo, kot zmore. Izmerite čas zadrževanja dihanja!
3. Meritev izvedite trikrat z enominutnimi presledki in vnesite rezultate v tabelo!

	1. meritev	2. meritev	3. meritev	Povprečje
Frekvenca dihanja				
Hiperventilacija in apnea				
Hipoventilacija				
Zadrževanje dihanja				
Čas zadrževanja dihanja po normalnem dihanju				
Čas zadrževanja dihanja po pospešenem dihanju				
Čas zadrževanja dihanja po telesni vadbi				

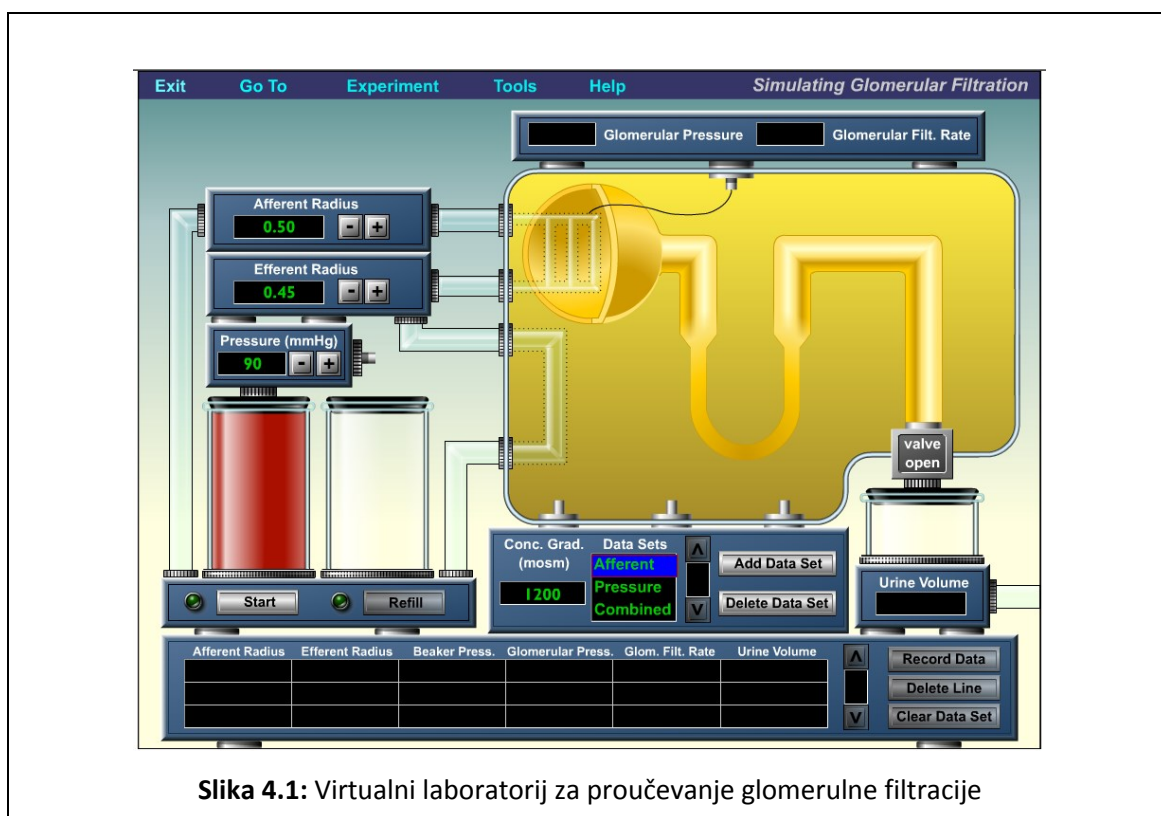
4 FIZIOLOGIJA LEDVIC

Produkte metabolizma iz organizma izločajo različni organi, med katerimi so najpomembnejše ledvice. Vsako ledvico sestavlja več milijonov nefronov, ki so osnovne funkcionalne enote ledvic.

Pri nastajanju urina v nefronu potekajo glomerulna filtracija, reabsorpcija in sekrecija. Glomerularna filtracija je pasiven proces, pri katerem ob prehodu tekočine iz lumna glomerularnih kapilar v Bowmanovo kapsulo nastane primarni urin, iz tega pa med procesi reabsorpcije in sekrecije v ledvičnih kanalčkih nastane sekundarni (definitivni) urin. Iz kanalčkov reabsorbirane snovi prehajajo v medcelični prostor in se vračajo v krvni obtok po peritubularnih kapilarah, ki obdajajo ledvične kanalčke. Peritubularne kapilare izhajajo iz eferentnih arteriol in se izlivajo v vene, ki zapuščajo ledvice.

4.1 PRIKAZ GLOMERULNE FILTRACIJE

Računalniška simulacija omogoča prikaz delovanja ledvic na modelu nefrona. Principi glomerulne filtracije, ki jih spoznamo ob študiju modela, služijo za razumevanje delovanja ledvic kot celote.



Iz glavnega menija izberemo ukaz **Fiziologija ledvic (Renal System Physiology)**, ki odpre virtualni laboratorij za proučevanje glomerulne filtracije (slika 4.1). Glavni elementi virtualnega laboratorija so enota za oskrbo s krvjo (na levi), model nefrona znotraj rezervoarja (na desni) s kontrolno enoto pod njim ter enota za zapisovanje rezultatov (na dnu ekrana). Levi valj predstavlja telesni krvni obtok, ki oskrbuje nefron. Tlak krvi v valju lahko uravnavamo z izbiro oznak nad valjem (**Pressure (+)** ali **(-)**). Zgornja cevka z nastavljenim polmerom, ki predstavlja aferentno arteriolo, povezuje levi valj z modelom glomerula. Druga cevka z nastavljenim polmerom pa predstavlja

eferentno arteriolo in izhaja iz glomerula. Iz nefrona izhaja večkrat zavita cevka, ki predstavlja ledvični kanalček. Po njej teče filtrat v zbirno posodico (na spodnjem desnem delu ekrana).

Nad modelom nefrona sta prikaz glomerulnega tlaka (**Glomerular Pressure**) in stopnje glomerulne filtracije (**Glomerular Filtr. Rate**). Model nefrona je v kopeli s koncentracijsko razliko 1200 mosm. Ukaz **Start** požene poskus, ukaz **Refill** pa ponovno napolni valj s krvjo. Podatke, ki jih dobimo ob meritvah, lahko shranimo v podatkovni enoti (**Record Data**).

4.1.1 Učinek premera žil na glomerulno filtracijo

Poskus prikazuje vpliv premera aferentne in eferentne arteriole na stopnjo glomerulne filtracije, t. j. količine tekočine, ki se prefiltrira skozi Bowmanovo kapsulo v časovni enoti.

a) Postopek:

1. Na kontrolni enoti izberemo ukaz **Afferent**. Kontrolna enota bo zapisovala stopnjo sprememb zaradi spreminjanja premera aferentne cevke.
2. Polmer aferentne cevke nastavimo na 0,30 mm, polmer eferentne pa na 0,40 mm. Tlak v posodi naj bo 90 mm Hg.
3. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Med poskusom vidimo tok tekočine skozi nefron in zbirni kanalček v zbirno posodo. Po končanem poskusu na zgornjem prikazu odčitamo stopnjo glomerularne filtracije in zapišemo rezultate v tabelo.
4. Z ukazom **Refill** ponovno napolnimo levi valj in s tem pripravimo model za naslednji poskus.
5. V nadaljevanju postopoma (za 0,1 mm) povečujemo polmer aferentne cevke in vsakokrat ponovimo celotno meritev (stopnje 3 do 4). Rezultate zapišemo.

Meritev	1	2	3
polmer aferentne cevke [mm]			
polmer eferentne cevke [mm]			
tlak v čaši [mm Hg]			
glomerulni tlak [mm Hg]			
stopnja glomerulne filtracije			
volumen primarnega urina [ml]			

b) Naloge:

Odgovorite na spodnji vprašanji:

- Kaj se zgodi s stopnjo glomerulne filtracije, ko povečujemo polmer aferentne cevke?
- Kako bi na stopnjo glomerulne filtracije vplivalo povečanje ali zmanjšanje polmera eferentne cevke?

4.1.2 Učinek tlaka na glomerulno filtracijo

Krvni tlak v žilah, ki oskrbujejo glomerul, in tlak v ledvičnih cevkah vplivata na stopnjo glomerularne filtracije. Poskus prikazuje spreminjanje stopnje glomerulne filtracije glede na spremembe krvnega tlaka.

a) Postopek:

1. Na kontrolni enoti izberemo oznako **Pressure** (oznaka se obarva modro).
2. Polmer aferentne cevke nastavimo na 0,5 mm in eferentne na 0,4 mm. Polmerov cevk med poskusom ne spreminjajmo.
3. Tlak v levi čaši naravnamo na 80 mm (z izbiro oznak **(+)** in **(-)**).
4. Z ukazom **Start** poženemo poskus in zapišemo izmerjene parametre v spodnji tabeli.
5. Tlak v levem valju postopoma povečujemo za 10 mm Hg, dokler ne dosežemo vrednosti 100 mm Hg. Ob vsakem povečanju tlaka ponovimo poskus in shranimo rezultate.

Meritev	1	2	3
tlak v čaši [mm Hg]			
glomerulni tlak [mm Hg]			
stopnja glomerulne filtracije			
volumen urina [ml]			

b) Naloge:

Odgovorite na spodnji vprašanji:

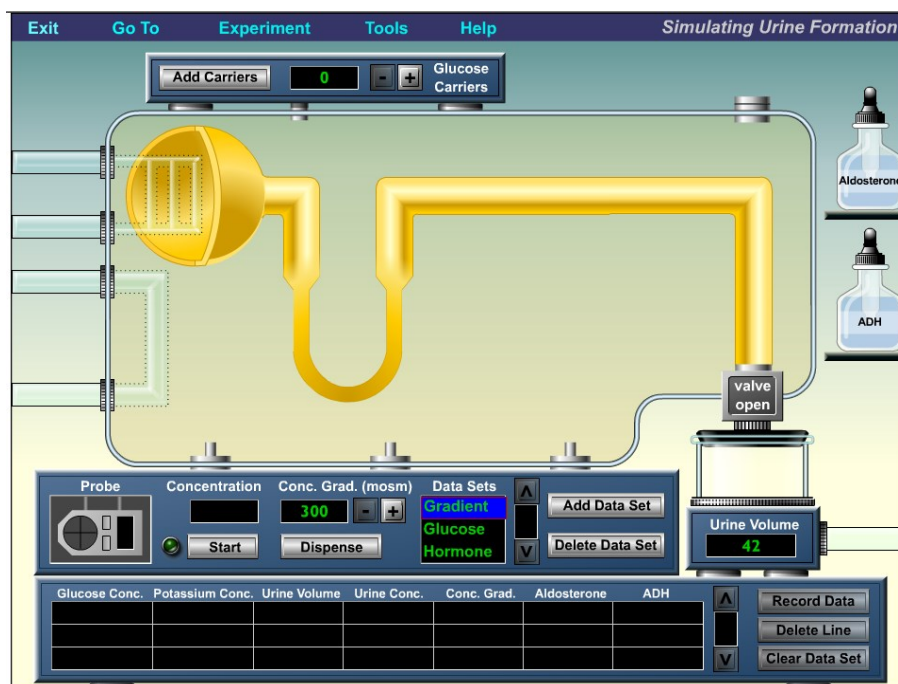
- Kaj se zgodi s stopnjo glomerulne filtracije, ko narašča tlak v čaši?
- Kako bi spreminjanje polmera aferentne in eferentne cevke vplivalo na stopnjo glomerulne filtracije?

4.2 PRIKAZ NASTAJANJA KONČNEGA (DEFINITIVNEGA) URINA

Z računalniško simulacijo PhysioEx lahko proučujemo vplive spreminjanja koncentracije peritubularne tekočine na nastajanje urina. Prikažemo lahko tudi vplive hormonov (aldosterona in ADH) ter vlogo glukoznih nosilcev pri tem procesu.

V glavnem meniju programa izberemo poglavje **Simulacija tvorbe urina (Simulating Urine Formation)**. Virtualni laboratorij (slika 4.2) je podoben kot v prejšnji seriji poskusov, le da v njem ni enote za uravnavanje krvnega tlaka (ker je pri teh poskusih ne potrebujemo). Dodatno je v virtualnem laboratoriju polička z raztopinama aldosterona in ADH (na desni strani ekrana). Nad modelom nefrona je enota za dodajanje glukoznih nosilcev, spodaj levo pa analizador sestave urina (**Probe**).

Koncentracijo v kopeli okoli nefrona uravnavamo z oznakama **(+)** oz. **(-)** ob prikazu koncentracije na kontrolni enoti modela. Z ukazom **Dispense** skozi šobe na dnu napolnimo tank z izbrano raztopino. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Po končanem poskusu lahko vzorec raztopine iz tanka analiziramo (**Probe**). Hormone apliciramo tako, da potegnemo pokrovček stekleničke do odprtine na kopeli (zgoraj desno). Tipki **(+)** in **(-)** na kontroli glukoznih nosilcev omogočata uravnavanje števila glukoznih nosilcev, ki se vgradijo v simulirani proksimalni zaviti tubul z ukazom **Add Carriers**. Podatki, izpisani v prikazu rezultatov, so odvisni od poskusa, ki ga izvajamo, in jih lahko shranimo (**Record Data**).



Slika 4.2: Virtualni laboratorij za prikaz nastajanja urina

4.2.1 Vpliv koncentracijske razlike na sestavo definitivnega urina

Med nastajanjem urina topljenci in voda prehajajo iz lumna nefrona v peritubularni prostor. Pasivni transport topljencev in vode iz lumna ledvičnih cevk je delno odvisen od koncentracijske razlike v okolici nefrona. Če je nefron prepusten za topljence ali vodo, se bo ustvarilo ravnotežje med peritubularno tekočino in vsebino nefrona.

Antidiuretični hormon (ADH) poveča prepustnost distalnih zavrtih cevk in zbirnih cevk za vodo, tako da prehaja voda na področja z večjo koncentracijo topljencev (običajno iz lumna nefrona v peritubularno področje). Pri tem poskusu bomo proučevali procese pasivne reabsorpcije.

a) Postopek:

1. V oknu za vnos podatkov (**Data Set**) izberemo oznako **Razlika (Gradient)** (izbrani parameter se obarva modro).
2. Pokrovček s kapalko stekleničke z ADH premaknemo nad odprtino kopeli; ADH se veže na zbirno cevko (okolica cevke se obarva zeleno).
3. Koncentracijski gradient uravnamo z izbiro oznak **(+)** oz. **(-)** na 300 mosm in izberemo ukaz **Dispense** pod prikazom osmolarnosti.
4. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Filtrat se bo pomikal skozi nefron in zbiral v čaši pod koncem zbirnega kanalčka.
5. Med potekom poskusa opazujemo prikaz **Probe**. Ko se sonda obarva rdeče, jo premaknemo v čašo za zbiranje urina. Na ta način izmerimo koncentracijo topljencev v urinu, ki se pokaže v prikazu **Concentration**.
6. Po koncu poskusa shranimo rezultate z ukazom **Record Data** in jih zapišemo v tabelo.
7. V nadaljevanju ponavljamo poskus (stopnje 2 do 6) tako, da postopoma (za 300 mosm) povečujemo koncentracijski gradient do 1200 mosm.

Meritev	1	2	3
konc. razlika [mosm]			
koncentracija glukoze [mg/100 ml]			
koncentracija kalija [mg/100 ml]			
volumen urina [ml]			
osmotski tlak urina [mosm]			

b) Naloge:

- Kaj se je zgodilo s koncentracijo urina, ko je koncentracijski gradient naraščal?

4.2.2 Učinek glukoznih nosilcev na reabsorpcijo glukoze

Ker so za transport glukoze iz lumna nefrona v intersticijski prostor potrebni glukozni nosilci, je količina reabsorbirane glukoze omejena. Če je glukoza vezana na vse nosilce, ki so na voljo, se višek glukoze izloča v urin. V tem poskusu bomo prikazali učinek spreminjanja količine glukoznih nosilcev v proksimalnih zavrtih kanalčkih na reabsorpcijo glukoze.

a) Postopek:

1. V oknu za vnos podatkov (**Data Set**) izberemo **Glucose** (izbrani parameter se obarva modro).
2. Z oznakama **(+)** oz. **(-)** uravnamo koncentracijski gradient na 1200 mosm in izberemo ukaz **Dispense**.
3. Najprej izvedemo meritve brez dodanih glukoznih nosilcev. Poskus poženemo z ukazom **Start** in shranimo rezultate (**Record Data**) ter jih zapišemo v tabelo.
4. Z oznakama **(+)** oz. **(-)** uravnamo število glukoznih nosilcev na 100. Z ukazom **Dodaj nosilce (Add Carriers)** se ti vnesejo v membrano proksimalnega zavitega kanalčka. Poskus poženemo z ukazom **Start** in shranimo rezultate (**Record Data**) ter jih zapišemo v spodnjo tabelo.
5. Poskus ponovimo še z 200 in 400 glukoznimi nosilci.

Meritev	1	2	3	4
število glukoznih nosilcev				
koncentracija glukoze [mg/100ml]				
koncentracija kalija [mg/100 ml]				
volumen urina [ml]				

b) Naloge:

Odgovorite na naslednja vprašanja:

- Kaj se zgodi s količino glukoze v urinu, če se število glukoznih nosilcev povečuje?
- Količina glukoze v normalnem urinu je majhna, ker je običajno na voljo zadosti nosilcev glukoze. Razmislite, kaj bi se zgodilo, če bi bilo v urinu več glukoze, kot je lahko prenesejo razpoložljivi nosilci!
- Razložite, zakaj se nahaja glukoza v urinu diabetikov!

4.2.3 Prikaz učinka hormonov na nastajanje urina

Koncentracija urina, ki se izloča iz ledvic, je odvisna od trenutnih potreb organizma. Če npr. osebek popije veliko količino vode, se bo višek vode izločil, nastala bo velika količina redkega urina. Po drugi strani pa ob dehidraciji nastajajo majhne količine koncentriranega urina. Čeprav koncentracijska razlika omogoča izločanje koncentriranega urina, je koncentracija urina v prvi vrsti pod hormonalno kontrolo. Simulacija prikazuje učinek dveh različnih hormonov na delovanje ledvic, in sicer aldosterona, ki nastaja v nadledvični žlezi, in ADH, ki nastaja v hipotalamusu in se shranjuje v nevrohipofizi. Aldosteron deluje v distalnih zavutih cevkah, kjer omogoča reabsorpcijo ionov Na^+ in zato tudi vode na račun izgube ionov K^+ , ADH pa poveča prepustnost distalnih cevk in zbirnih cevk za vodo, zato omogoča reabsorpcijo vode iz filtrata.

a) Postopek:

1. V oknu za vnos podatkov (**Data Set**) izberemo **Hormone** (izbrani parameter se obarva modro).
2. Z izbiro tipk **(+)** oz. **(-)** uravnamo koncentracijski gradient na 1200 mosm in izberemo ukaz **Dodaj (Dispense)**.
3. Z ukazom **Start** poženemo poskus. Rezultate shranimo (**Record Data**) in zapišemo v tabelo. Na ta način dobimo osnovne podatke, ki jih bomo potrebovali za primerjave z ostalimi meritvami.
4. Pri enakih eksperimentalnih pogojih apliciramo v kopel aldosteron (okolica distalne zavite cevke in zbirnega kanalčka se obarva rdeče).
5. Z izbiro ukaza **Start** poženemo poskus in shranimo rezultate (**Record Data**).
6. Nato, znova pri enakih eksperimentalnih pogojih, apliciramo v kopel ADH (okolica distalne zavite cevke in zbirnega kanalčka se obarva zeleno).
7. Z izbiro ukaza **Start** poženemo poskus in zapišemo rezultate v tabelo.

Meritev	1	2	3
aldosteron			
ADH			
glukoza [mg/100 ml]			
kalij [mg/100 ml]			
volumen urina [ml]			
osmotski tlak urina [mosm]			

b) Naloge:

Na osnovi rezultatov meritev odgovorite na spodnja vprašanja:

- Kako se je količina urina po dodatku aldosterona razlikovala od bazalne vrednosti?
- Razložite razliko med celotno količino kalija pri obeh izvedenih poskusih!
- Kako se je količina urina po dodatku ADH razlikovala od bazalne vrednosti?
- Primerjajte učinke aldosterona in ADH!

4.3 LASTNOSTI IN SESTAVA KONČNEGA URINA

Urin je telesni izloček ali ekskret, s katerim se izločajo končni produkti metabolizma (predvsem dušika) in višek vode ter drugih snovi, ki so sicer fiziološko izredno pomembne (minerali, aminokislina, vitamini itd.). Fiziikalne lastnosti in kemična sestava urina so odvisne od vrste živali, starosti, prehrane, fiziološkega ali patološkega stanja. V sestavi urina se odražajo stanja v uropoetskem, prebavnem, cirkulatornem, hormonalnem in živčnem organskem sistemu. Z analizo urina lahko dobimo informacije o delovanju teh sistemov pa tudi celotnega organizma.

V urinu najdemo stalne, občasne in slučajne kemične sestavine.

- **Stalne sestavine** so vedno v urinu tako zdravih kot bolnih organizmov. Mednje npr. sodijo sečnina, kreatinin, sečna kislina, nekateri pigmenti, pa tudi kloridi, sulfati in fosfati natrija, kalija, magnezija in kalcija.
- **Občasne sestavine** so v urinu živali in ljudi samo v določenih fizioloških in patoloških stanjih. Laktozo najdemo v urinu gravidnih živali in živali v laktaciji, glukozo v stanju hiperglikemije ali pri sladkorni bolezni, nekatere hormone med spolnim ciklusom, aceton in ketonska telesa pri acetonemiji, beljakovine pri telesnih naporih in obolenjih ledvic itd.
- **Slučajne sestavine** urina pridejo v telo s hrano in se iz njega izločajo nespremenjene. To so različna rastlinska barvila, zdravila ipd.

4.3.1 Odvzem urina

Pri domačih živalih zbiramo urin za preiskave največkrat s katetrizacijo sečnega mehurja. Pri poskusih, pri katerih je potrebno zbirati urin dolgo časa, so živali opremljene s posebnimi katetri, po katerih se urin zbira v steklenice. Pregled urina je najbolje opraviti neposredno po odvzemu, sicer pa ga hranimo v hladilniku ali mu dodamo nekatere antiseptike (kloroform, toluol, formalin, solno kislino, timol, živosrebrni cianid ipd.). Ob uporabi le-teh je potrebno vedeti, da nekateri lahko vplivajo na rezultate določenih preiskav.

4.3.2 Pregled fizikalnih lastnosti urina

A) Volumen urina

Kadar merimo volumen izločenega urina, ga zbiramo 24 ur z občasno kateterizacijo ali zbiranjem v posode po posebno instaliranih cevkah ali vodih. Celodnevna količina je odvisna od količine sprejete vode, od nekaterih metaboličnih in hormonalnih procesov, ki potekajo v telesu, in od načinov izločanja vode po drugih poteh (znojenje, slinjenje, bruhanje, driska ipd.).

Če je količina urina povečana, govorimo o poliuriji, če je zmanjšana, pa o oliguriji. Kadar se urin preneha izločati, govorimo o anuriji.

B) Vonj urina

Vonj urina je specifičen za vsako živalsko vrsto in izvira iz različnih produktov metabolizma z značilnimi vonji. Vonj konjskega urina je aromatičen, govejega nekako sladkoben, urin prašiča in mesojedov, predvsem mačk, pa ogaben. Okus je zaradi NaCl in sečnine grenkoslan.

Tabela 4.1: Volumen in gostota urina

Vrsta živali	Volumen [ml/kg tel. mase/dan]	Gostota [g/L]
mačka	10–20	1020–1030
govedo	17–45	1030–1045
pes	20–100	1016–1060
koza	10–40	1015–1045
ovca	10–40	1015–1045
konj	3–18	1025–1060
prašič	5–30	1010–1050

C) Videz, barva in konsistenca urina

Urin je pri večini domačih živali bledorumena do rjava bistra vodena tekočina, pri konju pa je moten in sirupast ali celo sluzast zaradi sluzi, ki nastaja in se izloča v uretrih in zgornjem področju uretre, in drobnih, suspendiranih kristalčkov kalcijevega karbonata. Po nekajurnem stanju vsak urin postane moten zaradi nastajanja amonijaka in sesedanja kristalov. Zelo hitro postane moten urin prežvekovalcev, predvsem zaradi sedimentacije kalcijevega karbonata.

Značilna rumena barva urina izvira iz barvila **urohroma**. Poleg tega je v urinu tudi **urobilinogen**, ki nastaja v črevesju pri delovanju bakterij na bilirubin, ki iz črevesja preide v kri in se izloča z urinom. V urinu psa in človeka je lahko tudi **uroeritin**, v urinu prežvekovalcev pa **uroporfirin**, ki dajeta urinu rdečkast nadih. Intenzivnost obarvanja urina je odvisna od njegove koncentracije: bolj ko je koncentriran (in gost), intenzivnejša je njegova obarvanost. Pri diabetesu je urin blede barve, ker se ga izloča veliko in je razredčen. Če je urin koncentriran, je njegova barva temna.

V urinu je lahko tudi hemoglobin, ki ga obarva rdeče. Če so v urinu eritrociti, govorimo o **hematuriji**, če pa je hemoglobin v urinu raztopljen, govorimo o **hemoglobinuriji**.

Urin je lahko obarvan tudi zaradi barvil v hrani, nekaterih zdravil in umetnih barvil. Npr. antociani v pesi obarvajo urin rdečkasto, medtem ko ga sulfonamidi rdeče. Santonin ga obarva intenzivno rumeno ali zelenkasto pri kislem pH urina, pri alkalnem pH pa je barva rdečkasta ali celo vijoličasta. Tudi fenolftalein pri alkalni reakciji obarva urin rdeče.

Č) Gostota urina

Gostota urina je odvisna od količine v njem raztopljenih snovi in je obratno sorazmerna količini izločenega urina (če je izločenega urina veliko, je njegova gostota manjša, če pa se ga izloči malo, je večja). Okvirne vrednosti gostote urina so od 1,010 g/cm³ pri prašiču do 1,060 g/cm³ pri konju in psu (tabela 4.1).

Gostoto urina merimo z areometrom, ki je posebej umerjen za določanje gostote urina in se imenuje urometer. Urometer potopimo v urinski kozarec, napolnjen z urinom, in na skali odčitamo vrednost gostote. Za natančno merjenje moramo upoštevati temperaturo urina: če je višja od temperature, pri kateri je bil urometer kalibriran, za vsake 3 °C dodamo 0,001 g/cm³; če je nižja, to vrednost odštejemo za vsake 3 °C. Prav tako moramo opraviti nekatere popravke, kadar urin vsebuje glukozo ali beljakovine. Za vsakih 0,1 g beljakovin na liter urina odštejemo 0,003

g/cm³, za 55,51 mmol glukoze na liter urina pa odštejemo 0,004 od odčitane vrednosti na urometru.

D) Elektrokemična reakcija

pH urina je odvisen od vrste živali, prehrane in metabolizma. Okvirne vrednosti so od 5 do 8,5. Mesojedci imajo v glavnem kisel urin, rastlinojedci alkalnega, vsejedi pa glede na vrsto hrane kislega ali alkalnega. Kisel pH dajejo urinu kisli fosfati, bazičnega pa karbonati.

pH urina najlažje določamo z indikatorskimi papirčki. Papirček namočimo v urin in barvo primerjamo z barvno skalo. Da barva urina ne bi motila rezultata preiskave, ga razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1 : 10. Ker ima urin pufrske lastnosti, z redčenjem ne spremenimo njegovega pH.

Naloge:

1. Oglejte si barvo in konsistenco vzorcev urina različnih vrst domačih živali in opišite razlike, ki ste jih opazili!
2. Primerjajte vonj vzorcev urina!
3. Z areometrom določite gostoto vzorcev urina!
4. Določite pH urina različnih vrst domačih živali!

4.3.3 Kemične preiskave urina

A) Kvalitativni in kvantitativni pregled urina na glukozo

Kvalitativno lahko določimo glukozo v urinu s Fehlingovo reakcijo (gl. Laboratorijske vaje in računalniške simulacije v fiziologiji 1.del, vaja 4.1.3) ali z uporabo primernih indikatorskih papirčkov. Kvantitativno pa jo najlažje določimo s tovarniško izdelanimi testi.

Naloge:

1. Z metodo po Fehlingu ugotovite glukozo v vzorcu urina!
2. V istem vzorcu ugotovite glukozo z indikatorskim papirčkom in primerjajte rezultate obeh meritev!

B) Dokaz žolčnih barvil po Gmelinu in žolčnih kislin po Pettenhoferju

Kvalitativni dokaz žolčnih barvil in žolčnih kislin v urinu izvedemo z enakima postopkoma kot v žolču (gl. Laboratorijske vaje in računalniške simulacije v fiziologiji 1.del, vaji 4.4.3 in 4.4.4).

Naloge:

- Izvedite reakciji za dokaz žolčnih barvil in kislin v urinu!

C) Dokaz beljakovin v urinu

Za kvalitativni in kvantitativni način prikazovanja beljakovin v urinu je znanih več metod. V nadaljevanju navajamo nekaj starejših metod in sodobnejšo metodo na osnovi elektroimunoforeze.

- **Dokaz beljakovin s sulfosalicilno kislino**

a) Material:

- urin, sulfosalicilna kislina (mkc 200 g/L), epruvete, 5-mililitrska pipeta, kapalka.

b) Postopek: V epruveto damo približno 5 ml bistrega urina in po kapljicah dodajamo sulfosalicilno kislino. Če so v urinu beljakovine, bo dodatek vsake kapljice povzročil oblaček zameglitve. Po intenzivnosti reakcije lahko približno ocenimo količino beljakovin, kot je prikazano na tabeli 4.2.

- **Dokaz beljakovin z dušikovo kislino (metoda po Hellerju)**

a) Material:

- urin, koncentrirana dušikova kislina (HNO₃), epruveta, pipeta.

b) Postopek:

V epruveto odpipetiramo 1 ml koncentrirane dušikove kisline in nanjo ob steni epruvete previdno nalijemo 3 ml urina tako, da se tekočini ne pomešata.

c) Rezultat:

Če so v urinu beljakovine v koncentraciji najmanj 0,03 g/L, se na mejni ploskvi obeh tekočin pojavi bel prstan.

č) Naloge:

- Z eno od zgoraj opisanih metod dokažite beljakovine v vzorcu urina!

Tabela 4.2: Ocena koncentracije beljakovin v urinu

Koncentracija [g/L]	Videz urina po dodatku sulfosalicilne kisline
0,01	rahla opalescenca
0,1	motnost
0,5	močno izražena motnost
1,0	veliko sedimenta na dnu epruvete

Č) Kvantitativno določanje hemoglobina – benzidinska proba (po Adlerju)

Metoda temelji na ugotovitvi, da hemoglobin in njegovi derivati katalizirajo oksidacijo mnogih polifenolov v prisotnosti vodikovega peroksida (delujejo psevdoperoksidativno).

a) Material:

- razredčena raztopina vodikovega peroksida – H₂O₂ (k 3 ml H₂O₂ dodamo 97 ml vode), ledocetna kislina, benzidin, epruvete, kapalke.

b) Postopek:

1. Za noževno konico benzidina damo v epruveto, dodamo 2 ml očetne kisline in dobro premešamo.
2. Vzamemo 0,5 ml pod 1. pripravljene raztopine in jo zmešamo z 2 ml raztopine H₂O₂. Zmes mora ostati brezbarvna.
3. Zakislimo 5 ml urina z dodatkom 0,5 ml očetne kisline, prekuhamo (s tem uničimo termolabilne peroksidaze, ki bi sicer lahko motile probu) in ohladimo.
4. Iz tako prirejenega urina nalijemo počasi 2 ml na predhodno (pod 2.) pripravljene reagens,

tako da se tekočini ne zmešata. Če je v urinu hemoglobin, se na stični ploskvi pojavi zelen ali moder prstan.

c) Naloge:

- Z zgoraj opisano metodo ugotovite, če se v vzorcu urina nahaja hemoglobin!

D) Reakcija na aceton (po Legalu)

Aceton v urinu je vedno skupaj z acetocetno in oksimasleno kislino in je navadno znak težke acidoze organizma. Ugotovimo ga lahko z reakcijo po Legalu, ki je zelo občutljiva, zato se uporablja tudi v klinične namene.

a) Material:

- natrijev nitroprusid (mkc 100 g/L), raztopina NaOH 5 mol/L (mkc 20 g/100ml), ledocetna kislina.

b) Postopek:

1. V epruveto nalijemo 5 ml urina in dodamo 10 kapljic NaOH.
2. V epruveto dodamo 1 ml raztopine natrijevega nitroprusida; vsebina epruvete se obarva rdeče (zaradi kreatinina).
3. Dodamo nekaj kapljic očetne kisline in si ogledamo obarvanost raztopine. Če je v njej aceton (ali acetocetna kislina), se obarvanost raztopine intenzivira, ker natrijev nitroprusid z acetocetno kislino v alkalnem mediju daje kompleksno spojino vijolične ali rdeče barve. Če acetona (ali acetocetne kisline) v urinu ni, barva vzorca preide v rumenozeleno.

c) Naloge:

- Ugotovite prisotnost acetona v vzorcu urina!

E) Reakcija na indikan (po Obermayerju)

Z izrazom indikan poimenujemo soli indoksil žveplene kisline in indoksiglukuronate. Te spojine nastanejo z bakterijsko razgradnjo triptofana v debelem črevesu na indol in skatol, ki se v glavnem izločata z blatom, v manjši meri pa se resorbirata in preideta v jetra. Tu se indol oksidira v indoksil in esterificira z žvepleno ali glukuronsko kislino. Običajno je indikana v urinu malo, njegova koncentracija pa naraste, če pride do povečanega gnitja v črevesju. Običajno je to v primerih obstipacije, ko se resorbira več razgradnih produktov triptofana. Koncentracija indikana je povečana tudi tedaj, če je v telesu gnojni proces, pri katerem bakterije razgrajujejo beljakovine.

Postopek določanja temelji na dejstvu, da se estri indoksila saponificirajo, indoksil pa oksidira v indigo in ekstrahira s kloroformom.

a) Material:

- kloroform, tehnična solna kislina, epruvete, pipete.

b) Postopek:

1. V epruveto nalijemo približno 5 ml urina, dodamo enako količino solne kisline in dobro premešamo.
2. Dodamo še 2 ml kloroforma in previdno premešamo z nekajkratnim obračanjem epruvete.
3. Epruveto pustimo nekaj časa stati, da se kloroform oddvoji. Ob indigu v vzorcu urina se kloroform obarva modro. Po intenziteti barve presodimo, ali je reakcija pojačana v primerjavi z normalnim urinom (rahlo modro obarvanje).

c) Naloge:

- Z zgoraj opisano metodo ugotovite prisotnost indikana v vzorcu urina!

F) Hitri testi za analiziranje urina

V klinični praksi se za hitro in natančno analiziranje urina uporabljajo posebni testni trakovi. Z njimi lahko določimo različne kemične sestavine urina (beljakovine, glukozo, hemoglobin, nitrite, ketone, urobilinogen, bilirubin), prisotnosti levkocitov in eritrocitov ter pH urina. Barvne spremembe na posameznih poljih testnega traku primerjamo s priloženo barvno skalo, kar omogoča kvalitativno ali semikvantitativno presojo rezultatov. V humani in veterinarski medicini se uporabljajo različne komercialne izvedbe testnih trakov, ki se med seboj razlikujejo po številu in vrsti analiz, vsi pa se uporabljajo na enak način.

Za izvedbo hitrih testov uporabljamo svež, necentrifugiran urin brez dodatka konzervansov.

a) Postopek:

1. Testni trak vzamemo iz tulca in ga za kratek čas (1 s) potopimo v urin; tulec takoj zapremo!
2. Odvečni urin odstranimo s tem, da trak potegnemo po robu posode.
3. Po 60 (za levkocite po 60 do 120) sekundah primerjamo barvne spremembe posameznih polj na traku z barvami na skali (na posodici). Spremembe, ki nastanejo na robu polja ali po več kot 2 minutah, so diagnostično nepomembne.

b) Naloge:

- Opišite uporabljeni komercialni test za hitro analiziranje urina! Navedite, katere sestavine se določajo in na kakšen način!
- S testnimi lističi analizirajte vzorce urina različnih vrst domačih živali, zapišite in razložite rezultate!

4.3.4 Mikroskopski pregled urina

Z mikroskopom lahko opazujemo nekatere organske in neorganske sestavine urina. Pred pregledom urin pustimo stati v konusnih kozarcih ali pa ga centrifugiramo. Kapljico sedimenta kanemo na predmetno steklo in ga opazujemo pod mikroskopom. Sediment lahko tudi obarvamo, npr. z 1 % vodno raztopino eozina ali s Türckovo raztopino, ki jo sicer uporabljamo pri štetju levkocitov.

A) Opazovanje kristalov organskih in neorganskih soli

- **Karbonatni kristali:** Kristalčki kalcijevega (CaCO_3) in magnezijevega (MgCO_3) karbonata (slika 4.3 (a)) so normalna sestavina urina rastlinojedov, pri mesojedih pa so samo v alkalnem urinu. Pod mikroskopom se vidijo kot brezbarvne ali rumenkaste kroglice, lahko pa so tudi v obliki razpotegnjenega šesterokotnika ali dvodelnega biskvita. Včasih so tudi amorfni. Z dodatkom kisline se raztapljajo, pri čemer se pojavljajo mehurčki plina.
- **Fosfati:** Kristalčki kalcijevega fosfata – $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$ (slika 4.3 (b)) – so v obliki belih ali sivih palčk ali zrnc v vsakem alkalnem urinu in izginejo ob zakislitvi (npr. po dodatku očetne kisline).
- **Tripelfosfati:** Kristalčki amonij-magnezijevega fosfata (slika 4.3 (c)) se pojavijo ob amonijakalnem vrenju v urinu in so podobni pokrovu krste.
- **Urati:** Kristalčki (slika 4.3 (d)) so v vsakem kislem, koncentriranem urinu in mu v večji

koncentraciji dajejo tipično opekasto rdečo barvo (*sedimentum lateritum*), pod mikroskopom pa so videti kot amorfna zrnca. Kristali amonijevega urata pa so videti kot kroglice z zvezdastimi izrastki ali bodicami (kot kostanjeve ježice). Urati se raztapljajo ob segrevanju ali po dodatku baz.

- **Kristali sečne kisline:** Pojavljajo se v kislem urinu in imajo obliko rombov (npr. vretena, brusa, piramide, slika 4.3 (e)). Pogosti so v urinu mesojedov. Oborina izgine po dodatku alkalij.
- **Oksalati:** To so kristali kalcijevega oksalata (slika 4.3 (f)), ki so raztopljeni v urinu, iz katerega se obarjajo ob kislem pH. Imajo značilno obliko oktaedra ali pisemske kuverte. Njihovo izločanje v urinu (oksalaturija) je lahko posledica vsebnosti v hrani, npr. v rabarbari, špargljih, ali pa motenj v metabolizmu (diabetes), predvsem pri konju.
- **Hipurna kislina:** To so kristalčki v obliki prizem ali tankih rombastih ploščic in so normalna sestavina konjskega urina. Topijo se v amonijaku in alkoholu.
- **Kristali tirozina:** V urinu (slika 4.3 (g)) jih najdemo le pri nekaterih boleznih (npr. ciroza jeter, levkemija, diabetična koma) kot posledico motenj v metabolizmu aminokislin. Imajo obliko zvezdic ali tankih iglic, zbranih v snopiče.
- **Kristali holesterola:** V urinu (slika 4.3 (h)) jih najdemo pri boleznih ledvic. Imajo obliko rombastih ploščic, ki jim manjkajo vogali.
- **Cistinski kristalčki:** V urinu ljudi in psov jih najdemo pri motnjah v reabsorpciji aminokislina cistina iz glomerularnega filtrata in so pomemben dejavnik za nastajanje ledvičnih ali sečnih kamnov. Imajo heksagonalno obliko.

V urinu lahko najdemo tudi kristale sulfonamidov in penicilina ter nekaterih drugih antibiotikov.

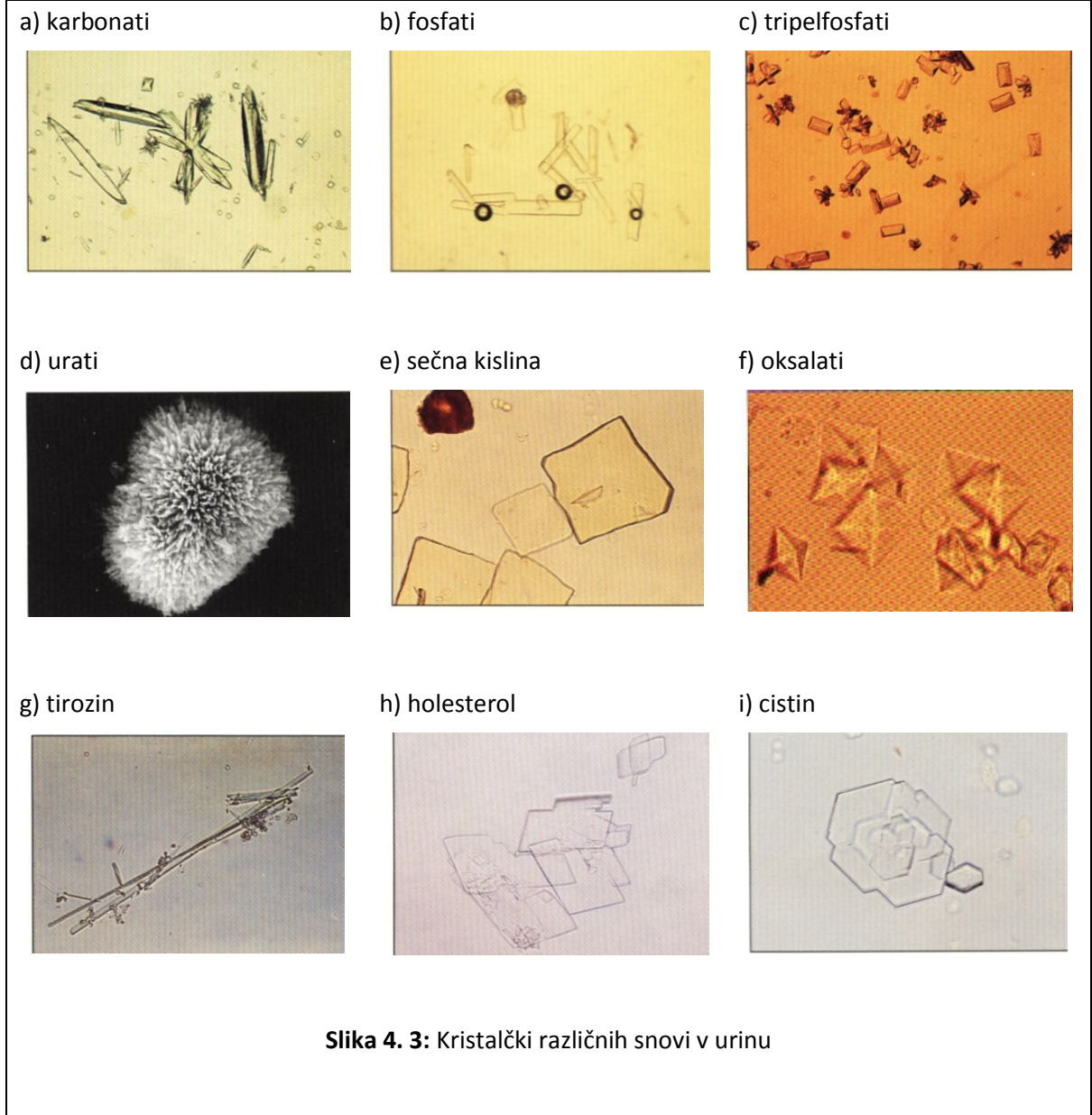
B) Opazovanje nekristaliziranih sestavin urinskega sedimenta

V urinskem sedimentu se lahko nahajajo tudi različne celice, npr. celice epitela (ledvic, sečnih poti, zunanjih spolnih organov), krvne celice (eritrociti, levkociti), tumorske celice, spolne celice, različni mikroorganizmi (bakterije, glivice) ter cilindri. V klinične namene se najpogosteje opazujejo neobarvani preparati pri slabši osvetlitvi vidnega polja (delno zapiranje kondenzorja) ali s fazno-contrastnim mikroskopom. Pripraviti je možno tudi trajne preparate, ki jih lahko obarvamo na najrazličnejše načine (npr. po May-Grünwald-Giemsu, po Papanicolau).

Cilindri so tvorbe v obliki trakov ali valjev z ostrimi obrisi, dolžine do 1 mm, ki predstavljajo odlitke ledvičnih kanalčkov (distalnih tubulov in zbirnih kanalčkov). Cilindri so sestavljeni iz celičnih elementov (pravi cilindri) ali iz raznih soli (lažni ali psevdocilindri). Pojav cilindrov v urinu ne pomeni vedno bolezni ledvic, saj se po fizičnih naporih lahko pojavijo tudi v urinu zdravih oseb. Glede na sestavo ločimo hialine, epitelne, zrnate, levkocitne, eritrocitne, voščene, mastne, bakterijske, holesterolne, pigmentne, cilindre natrijevega ali amonijevega urata itd., katerih izvor oziroma nastanek je vezan na določene patološke spremembe mokril. Zato ima njihovo ugotavljanje diagnostični pomen.

Naloge:

- Z mikroskopom si oglejte urinski sediment, ugotovite in narišite različne tvorbe, ki jih opazite!



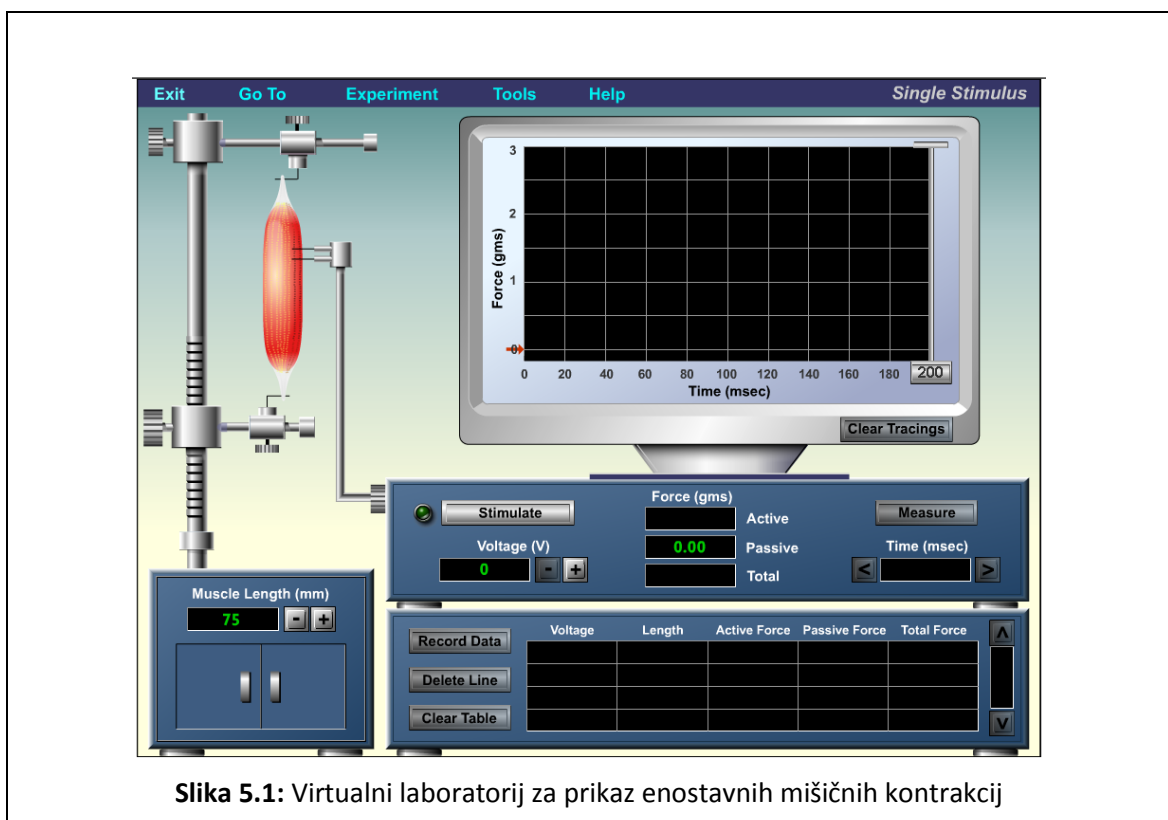
Slika 4. 3: Kristalčki različnih snovi v urinu

5 FIZIOLOGIJA MIŠIC IN GIBANJA

5.1 KONTRAKCIJE MIŠIC ŽABE

Vsako skeletno mišico sestavlja več sto ali celo več tisoč celic, od katerih vsaka sodeluje pri krčenju mišice. Če izolirano skeletno mišico poskusne živali dražimo z električnim tokom, se obnaša enako kot mišica v organizmu (*in vivo*). Zato delovanje mišic lahko proučujemo na izoliranih mišicah. Največ v ta namen uporabljamo izolirane mišice žab. Tudi te, podobno kot srce, ohranijo zmožnost krčenja (kontraksije) še dolgo po izolaciji iz organizma. Pri tem jih ni treba ohranjati v kontroliranih fizioloških pogojih (telesna temperatura, dodajanje hranilnih snovi in kisika).

Namesto poskusov na izoliranih mišicah živali lahko v pedagoške namene uporabljamo tudi računalniške simulacije (npr. PhysioExe), ki so bile razvite na osnovi meritev, opravljenih na mišicah žab ali podgan.



Slika 5.1: Virtualni laboratorij za prikaz enostavnih mišičnih kontrakcij

Simulacijo poženemo z izbiro poglavja **Fiziologija skeletnih mišic (*Skeletal Muscle Physiology*)** iz glavnega menija programa. Najpomembnejši del virtualnega laboratorija (slika 5.1) je ekran osciloscopa. Ta grafično prikazuje rezultate meritev in omogoča njihovo analizo. Na vodoravni osi ekrana je prikazan čas potovanja zapisa po ekranu, ki je samodejno uravnan na 200 milisekund. Lahko ga povečamo tako, da oznako 200 msec premikamo levo v zaželeni položaj na časovni osi. Moč krčenja mišice je prikazana na navpični osi. Z ukazom **Clear Tracing** (v levem spodnjem kotu ekrana) izbrišemo zapis z ekrana. Pod osciloskopom je električni stimulator. Ukaz **Stimulate** posreduje električni dražljaj do mišice po elektrodah, ki ležijo na njeni površini. Napetost dražljaja

uravnavamo z izbiro oznak (+) ali (-) pod ukazom. Trije prikazi desno od ukaza **Stimulate** so namenjeni merjenju moči krčenja mišice. Aktivna moč nastaja med mišično kontrakcijo, medtem ko pasivna izvira iz raztegnjene mišice. Skupna moč je vsota aktivne in pasivne moči.

Mišica je nameščena na ročicah levo od osciloskopa. Kaveljček, ki prebada zgornjo kito mišice, je del pretvornika, ki meri moč krčenja mišice, tisti, ki prebada spodnjo tetivo, pa fiksira mišico. Omarica za uteži pod ročicami za mišico je aktivna le v nekaterih poskusih, v njej pa so različne uteži. Začetno dolžino mišice lahko uravnavamo z izbiro oznak (+) ali (-) ob prikazu dolžine mišice (**Muscle length**). Rezultate meritev lahko shranimo in prikažemo v enoti za prikaz podatkov pod osciloskopom (**Record Data**).

5.1.1 Enostavna mišična kontrakcija

Enostavna mišična kontrakcija je reakcija mišice na enkratni dražljaj ustrezne jakosti. V organizmu je enostavnih mišičnih kontrakcij razmeroma malo, večinoma so sestavljene.

Enostavna mišična kontrakcija je sestavljena iz treh faz:

- **Latentna faza** traja od trenutka vzdraženja do začetka kontrakcije mišice; vključuje čas, potreben, da dražljaj preide po motoričnem živcu skozi živčno-mišično sinapso, in čas od vzdraženja mišice do začetka kontrakcije.
- **Faza kontrakcije** zajema čas kontrakcije – krčenja mišice.
- **Faza dekontrakcije** zajema čas relaksacije – sprostitve mišice, torej njenega vračanja v začetni položaj.

Trajanje posameznih faz mišične kontrakcije je odvisno od vrste mišice. Latentna faza *m. gastrocnemiusa* žabe traja približno 0,01 s, faza kontrakcije približno 0,04 s in faza dekontrakcije približno 0,05 s.

A) Registracija enostavne mišične kontrakcije

a) Postopek:

1. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo mišico. Ker je sprva napetost stimulatorja nastavljena na 0 V, mišica ne reagira.
2. Z oznako (+) zraven ukaza **Stimulate** povečamo napetost na 3 V in ponovno vzdražimo mišico. Mišica se skrči in zapis kontrakcije je viden na osciloskopu. Rezultate meritve shranimo, nato z ukazom **Clear Tracing** pobrišemo zapis na osciloskopu.

b) Naloge:

- Določite posamezne faze mišične kontrakcije!

B) Določitev trajanja latentne faze

Latentna faza je na zapisu mišične kontrakcije čas med sprožitvijo dražljaja in začetkom kontrakcije. Njeno trajanje lahko izmerimo s pomočjo računalnika.

a) Postopek:

1. Napetost na stimulatorju uravnavamo na 5 V. Oznaka 200 ms naj bo na desnem robu osciloskopa.
2. Z ukazom **Stimulate** poženemo meritev.

3. Izberemo ukaz **Measure** in pritiskamo na desno puščico ob prikazu časa, dokler ne opazimo prvega dviga vrednosti v prikazu aktivne moči. Ta vrednost je dejansko nad pravo dolžino latentne faze. Zato moramo pritiskati na levo puščico, dokler se v prikazu aktivne moči ponovno ne pojavi vrednost 0. V tem trenutku računalnik izmeri čas med dražljajem in zadnjim trenutkom, ko je aktivna moč še enaka nič.

b) Naloge:

- Odgovorite na spodnji vprašanji:
 1. Kako dolgo traja latentna faza mišične kontrakcije?
 2. Kaj se z mišico dogaja v tem navideznem obdobju mirovanja?

C) Opazovanje vpliva velikosti dražljaja na mišično kontrakcijo

Vzdražljivost je ena od lastnosti mišic. Skeletna mišica odgovarja na dražljaje različne jakosti z različno stopnjo krčenja. S povečevanjem dražljaja se povečuje tudi moč krčenja mišice zaradi naraščanja števila vzdraženih mišičnih vlaken. Mišica se popolnoma skrči, ko so vzdražena vsa mišična vlakna. Nadaljnje povečevanje dražljaja ne povzroči še večjega odziva. Ta poskus simulira aktivnost mišice *in vivo*, ko povečevanje števila vzdraženih motoričnih enot povečuje moč krčenja.

Osnovna funkcionalna enota v intaktni mišici je motorična enota, ki jo sestavlja skupina mišičnih vlaken z motoričnim nevronom. Ko v motoričnem nevronu nastane akcijski potencial, se vsa mišična vlakna motorične enote skrčijo. Število mišičnih vlaken v motorični enoti je različno (mišice, ki izvajajo precizne gibe 3–5, mišice, ki izvajajo grobe gibe več 100 ali 1000).

Posamezna motorična enota odgovarja na dražljaj po zakonu "vse ali nič" (kot srce): preslaboten dražljaj ne povzroči skrčenja, zadosti močan pa maksimalno skrčenje. Celotna mišica je sestavljena iz motoričnih enot z različnimi pragi vzdražljivosti. Dražljaj določene jakosti vzdraži samo tiste motorične enote, katerih prag vzdražljivosti je dosežen ali presežen. Ko je dosežen maksimalni dražljaj, se skrčijo vse mišične celice, zato se mišica skrči maksimalno. Če jakost dražljaja še povečujemo, ni možno še večje krčenje mišice. Glede na to ločimo več stopenj dražljajev:

- **subminimalni dražljaj** ni zadosti močan, da bi vzdražil mišico;
- **minimalni dražljaj** vzdraži mišico le toliko, da se minimalno skrči (skrčijo se celice oz. motorične enote z najnižjim pragom);
- **maksimalni dražljaj** – s stopnjevanjem jakosti dražljaja se mišica vse močneje krči, dokler ni dražljaj tako močan, da je dosežena maksimalna kontrakcija (skrčene so vse mišične celice oz. motorične enote);
- **supramaksimalni dražljaj** – njegova jakost je večja od maksimalnega, vendar ne povzroči še večje kontrakcije mišice.

a) Postopek:

1. Pred začetkom meritve izbrišemo predhodne zapise na osciloskopu.
2. Napetost uravnamo na 0 V in z ukazom **Stimulate** vzdražimo mišico. Po končani meritvi shranimo rezultate (**Record Data**).
3. Postopoma povečujemo napetost za 1 V in ponavljamo meritve, dokler ne dosežemo največje napetosti (10 V). Vsakokrat shranimo rezultate.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Na osnovi dobljenih rezultatov grafično prikažite vpliv velikosti dražljaja (napetosti) na mišično kontrakcijo (abscisa – napetost [V]; ordinata – moč krčenja [gms])!

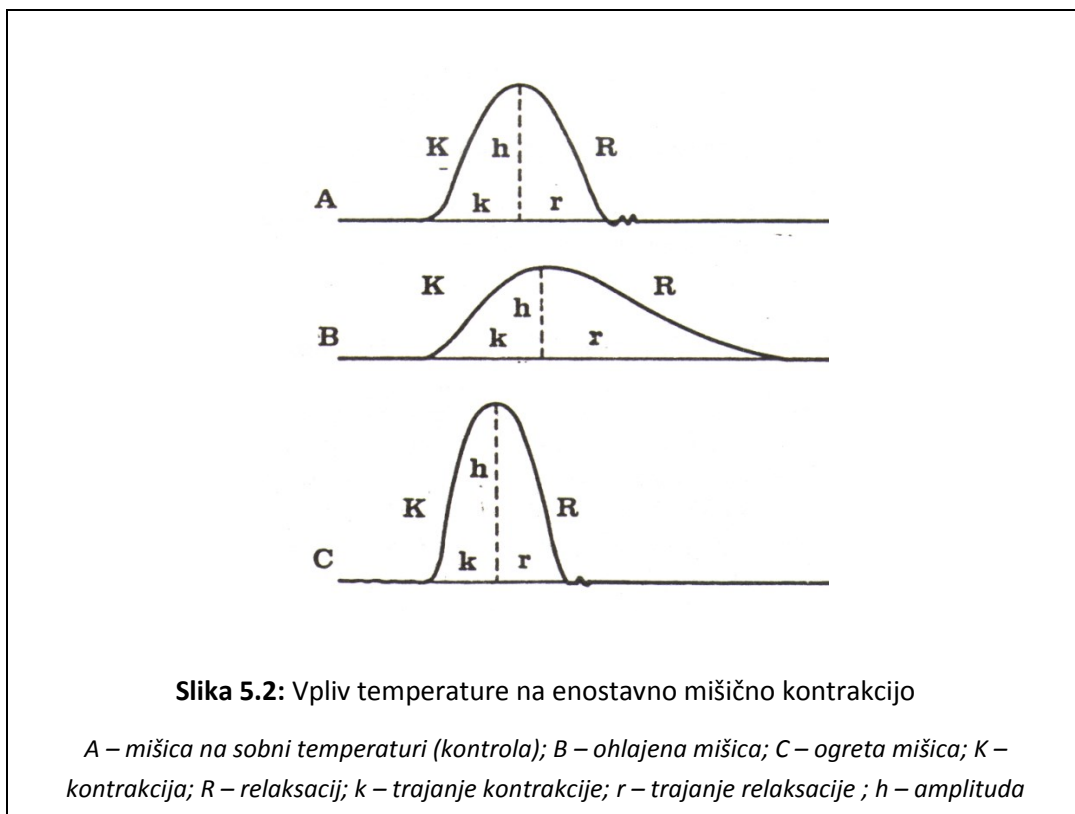
Meritev											
Napetost [V]											
Moč krčenja [gm/s]											

3. Odgovorite na spodnja vprašanja:

- Kakšna je minimalna napetost, ki povzroči mišično kontrakcijo (prag vzdražljivosti)?
- Kakšna napetost povzroči maksimalno kontrakcijo mišice?
- Razložite opazovani pojav!

Č) Vpliv temperature na enostavno mišično kontrakcijo

Sprememba temperature vpliva tudi na enostavno mišično kontrakcijo, in sicer znižanje upočasni hitrost kontrakcije, povišanje pa jo pospeši. Krivulja enostavne mišične kontrakcije (slika 5.2) je ob segrevanju mišice bolj strma in krajša kot pred segrevanjem (ker vse tri faze potekajo hitreje in bolj intenzivno), ob ohladi mišice pa je bolj položna in daljša kot v prvem primeru (ker so vse faze enostavne mišične kontrakcije podaljšane).



a) Material: mišični preparat, Ringerjeva raztopina za hladnokrvne živali (pri sobni temperaturi, segreti na 37 °C, ohlajena na 5 °C), kimograf, prirejen za registracijo mišičnih kontrakcij, električni stimulator, elektrode.

b) Postopek:

1. Pripravimo mišični preparat in ga namestimo na kimograf. Na distalni in proksimalni del mišice pritrdimo elektrodi. Kimograf povežemo s stimulatorjem tako, da ob maksimalni hitrosti vrtenja vzdraži mišični preparat le en dražljaj.
2. Registriramo miogram enostavne mišične kontrakcije (na sobni temperaturi).
3. Preparat prelivamo s toplo Ringerjevo raztopino in registriramo enostavno mišično kontrakcijo ogretega preparata.
4. Preparat prelivamo z ledeno Ringerjevo raztopino in registriramo mišično kontrakcijo ohlajenega preparata.

c) Naloge:

1. Ugotovite čas trajanja posameznih faz enostavne mišične kontrakcije pri različnih temperaturah!
2. Izračunajte, za koliko mm se je skrčila mišica pri posamezni kontrakciji!

5.1.2 Sestavljena mišična kontrakcija

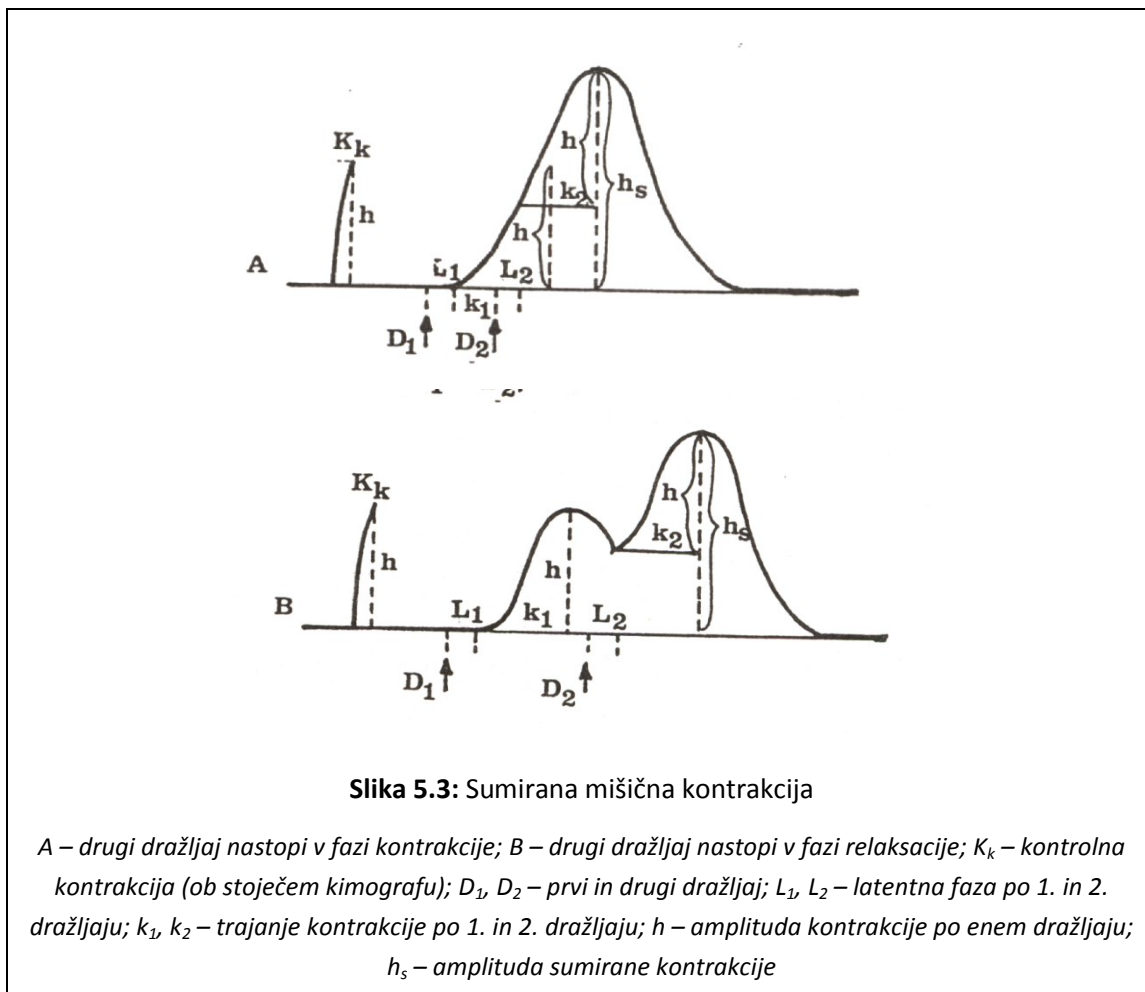
Prejšnji poskusi so pokazali, da je moč mišične kontrakcije mogoče povečati s povečevanjem napetosti dražljaja. Drugi način za povečanje moči mišične kontrakcije pa je povečanje frekvence dražljajev, ki stimulirajo mišico. V tem primeru vsak naslednji dražljaj povzroči novo kontrakcijo, preden se mišica relaksira. Skrajna oblika tega pojava je tetanična mišična kontrakcija, pri kateri dražimo mišico z dražljaji tako velike frekvence, da se mišica med posameznimi dražljaji sploh ne relaksira.

Iz menija poskusa izberemo poglavje **Več dražljajev (Multiple Stimulus)**. Edina sprememba opreme v primerjavi s predhodnimi poskusi (slika 5.1) je vidna na stimulatorju, kjer se nahajata ukaza **Posamezni dražljaj (Single Stimulus)** in **Več dražljajev (Multiple Stimulus)**. Ob izbiri ukaza **Multiple Stimulus** se ta spremeni v ukaz za prekinitev draženja (**Stop Stimulus**), električni dražljaji pa prihajajo v mišico s frekvenco, prikazano pod tipko, dokler se mišica ne utruji ali ne prekinemo draženja. Frekvenco dražljajev (št./sek) določimo z izbiro ukazov **(+)** ali **(-)** ob prikazu frekvence.

A) Prikaz vpliva dveh zaporednih dražljajev na mišično kontrakcijo

Ob delovanju dveh enako močnih dražljajev na mišico v časovnem intervalu, krajšem od trajanja enostavne mišične kontrakcije, nastane karakteristični zapis sumirane mišične kontrakcije (slika 5.3).

Če drugi dražljaj nastopi **v latentni fazi** predhodne kontrakcije (manj kot 0,01 s za prvim), učinka ne bo, ker je mišica v latentni fazi nevzdražljiva. Če drugi dražljaj nastopi **v fazi kontrakcije mišice (v aktivni fazi)** po prvem dražljaju (več kot 0,01 s in manj kot 0,05 s za prvim), nastane sumirana kontrakcija, ki ima videz krivulje z enim vrhom, njena višina pa presega višino enostavne mišične kontrakcije. Če pa drugi dražljaj nastopi **v fazi dekontrakcije (v pasivni fazi)** po prvem dražljaju (več kot 0,05 s za prvim), nastane sumirana kontrakcija, ki ima videz krivulje z dvema vrhovoma, njena višina pa prav tako presega višino enostavne mišične kontrakcije.

**a) Postopek:**

1. Dolžino mišice naravnamo na 75 mm, napetost dražljaja pa na 8 V. Oznaka 200 msec naj bo na desnem robu ekrana osciloskopa.
2. Z ukazom **Single Stimulus** registriramo enostavno mišično kontrakcijo.
3. Meritev ponovimo s tem, da ukaz **Single Stimulus** naglo ponovimo dvakrat zapored. Oglejmo si zapis mišične kontrakcije.
4. Poskus ponavljamo tako, da spreminjamo interval med zaporednima dražljajema.

b) Naloge:

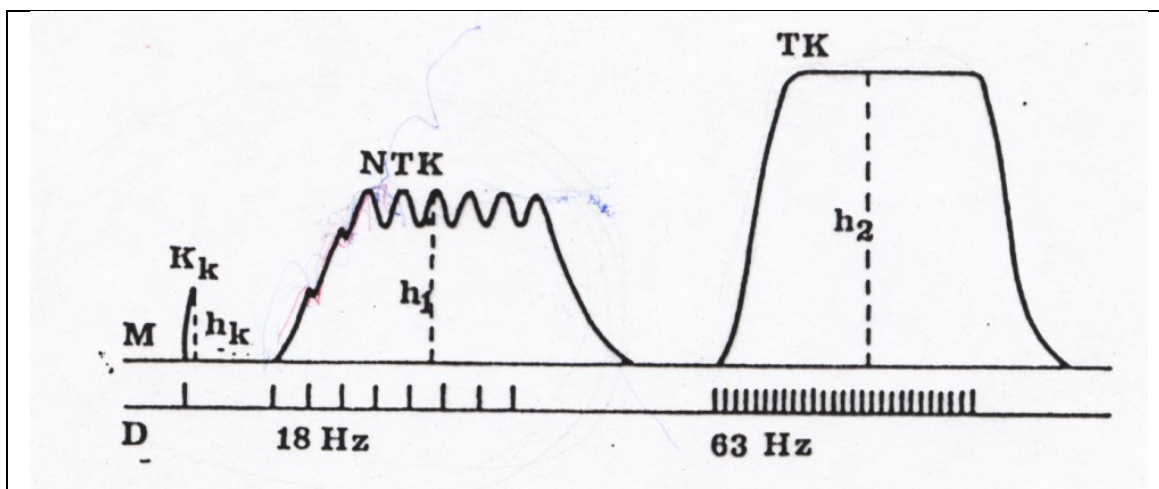
- Razložite vzroke za opazovani pojav!
- Kako je povečevanje časovnega intervala vplivalo na obliko mišične kontrakcije?

B) Tetanična mišična kontrakcija

Kvaliteta mišične kontrakcije je odvisna od frekvence dražljajev, ki prihajajo v mišico. Da dobimo tetanično kontrakcijo pod eksperimentalnimi pogoji (slika 5.4), moramo uporabiti dražljaje določene frekvence in intenzivnosti. Glede na stopnjo frekvence lahko dobimo dve vrsti tetaničnih kontrakcij:

- **Nepopolni tetanični krč** nastane, če je frekvenca dražljajev manjša od 20/s (vsak dražljaj pade v pasivno fazo predhodne kontrakcije).

- **Popolni (gladki) tetanični krč** pa nastane, če je frekvenca dražljajev večja od 20/s (vsak naslednji dražljaj pade v aktivno fazo predhodne kontrakcije). Ob tem nastopi popolna kontrakcija mišice, ki traja 10–20 sekund, nato pa zaradi utrujenosti upada.



Slika 5.4: Tetanične kontrakcije mišic

(*D – dražljaji, NTK – nepopolna tetanična kontrakcija, TK – popolna tetanična kontrakcija, H_k – amplituda kontrolne kontrakcije, h₁ – amplituda nepopolne tetanične kontrakcije, h₂ – amplituda popolne tetanične kontrakcije, M – miogram, K_k – kontrolna kontrakcija*)

a) Postopek:

1. Dolžina mišice naj bo 75 mm, napetost dražljaja pa 5 V.
2. Frekvenco dražljajev uravnamo na 30/s. Z ukazom **Multiple Stimulus** poženemo simulacijo. Ko se zapis na osciloskopu približa desnemu robu ekrana, ustavimo poskus z ukazom **Stop Stimulus**. Z ukazom **Record Data** shranimo rezultate.
3. Meritev ponavljamo tako, da frekvenco dražljajev postopoma povečujemo (60/s, 90/s, 120/s in 150/s). Vsakokrat shranimo rezultate.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!

Meritev					
Frekvenca dražljajev [s ⁻¹]					
Moč kontrakcije [gm/s]					

2. Grafično ponazorite rezultate (abscisa – frekvenca dražljajev [s⁻¹], moč kontrakcije [gms])!
3. Odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kako se spreminja oblika zapisa ob povečevanju frekvence dražljajev? Razložite vzroke za opazovani pojav!
 - Na grafikonu določite frekvenco dražljajev, nad katero se moč kontrakcije ne povečuje!

C) Utrujenost mišice

Zaradi dolgotrajnega, neprekinjenega krčenja se mišica utruje, zato se ne more več krčiti. Mišična utrujenost je posledica pomanjkanja ATP, ki se porablja tako pri kontrakciji kot pri dekontrakciji mišice. Nastopi zaradi kontrakcijskih in metaboličnih procesov v samem mišičnem vlaknu pa tudi procesov, ki potekajo v živčno-mišični sinapsi, motoričnem nevronu, sinapsah in v motoričnih centrih. Utrujena mišica na dražljaje najprej odgovarja slabo, potem pa sploh ne več.

a) Postopek:

1. Dolžina mišice naj bo 75 mm, napetost dražljaja 10 V, frekvenca dražljajev pa 150/s.
2. Z ukazom **Multiple Stimulus** poženemo registracijo in jo ustavimo, ko zapis večkrat preide preko ekrana.

b) Naloge:

- Opišite in narišite miogram utrujanja mišice!
- Razložite razloge za nastale spremembe!

5.1.3 Izotonična in izometrična mišična kontrakcija

Mišične kontrakcije se glede na to, ali je med kontrakcijo možno krajšanje mišice ali ne, delijo na izotonične in izometrične. V organizmu se večinoma pojavljajo mešane kontrakcije.

- **Izotonična kontrakcija** nastane, kadar se mišica lahko nemoteno krajša, pri čemer se njen tonus ne spreminja (npr. fleksije okončin).
- **Izometrična kontrakcija** pa nastane, če je spreminjanje dolžine mišice onemogočeno, pač pa se ob kontrakciji spreminja njen tonus (napetost). Pri tem mišica ne opravlja zunanega dela (npr. dviganje), pač pa notranje (povečanje tonusa). Take kontrakcije nastopijo npr. ob stoji v mišicah iztegovalkah nog in v žvekalnih mišicah ob drobljenju hrane (ko je stik med griznimi ploskvami že vzpostavljen).

A) Proučevanje izometrične kontrakcije

Pri izometrični kontrakciji se dolžina mišice ne spreminja. V eksperimentalnih pogojih to dosežemo s fiksacijo obeh koncev mišice. Dolžina mišice pred krčenjem je pomemben dejavnik, ki določa moč krčenja. Pasivna moč je posledica raztezanja mišice in je odvisna od njene elastičnosti. Aktivna moč pa nastane med fiziološkim krčenjem mišice. Skupna moč kontrakcije je vsota pasivne in aktivne moči in jo lahko izmerimo.

Poskus poženemo z izbiro ukaza **Izometrična kontrakcija (Isometric Contraction)** iz menija poskusov. Pri tem poskusu je ekran osciloskopa razdeljen na dva dela, od katerih levi prikazuje zapis časovnega poteka mišične kontrakcije, desni pa podatke o aktivni, pasivni in skupni moči kontrakcije.

a) Postopek:

1. Z izbiro oznak **(+)** oz. **(-)** ob ustreznih prikazih naravnomoč dražljaja na 8,2 V, dolžino mišice pa na 75 mm.
2. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo mišico in shranimo rezultate (**Record Data**). Na levem ekranu osciloskopa vidimo zapis enostavne mišične kontrakcije, na desnem pa tri točke, ki predstavljajo aktivno (rdeča pika), pasivno (zeleni kvadrater) in skupno (rumeni kvadrater) moč kontrakcije.

- Mišico skrajšamo na 50 mm (z oznako (-) ob prikazu dolžine mišice). Z ukazom **Stimulate** jo ponovno vzdražimo in shranimo rezultate (**Record Data**).
- Stimulacijo ponavljamo tako, da vsakokrat povečamo dolžino mišice za 10 mm, dokler ne dosežemo največje dolžine 100 mm, in ob vsakem draženju shranimo rezultate.

Meritev						
Dolžina mišice [mm]						
Aktivna moč [gm/s]						
Pasivna moč [gm/s]						
Skupna moč [gm/s]						

b) Naloge:

- Rezultate meritev vnesite v tabelo!
- Grafično prikažite razmerje med dolžino mišice in močjo kontrakcije (abscisa – dolžina mišice [mm], ordinata – moč kontrakcije [gms])!
- Na osnovi dognanj, do katerih ste prišli pri poskusu, odgovorite na spodnji vprašanji:
 - Kaj se zgodi z aktivno in pasivno jakostjo, ko dolžina mišice narašča?

Pojasnite opazovani pojav na celični ravni!

B) Proučevanje učinka obremenitve na izotonično kontrakcijo

Med izotonično kontrakcijo se dolžina mišice nemoteno spreminja, moč kontrakcije pa ostaja enaka. V eksperimentalnih pogojih en konec mišice ostaja prost in nanj lahko obešamo različne uteži, medtem ko je drugi konec fiksiran in povezan s pretvornikom. Če mišico postopoma obremenjujemo z vse težjim bremenom, se bo vedno šibkeje in vedno počasneje krčila. Ta pojav imenujemo razmerje med obremenitvijo in hitrostjo kontrakcije (**force-velocity relationship**).

V posameznem mišičnem vlaknu je stopnja kontrakcije premo sorazmerna dolžini posamezne sarkomere pred začetkom kontrakcije. Vsaka sarkomera se bo skrčila z optimalno močjo, če je njena dolžina optimalna (niti predolga niti prekratka), preden se kontrakcija začne. Če mišico v mirovanju preobremenimo, se bodo njeni elastični in kontraktilni elementi raztegnili. Na molekularni ravni dolžina sarkomere odraža prekrivanje debelih in tankih filamentov. Teorija drsečih filamentov predpostavlja, da je moč kontrakcije mišičnih vlaken premo sorazmerna številu mostičkov med debelimi in tankimi filamentami.

- Če se filamenta začno kontrahirati ob **veliki dolžini sarkomere**, se debeli in tanki filamenta komaj prekrivajo in tvorijo le malo mostičkov, kar pomeni, da na začetku kontrakcije drseči filamenta le minimalno sodelujejo, zato ne morejo ustvariti zadostne sile.
- Pri **optimalni dolžini sarkomere** se filamenta začnejo kontrahirati z več mostički med debelimi in tankimi filamentami, zato se vlakna lahko optimalno skrčijo.
- Če je **sarkomera krajša od optimalne**, so na začetku kontrakcije debeli in tanki filamenta preveč prekriti, zato debeli lahko premikajo kratke samo na kratki razdalji, preden se tanki aktinski filamenta nasprotnih strani sarkomere začno prekrivati. To pa prepreči formacijo mostičkov. Če se sarkomera preveč skrajša, debeli filamenta prehajajo v Z diske na koncu sarkomere, zato je tvorba mostičkov onemogočena, moč kontrakcije pa upada.

Iz menija poskusa izberemo poglavje **Izotonična kontrakcija (*Isotonic Contraction*)**. Oprema virtualnega laboratorija je podobna kot pri prejšnjih poskusih. V tem poskusu je omarica z utežmi odprta, z miško jih je mogoče namestiti na spodnjo kito preparata. Po obremenitvi mišice z utežmi je njena dolžina podana v prikazu **Muscle Length**. Z izbiro oznak (+) oz. (-) lahko uravnava višino podstavka za uteži, ki je prikazana v oknu **Platform Hight**.

a) Postopek:

1. Z izbiro oznak (+) oz. (-) ob ustreznih prikazih naravnamo moč dražljaja na 10 V, višino podstavka uteži pa na 50 mm.
2. Na spodnjo tetivo mišice namestimo največjo utež (2 g).
3. Z ukazom **Stimulate** vzdražimo mišico in shranimo rezultate (**Record Data**).
4. Stimulacijo ponavljamo tako, da vsakokrat znižamo višino podstavka uteži za 10 mm (od 50 do 100 mm). Rezultate meritev shranimo.

b) Naloge:

1. Rezultate meritev vnesite v tabelo!
2. Grafično prikažite razmerje med dolžino mišice in aktivno močjo krčenja (abscisa – višina podstavka [mm], ordinata – aktivna moč [gms])!
3. Odgovorite na spodnja vprašanja:
 - Kako je povečevanje dolžine mišice vplivalo na krčenje mišice?
 - Razložite vzroke za opazovani pojav!

Meritev							
Dolžina [mm]							
Aktivna moč [gms]							

5.1.4 Elastičnost mišic

Mišica kaže svojo elastičnost na ta način, da se po prenehanju obremenitve povrne v prvotno stanje. Ta lastnost mišice je odvisna od njene strukture in od sprememb koloidnega stanja snovi, ki sestavljajo mišice.

a) Material: mišični preparat, Ringerjeva raztopina za hladnokrvne živali, kimograf, električni stimulator, elektrode, uteži.

b) Postopek:

1. Pripravimo mišični preparat (*m. gastrocnemius*), ga namestimo na kimograf in povežemo z elektrodami stimulatorja.
2. Ob mirujočem kimografu registriramo enostavno mišično kontrakcijo, nato pa mišico postopoma obremenjujemo, registriramo enostavno mišično kontrakcijo in po vsaki registraciji premaknemo kimografski valj za 0,5 cm naprej. To ponavljamo toliko časa, dokler se dolžina mišice ne povečuje več.
3. Nato pričnemo mišico razbremenjevati in ves postopek ponavljamo, dokler ne snamemo vseh uteži.

c) Naloge:

1. Narišite sliko zapisa, ki ste ga registrirali!
2. Razložite vzroke za nastale spremembe!

5.2 ERGOMETRIJA

Medtem ko je razmeroma lahko izmeriti silo, moč in delo ter prikazati utrujenost posameznih, izoliranih mišic, pa je težje meriti te elemente pri skupini mišic ali pri celotnem organizmu v gibanju ali pri delu. V ta namen so izdelani posebni aparati, imenovani **ergometri** ali **dinamometri**. Pri ljudeh je možno meriti moč in delo posameznih okončin (npr. Porterjev ročni, Asmussenov nožni ergometer). Izdelani so tudi ergometri za merjenje sile udarca, stiska rok, čeljusti itd. Najpogosteje se pri ljudeh uporabljajo ergometri v obliki kolesa. Pri teh se ob obremenitvi merijo tudi različni drugi fiziološki parametri (npr. frekvenca srca, krvni tlak, EKG, frekvenca dihanja, poraba kisika, količina izločenega ogljikovega dioksida).

Ergometrija pri živalih se lahko opravlja ob delu (tek, vleka voza), nakar se elementi opravljenega dela izračunajo. Natančne podatke pa lahko dobimo z uporabo posebej izdelanih ergometrov v obliki tekočega traku (angl. *treadmill*). S to napravo je možno natančno kontrolirati obremenitev živali, s priključenimi merilnimi napravami pa meriti spremembe fizioloških parametrov, jemati kri v določenih časovnih presledkih itd.

5.2.1 Utrujanje prstnih mišic pri človeku

Utrujanje prstnih mišic pri človeku lahko prikažemo z **ergografom** (slika 5.5). Kimografski zapis, ki ga dobimo ob tem, imenujemo **ergogram**. Na tem zapisu lahko vidimo, da se amplituda kontrakcij med daljšim mišičnim delom postopoma manjša in na koncu popolnoma preneha. Ergogram je lahko individualno različen, odvisen od stopnje obremenitve, tempa dela ter fizičnega in psihičnega stanja poskusne osebe.

a) Material:

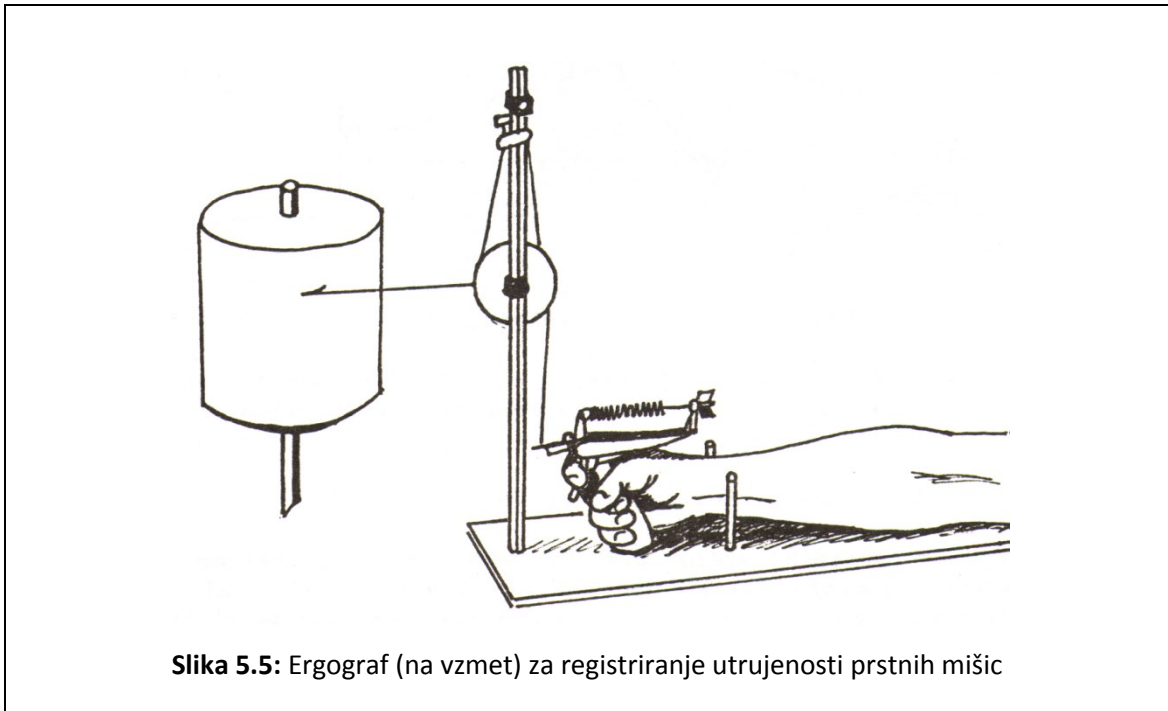
- ergograf, aparat za registracijo, metronom, sfigmomanometer.

b) Postopek:

1. Poskusna oseba namesti roko v ergometer, na enega od prstov pa namestimo zanko, na kateri visi utež. V skladu z ritmom metronoma naj s prstom dviga utež tako dolgo, da amplituda kontrakcij, ki jih registriramo na kimografskem valju, pade za polovico. Poskus ponavljamo z različnimi prsti in različno težkimi utežmi.
2. Poskus ponovimo, s tem da na nadlaket poskusne osebe namestimo manšeto sfigmomanometra in jo napolnimo do tlaka 30 kPa.
3. Registracijo utrujenosti prstnih mišic izvedemo še potem, ko je poskusna oseba 10 minut namakala roko v ohlajeni vodi.
4. Nato registracijo utrujenosti prstnih mišic izvedemo še potem, ko je poskusna oseba 10 minut namakala roko v vroči vodi.

c) Naloge:

1. Primerjajte med seboj rezultate dela različnih prstov na levi in desni roki!
2. Izračunajte opravljeno delo prstnih mišic do nastopa mišične utrujenosti!
3. Primerjajte rezultate meritev pri normalnem delu prstov in po blokiranju krvnega obtoka ter po ohladitvi ali segrevanju prstov!



Slika 5.5: Ergograf (na vzmet) za registriranje utrujenosti prstnih mišic

5.3 FIZIOLOGIJA GIBANJA

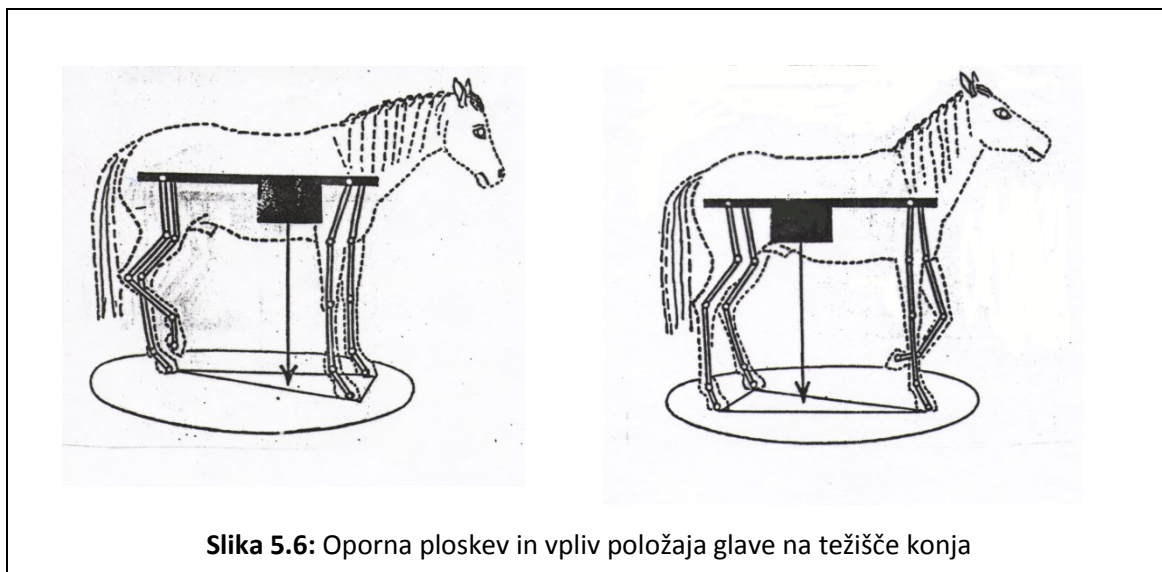
Za vzdrževanje položaja telesa pri stoji in gibanju ima vsaka živalska vrsta razvit specifičen gibalni aparat. Glavni deli gibalnega aparata so okončine in hrbtenica, vendar pa pri vzdrževanju statičnih in dinamičnih funkcij sodelujejo tudi drugi organi, npr. rep, glava in vrat.

5.3.1 Mehanski vplivi na potek gibanja

A) Težišče

Telo živali je pod vplivom sile težnosti, ki deluje na vse dele telesa. Položaj težišča je odvisen od oblike in drže telesa in ima velik vpliv na njegovo statiko in dinamiko. Težišče in obremenitev prednjih in zadnjih okončin pri živalih lahko določimo s posebno tehniko (*po Borelliju*). Položaj težišča in od tega odvisna obremenitev okončin sta odvisna od vrste živali, pasme in drže telesa. Težišče živali je v notranjosti prsnega koša, nad ksifoidnim podaljškom, pri človeku pa na področju medenične votline. Težišče pri konju in govedu leži relativno kavalno; prednje noge pri konju nosijo približno 58 % mase telesa, pri govedu pa 55 %. Pri psih prednje noge nosijo približno 62 % telesne teže (pri pasmi mali angleški hrt celo 79 %).

Položaj težišča in obremenitev nog ima velik pomen za stoji in gibanje živali. Glede na položaj težišča živali laže hodijo naprej kot nazaj. Z dviganjem glave in vratu se težišče pomakne nazaj, s spuščanjem pa naprej. Vpliv na položaj težišča ima tudi nošenje bremena ali vlečenje tovora. Pri delovnih konjih se npr. s spuščanjem glave in vratu težišče pomakne naprej, prednje noge so zato bolj obremenjene s težo telesa, z razbremenitvijo zadnjih nog pa se poveča njihova delovna moč. Pri dresurnih konjih pa se z dviganjem glave in vratu razbremenijo prednje noge. Tudi pri ustavljanju ob večji hitrosti se glava in vrat dvigneta in težišče pomakne nazaj.



Slika 5.6: Oporna ploskev in vpliv položaja glave na težišče konja

B) Oporna ploskev

Pri četveronožcih ima oporna ploskev obliko pravokotnika, katerega vogale predstavljajo podplatne ploskve okončin. Telo je v ravnotežju, če težiščnica pada na oporno ploskev. Če težišče živali ne leži natanko na sredini med prednjima in zadnjima nogama (v središču pravokotnika), bo žival vedno imela na razpolago dva alternativna podporna trikotnika, katerih vogale predstavljata dve nogi bližje težišču in ena bolj oddaljena (slika 5.6).

Stoječega četveronožca je razmeroma težko spraviti iz ravnotežja, dokler stoji na vseh štirih nogah. Takoj, ko stoji le na treh nogah, je oporna ploskev spremenjena v trikotnik in zmanjšana na polovico, zato je tudi ravnotežje manj stabilno (slika 5.6). Glede na položaj težišča je žival lažje vreči iz ravnotežja v stran, kar ima velik pomen pri podiranju velikih živali. Za razliko od četveronožcev je oporna ploskev pri dvonožcih (npr. človeku) majhna, težišče pa razmeroma visoko. Zato je za stajo na dveh nogah potrebno nekoliko večje mišično delo, večji nagibi človeka v stoji pa niso možni zaradi hitre izgube ravnotežja.

Da bi se lahko obdržalo ravnotežje pri stoji, je potrebna določena trdnost sklepov in mišično delo, zato se mišice ob tem utrujajo in je trajanje stoje omejeno. Kopitarji za razliko od drugih živali ne kažejo znakov utrujenosti ob stoji in lahko zelo dolgo stojijo ali celo spijo stoje, ker imajo okončine, zlasti prednje, pretežno fiksirane s tetivami in le malo z mišicami.

5.3.2 Ležanje

Ob ležanju je težišče najbližje oporni ploskvi, zato za ohranjanje ravnotežja mišično delo ni potrebno in si mišice najbolj odpočijejo. Živali običajno ne leže na hrbtu (kot človek) zaradi specifične zgradbe hrbtenice.

- **Konj** navadno leži bočno, glava in vrat sta dvignjena, okončine pa skrčene. Pri veliki utrujenosti se uleže popolnoma, okončine pa so skrčene ali iztegnjene.
- **Prežvekovalci** leže podobno kot konji, s tem da imajo glavo obrnjeno nazaj.
- **Prašič** leži popolnoma bočno.
- **Mesojadi** leže na različne načine, pogosto z glavo med trebuhom in okončinami, pri čemer je hrbtenica upognjena.

5.3.3 Spreminjanje položaja na mestu

Med gibanja, ki se odvijajo na mestu, štejemo leganje, vstajanje, vzpenjanje na zadnje noge in brcanje. Zanje je značilno, da se izvajajo z določenimi gibi in s specifičnim vrstnim redom, značilnim za določeno vrsto živali.

- **Leganje:** Konj skrči noge in se spusti na eno ali drugo stran, ob tem drži glavo in vrat visoko. Prežvekovalec spusti glavo, skrči prednje noge in se spusti na oba karpalna sklepa, potem pa pomakne zadnje noge čimbolj kranialno, jih skrči in se spusti na tla. Prašič, pes in mačka najprej skrčijo zadnje noge, nato pa prednje.
- **Vstajanje:** Konj se iz bočnega ležečega položaja namesti v trebušno-prsnega tako, da noge potegne pod trebuh, nato nagne glavo naprej in se dvigne najprej na prednje noge in potem na zadnje. Prežvekovalec izravna telo na skrčenih prednjih nogah, nato se dvigne na zadnje noge, potisne prednje naprej eno za drugo in se dvigne še s prednjimi. Prašič in mesojedi vstajajo podobno kot konj. Pes in mačka se lahko iz ležečega položaja takoj dvigneta na vse štiri noge.
- **Vzpenjanje na zadnje noge** se pri vseh samcih izvaja kot uvod v koitus, pri konjih ima obrambno funkcijo, vidimo pa ga lahko tudi pri mladičih med igro. Ob tem se zadnje noge pomaknejo pod telo, glava in vrat pa se dvigneta. S tem se težišče telesa pomakne nazaj. Z iztegnjenimi prednjimi nogami se žival dvigne na zadnjih. Tedaj je oporna ploskev zelo majhna, ravnotežje pa slabo. Za vzdrževanje ravnotežja je potrebno veliko naprezanje mišic, zato žival tega položaja ne vzdrži dolgo.
- **Brcanje** izvajajo konji in govedo v obrambne namene, in sicer z eno ali obema zadnjima nogama tako, da jih hitro in močno iztegnejo nazaj (konj) ali vstran in nazaj (govedo). Kadar se brcanje izvaja z eno nogo, se stabilnost ravnotežja zmanjša za polovico, zato se brcanje lahko prepreči z dviganjem noge na strani, kjer nas žival lahko brcne. Med brcanjem z obema zadnjima nogama (ritanje) se težišče s spuščanjem glave in vratu premakne naprej, zato ga lahko preprečimo, če glavo in vrat živali zadržimo, da je ne more skloniti. Ker konj brca običajno nazaj, pregledujemo njegove zadnje noge z bočne strani, pri govedu pa je treba stati zadaj, ker navadno brca vstran.

5.3.4 Hoja živali

Hoja je koordinirano gibanje okončin, ki poteka ponavljajoče se po določenem, za vsako vrsto hoje specifičnem zaporedju. Gibanje okončin spremlja gibanje različnih delov telesa, npr. nihanje glave, vratu, ušes in repa živali, ritmična nihanja hrbta), ki omogočajo sprotno uravnavanje težišča živali.

Premikanje naprej poteka z iztezanjem okončin, še zlasti zadnjih, pri čemer se težišče telesa pomika naprej. Različne faze gibanja posameznih okončin si sledijo hitro ena drugi, med posameznimi okončinami pa obstaja določen fazni zamik.

Ob hoji se vsaka posamezna okončina premika po določenem zaporedju gibov: stopalo se dotakne tal pred ramenskim (kolčnim) sklepom in ostane na tleh, dokler se ramenski (kolčni) sklep ne premakne pred stopalo; nato se odrine, dvigne in v zraku pomakne naprej ter pripravi za naslednji korak. Glede na to ločimo štiri faze gibanja okončine: fazo naslanjanja in fazo odzivanja, ko stopalo stoji na tleh, ter fazo dviganja in fazo lebdenja, ko je stopalo v zraku.



Slika 5.7: Faze gibanja prednjih okončin konja
(a) dviganje, b) lebdenje, c) naslanjanje, d) odiranje)

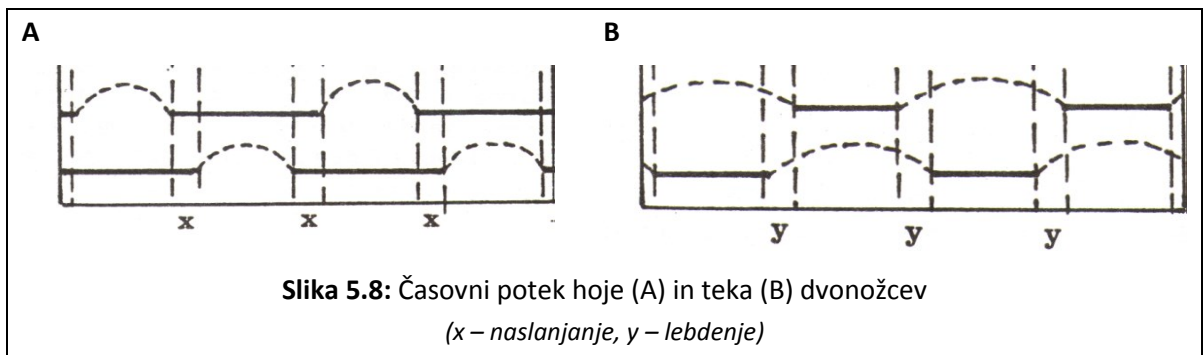
Pri živalih, ki hodijo po tleh, ločimo glede na hitrost gibanja hojo in tek, pri teku pa ločimo kas in galop. Različne oblike gibanja so najbolj proučene pri konju zaradi njegovega pomena v transportu in športu. Zato je tudi večina oblik hoje v nadaljnjem besedilu opisana pri konju, čeprav se pri drugih vrstah četveronožcev ne razlikujejo bistveno.

A) Hoja in tek dvonožcev

Dvonožci (človek, nekatere ptice) se izmenoma podpirajo z eno in obema nogama.

- **Pri hoji v koraku** ena noga (pasivna) stoji na tleh, druga (aktivna) pa se odrija, dviga in spusti na tla. Šele tedaj se vse ponovi z drugo nogo (aktivna in pasivna noga se zamenjata). Zato pri tej obliki gibanja ob vsakem koraku nastopi trenutek, ko sta obe okončini na tleh.
- **Pri teku** se izmenično ena noga dviga in lebdi, druga pa se opira na tla. Stopala se krajši čas dotikajo tal kot lebdi, zato ob vsakem koraku telo določen trenutek lebdi v zraku (pasivna noga se odrine, preden aktivna stopi na tla).

Drugi način gibanja nekaterih dvonožcev (kenguruji, nekatere vrste glodavcev in ptic) pa je sonožno poskakovanje.

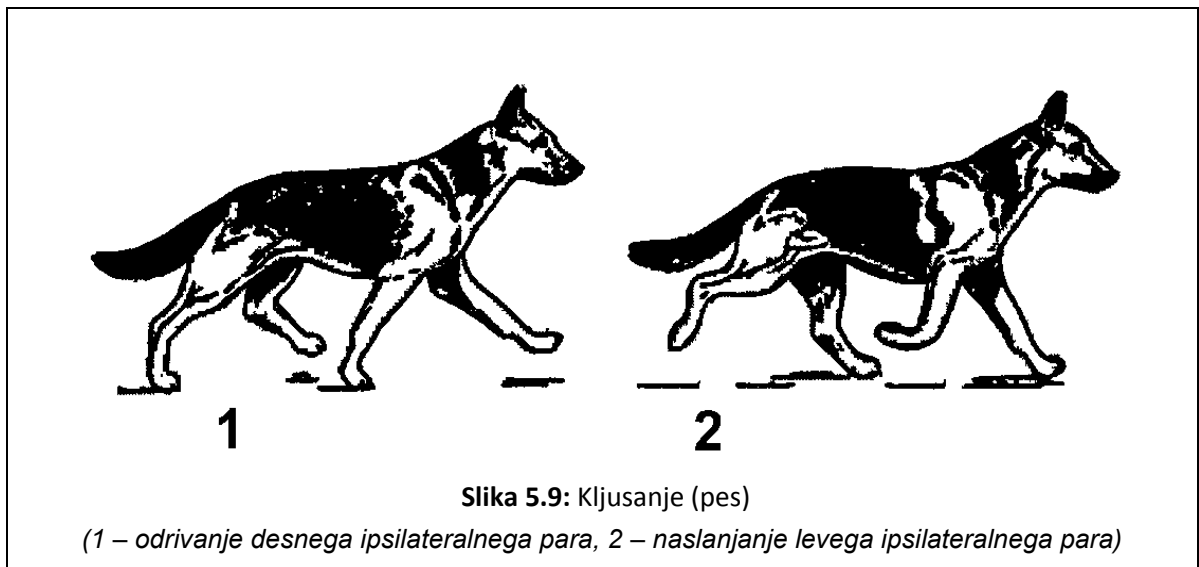


Slika 5.8: Časovni potek hoje (A) in teka (B) dvonožcev
(x – naslanjanje, y – lebdenje)

B) Kljusanje (pas)

To je najenostavnejše gibanje četronožcev, ki je značilno za kamele, slone, žirafe, bizone in gnuje. Pri konju je redko in ga lahko opazimo le pri nekaterih pasmah konj. Lahko ga opazimo tudi pri domačih mesojedih, kjer je običajno znak utrujenosti.

Ker pri tej obliki hoje prednja in zadnja noga iste strani izvajata iste, sinhronizirane gibe, govorimo o dvojno simetričnem hodu. Pri tej obliki gibanja vsak ciklus sestavljata dve obdobji naslanjanja in dve obdobji lebdenja, zato se v vsakem ciklusu slišita dva udarca kopit. Zanj je značilno izmenično nagibanje telesa levo in desno. Ob kljusanju se hitrost gibanja lahko spreminja brez spreminjanja vrstnega reda nog. Pri tem lahko konji presežejo tudi hitrost 50 km/h.

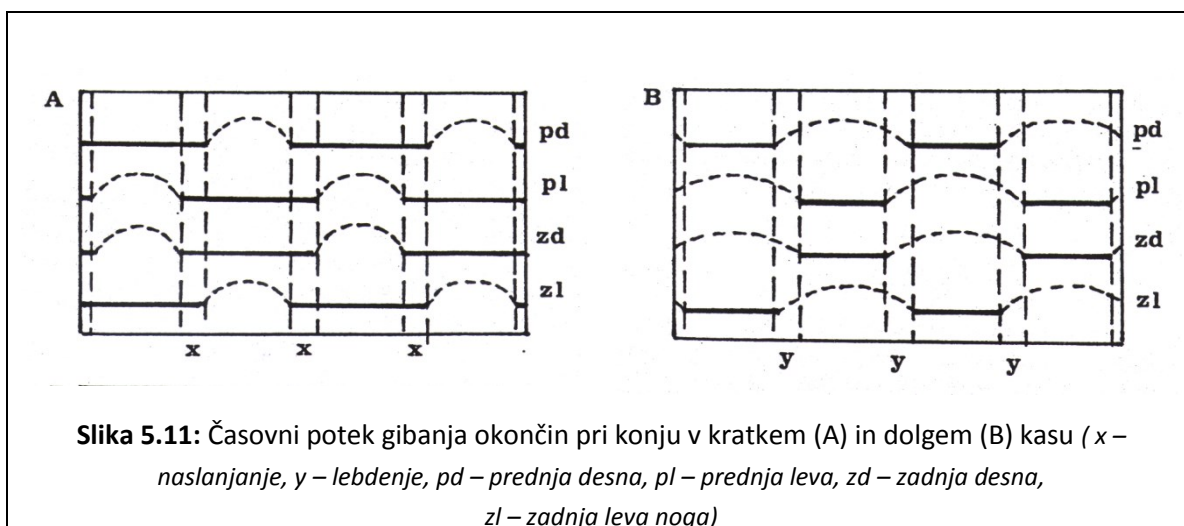
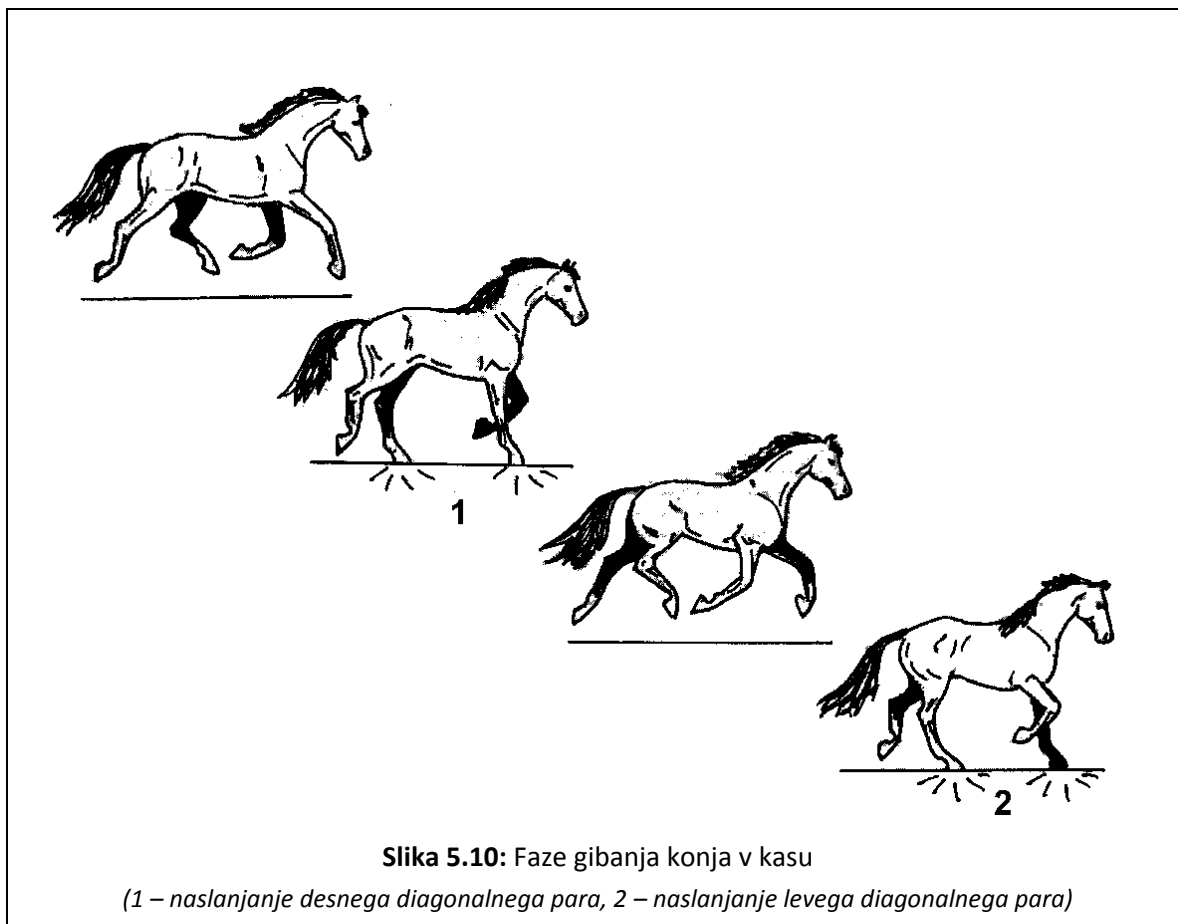


Slika 5.9: Kljusanje (pes)

(1 – odrivanje desnega ipsilateralnega para, 2 – naslanjanje levega ipsilateralnega para)

C) Kas

Tudi kas je dvojno simetrični hod, pri katerem sta hkrati aktivni diagonalni nogi. Tudi pri tej obliki gibanja vsak ciklus sestavljata dve obdobji naslanjanja in dve obdobji lebdenja (slika 5.10), zato se v vsakem ciklusu slišita dva udarca kopit. Dolžina koraka je 1,8 do 5,9 m, hitrost gibanja pa je povprečno 18 km/h (2,8 do 14,2 m/s oziroma 10 do 50 km/h). Glede na razmerje med časom naslanjanja in lebdenja ločimo štiri osnovne tipe kasa: delovni, srednji, pojačani in kratki kas. Pri kratkem kasu (slika 5.11 (A)) je faza naslanjanja daljša kot faza lebdenja, zato se v določenem trenutku vse štiri noge dotikajo tal. Pri pojačanem kasu (slika 5.11 (B)) pa naslanjanje traja krajši čas kot lebdenje, zato se v določenih fazah noge ne dotikajo tal, pač pa lebdi v zraku. Da bi bilo to možno, je potreben določen pospešek v višino, kar povzroča vertikalno nihanje telesa.



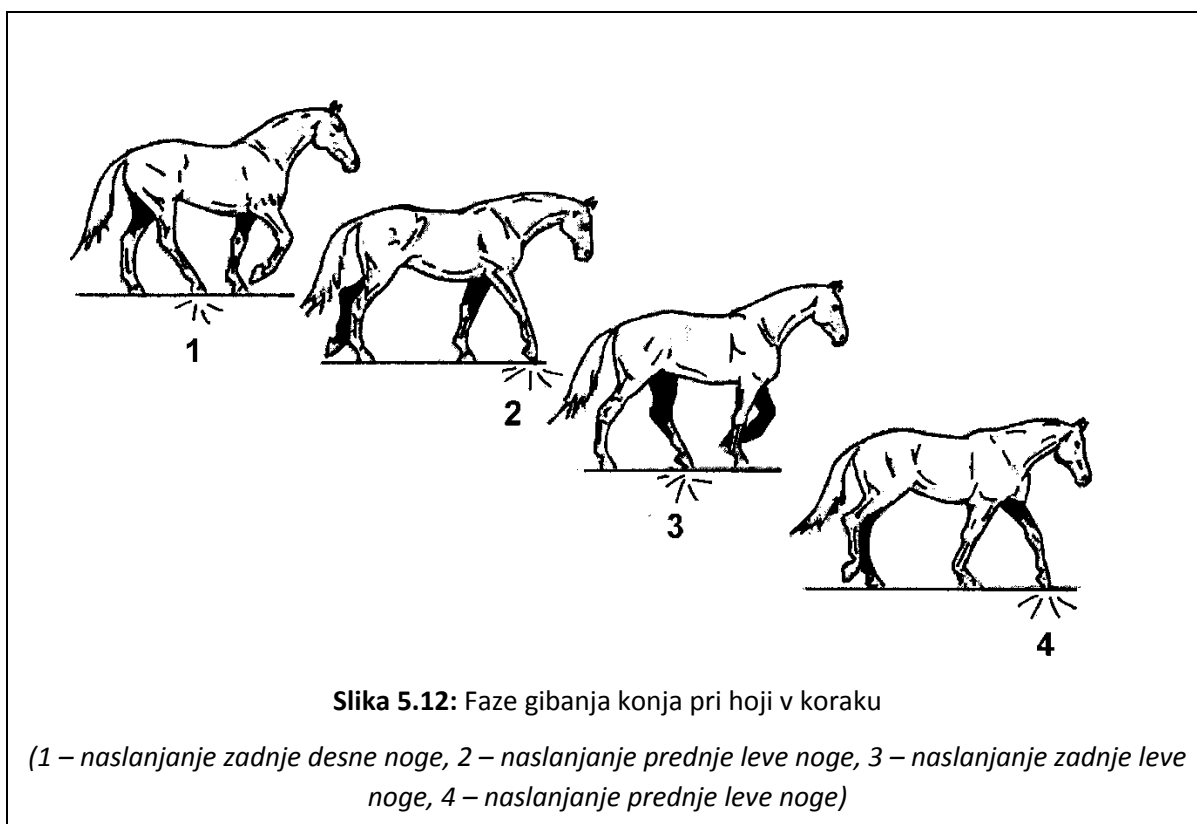
Č) Hoja v koraku

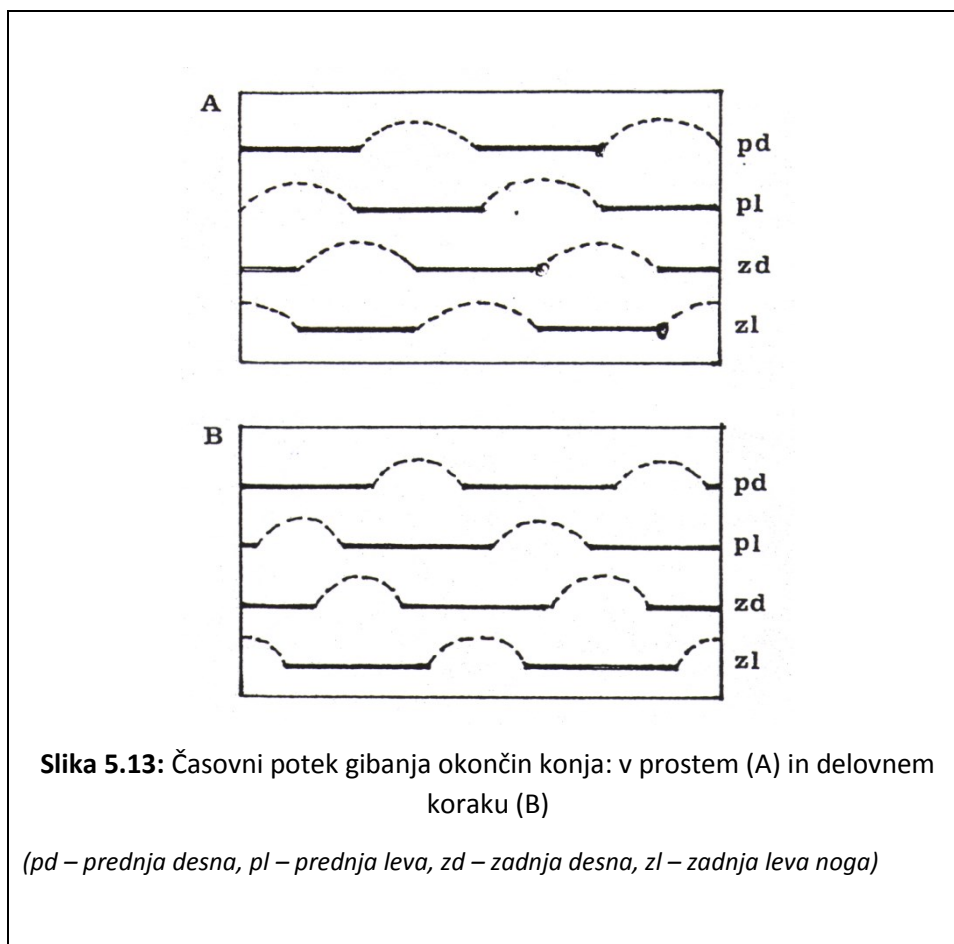
To je najpočasnejša oblika gibanja četveronožcev, pri kateri prednje in zadnje noge izvajajo enake gibe, vendar ne istočasno, pač pa s faznim premikom za približno pol koraka. Naslanjanje na tla je pri hoji v koraku vedno hkrati vsaj z dvema nogama, in to tako, da je med istostranskimi (ipsilateralnimi) naslanjanji vrinjeno eno diagonalno. Vrstni red je tak: ipsilateralni par, diagonalni par, ipsilateralni par druge strani, diagonalni par, ponovitev. Zato pri konju v koraku v vsakem ciklusu slišimo štiri udarce kopit (slika 5.12). Dolžina koraka pri tej vrsti gibanja je 1,2–1,8 m, hitrost gibanja pa je 1,2–1,8 m/s (4,3–6,5 km/h).

Glede na časovno razmerje med trajanjem faze lebdenja in naslanjanja ločimo svobodni in delovni korak. Nekateri avtorji pa razlikujejo kratki, okrepljeni, srednji in svobodni korak.

Pri svobodnem koraku (slika 5.13 (A)) fazi naslanjanja in lebdenja trajata enako dolgo, telo pa se v vsakem trenutku naslanja na dve nogi. Dolžina koraka je 1,3–1,8 m, hitrost je 6–7 km/h. Pri delovnem koraku (slika 5.13 (B)) pa je faza naslanjanja nog daljša kot faza lebdenja, zato se telo največ časa naslanja hkrati na tri noge. Hitrost gibanja je manjša kot pri prosti hoji.

Hoja nazaj je po načinu premikanja nog podobna kot kas: diagonalni par nog stopi skoraj hkrati nazaj in se dotakne tal, preden se od tal odrine drugi diagonalni par. Ta oblika gibanja vsem štirinožcem dela težave zaradi pomanjkanja vaje, strahu, šibkega mišičja prednjih nog in slabe kostne povezave med prednjimi nogami in trupom.



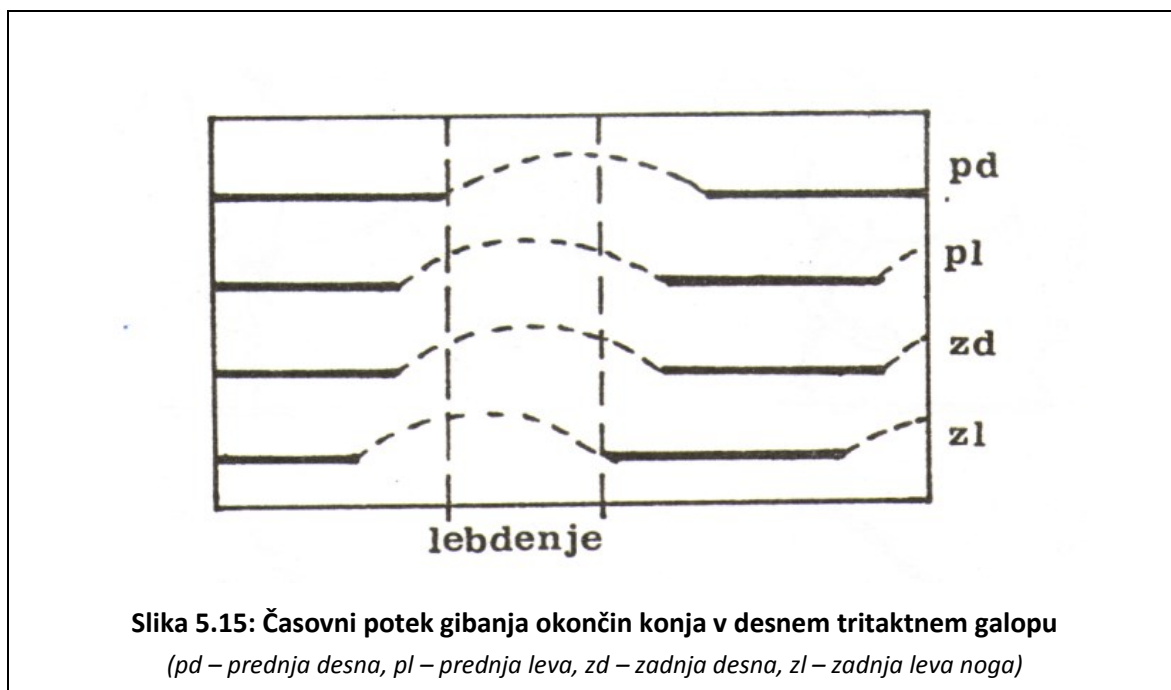
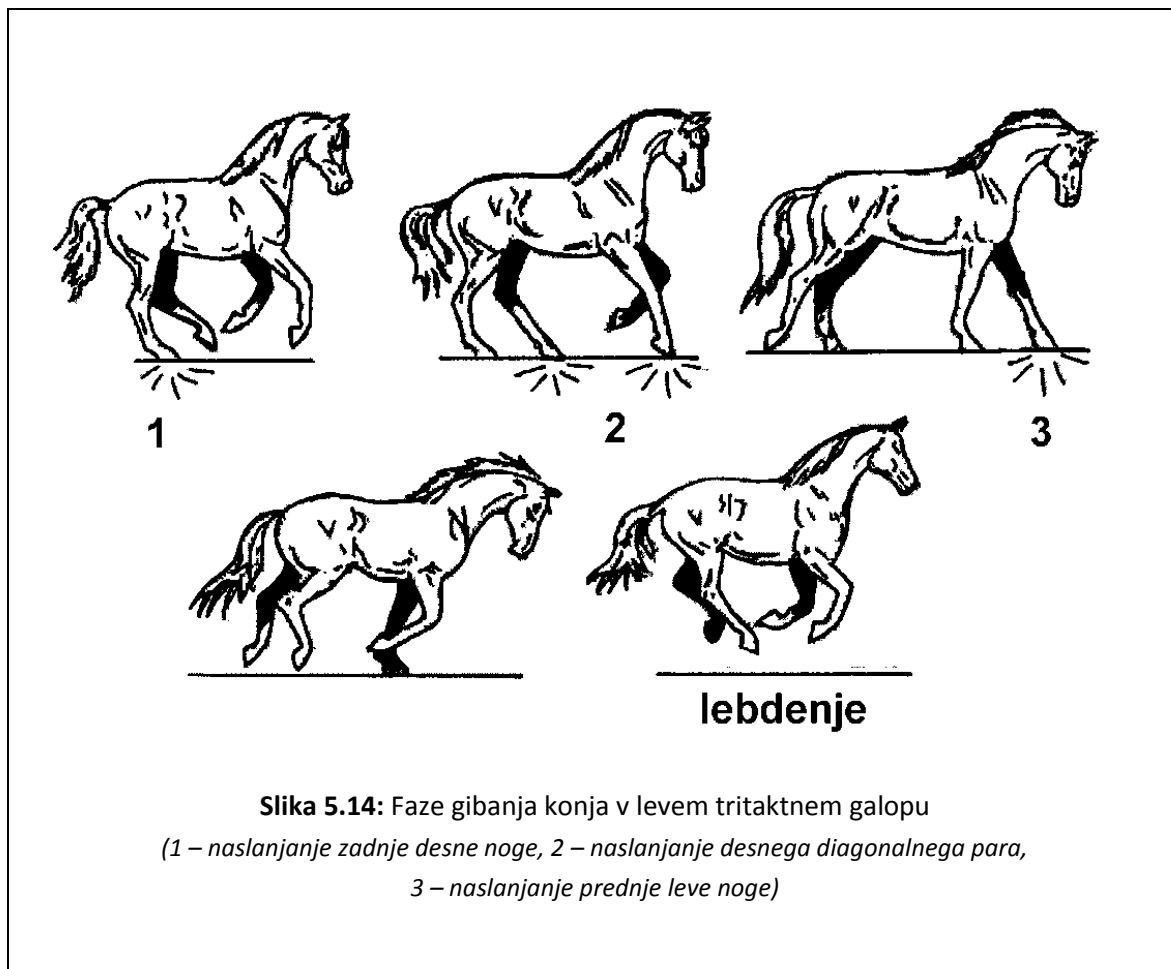


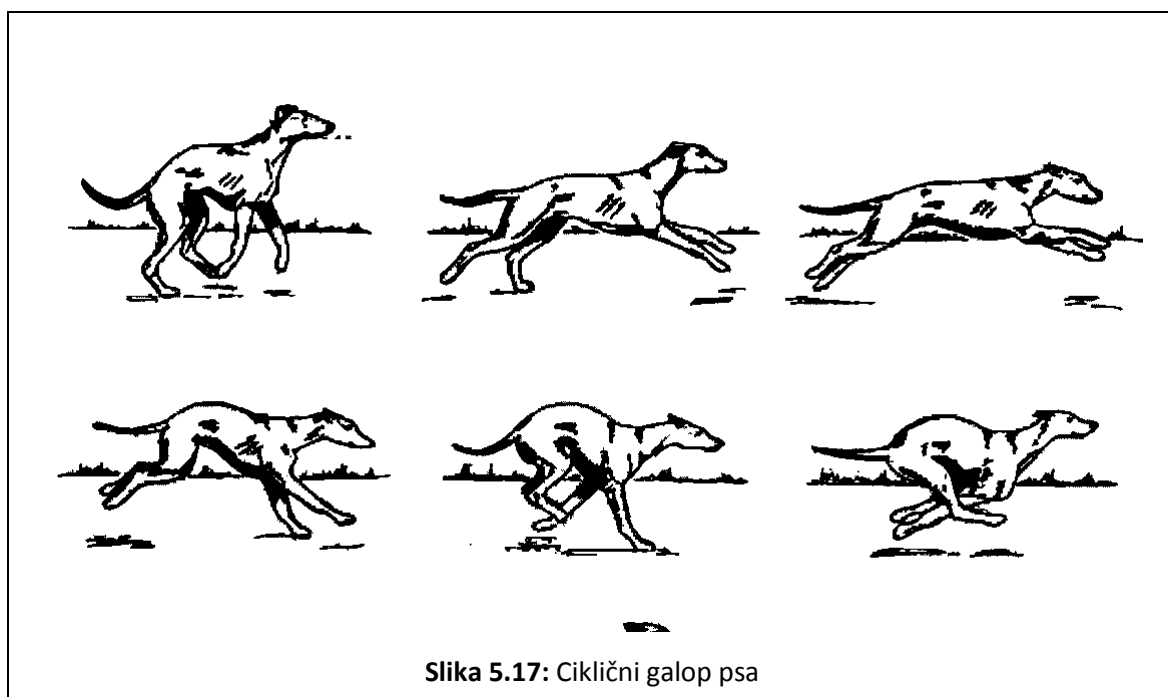
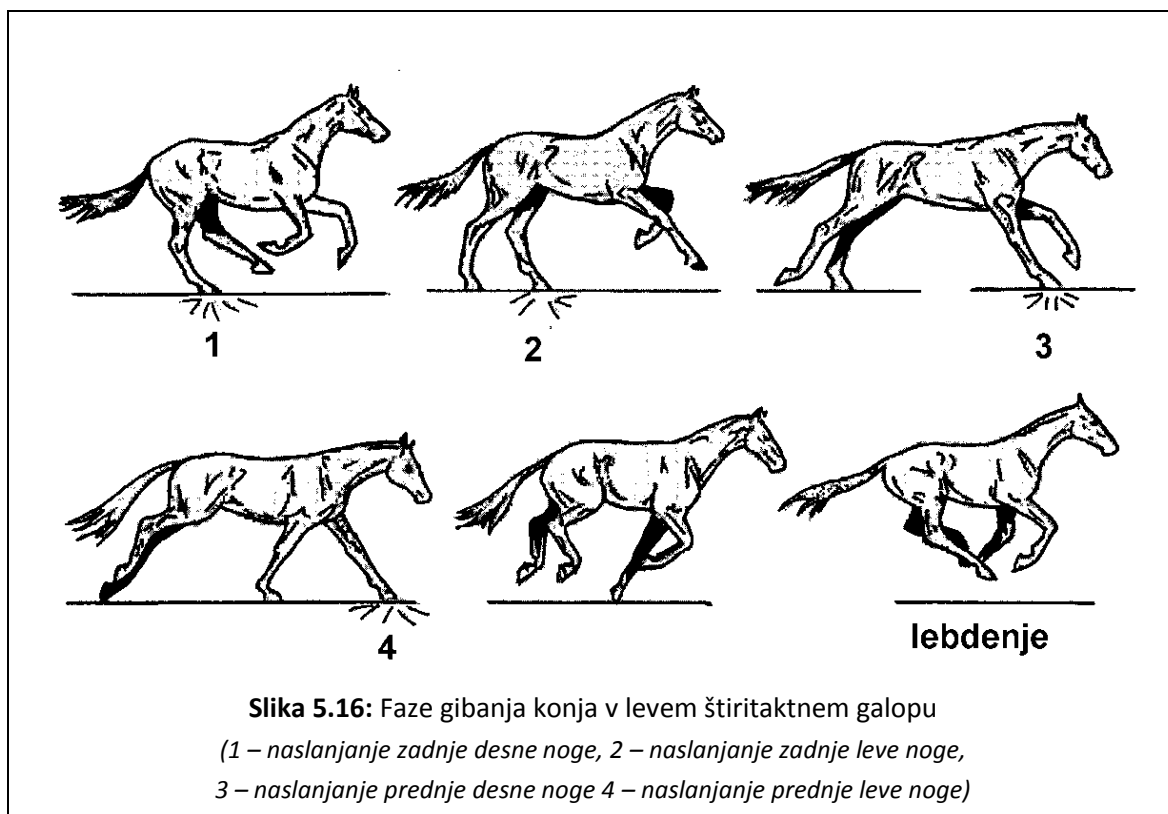
D) Galop

Pri galopu se noge gibljejo nesimetrično. Dviganje nog in spuščanje na zemljo poteka v naslednjem vrstnem redu: prva zadnja, druga zadnja in diagonalna prednja hkrati ter nazadnje druga prednja (slika 5.14). Pri tem gibanju telo znaten čas lebdi v zraku. Ker se diagonalni par nog giblje sinhrono, se pri galopu slišijo trije udarci (tritaktni – *canter* galop). Pri tej obliki galopa je pri konju dolžina korakov 2 do 4,5 m, hitrost gibanja pa 2,9 do 9 m/s (10,4 do 32,4 km/h). Vodeča prednja noga pri galopu je tista, ki zadnja zapušča tla. Ta noga se najbolj iztegne naprej in glede na to ločimo levi in desni galop.

Če se diagonalni pari ne gibljejo popolnoma sinhrono, pa se lahko slišijo štirje udarci (*grand* galop). Pri tej vrsti galopa (slika 5.16) pride do desinhronizacije diagonalnega para nog, ki ne stopi na tla hkrati, pač pa najprej z zadnjo, nato pa šele s sprednjo nogo. Od časovnega zamika med prednjo in zadnjo nogo diagonalnega para je odvisna dolžina koraka in s tem tudi hitrost galopa. Pri štiritahtnem galopu konji dosežejo dolžino korakov 4,5 do 7,2 m in hitrost pa 9 do 20 m/s (32,4 do 70 km/h).

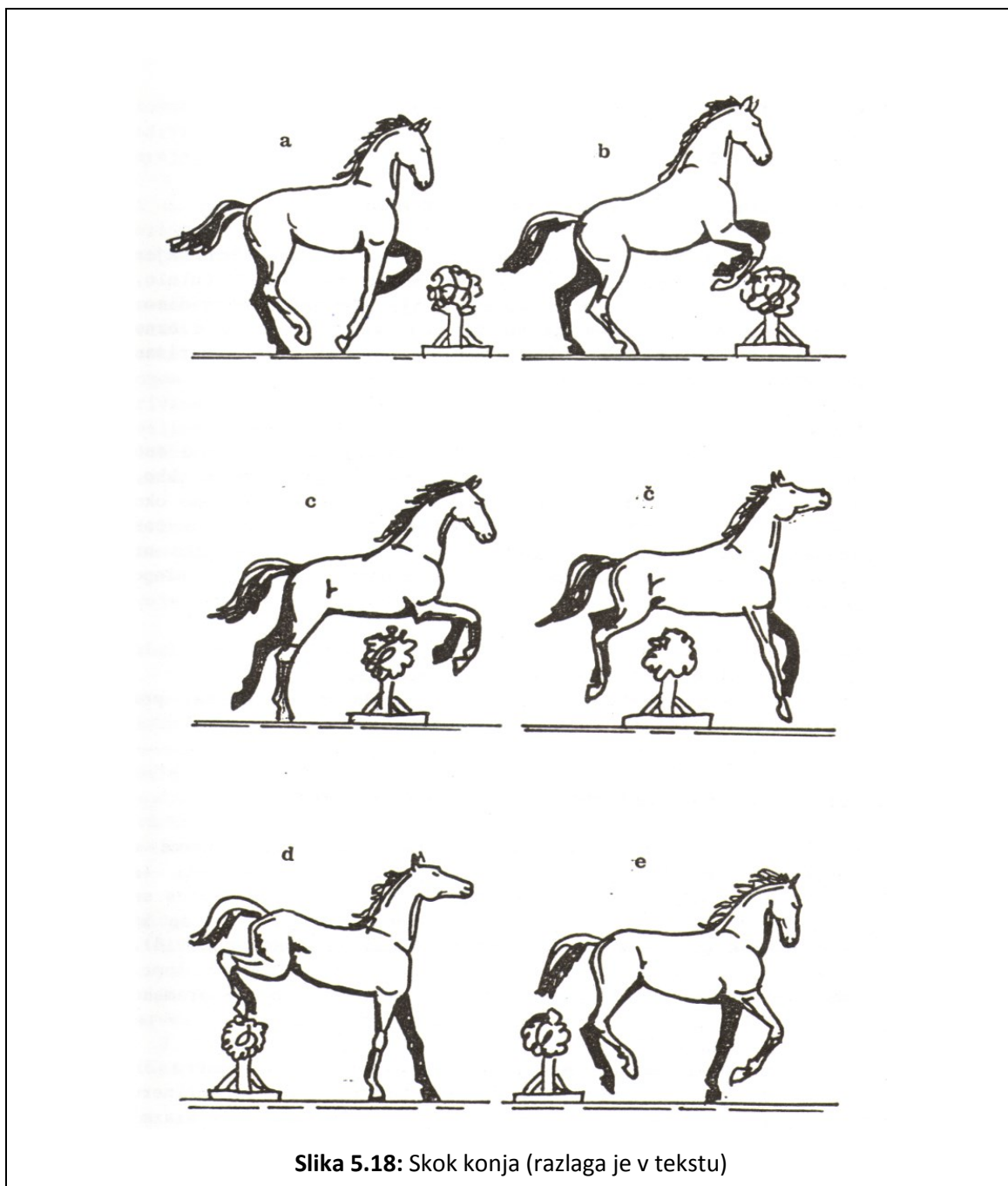
Glede na trajanje faze naslanjanja in lebdenja (slika 5.15) razlikujemo kratki (šolski) galop, pri katerem sta fazi lebdenja in naslanjanja enako dolgi, srednji galop, pri katerem je faza naslanjanja nekoliko krajša od faze lebdenja, in hitri galop, pri katerem je faza lebdenja znatno daljša od faze naslanjanja. **Pasji ali ciklični galop** (slika 5.17) sestoji iz skokov z zadnjih nog na prednje. Gibanje parov nog pri tem ni nujno popolnoma sinhronizirano. Tako galopirajo mali psi, mačke, večina glodavcev in prežvekovalci.





E) Skok konja

Lahko se opravi z mesta, iz različnih hodov, najlaže pa iz galopa. Konj se v galopu močno odrine z iztegnjeno prednjo nogo, tako da težišče pade na zadnji del telesa (sliki 5.18 (a) in (b)). Močno skrčene zadnje noge se naglo iztegnejo in dajo zalet za skok (slika 5.18 (c)). Prednje noge preidejo oviro v skrčenem položaju, nato pa se takoj iztegnejo in premikajo naprej. Pri doskoku se najprej dotakne tal prva iztegnjena prednja noga, nato druga prednja (slika 5.18 (č)). Maksimalno skrčene zadnje noge lebde nad zapreko in se dotaknejo tal, ko so jih prednje (ali vsaj ena prednja) že ponovno zapustile (sliki 5.18 (d) in (e)). Po skoku konj spet nadaljuje z galopom in lahko ponovno brez težav skoči čez naslednjo zapreko.



Slika 5.18: Skok konja (razlaga je v tekstu)

LITERATURA

- Cestnik V, Čebulj-Kadunc N: Poskusi in demonstracije v fiziologiji. Del 1. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1993.
- Cestnik V, Čebulj-Kadunc N: Poskusi in demonstracije v fiziologiji. Del 2. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1994.
- Cestnik V: Fiziologija domačih živali: uvod, splošna fiziologija, fiziologija krvi. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1993.
- Cestnik V: Fiziologija endokrinega sistema pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1996.
- Cestnik V: Fiziologija krvnega obtoka, dihanja, izločanja, urejanja pH in termoregulacije pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1995.
- Cestnik V: Fiziologija prebave pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1994.
- Cestnik V: Metabolizem pri domačih živalih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1995.
- Cotter SM: Hematology. 2nd ed. Jackson Hole, Wyoming: Teton NewMedia, 2001.
- Cunningham's textbook of veterinary physiology. 5th ed. St. Louis (Missouri): Elsevier Saunders, 2013.
- Dukes' physiology of domestic animals. 12th ed. Ithaca: Cornell University Press, 2004.
- Eades SC, Bounous DI: Laboratory profiles of equine diseases. St. Louis: Mosby, 1997.
- Engelking L, Rebar AH: Metabolic and Endocrine Physiology. Jackson Hole, Wyoming: Teton NewMedia, 2006.
- Farm animal metabolism and nutrition. Wallingford: CABI Publishing, 2000.
- Hlastala MP, Berger AJ: Physiology of respiration. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- Jain NC: Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- McLean JA, Tobin G: Animal and human calorimetry. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- Nemeč Svete A, Frangež R: Klinična biokemija v veterinarski medicini: učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2013.
- Osborne CA, Davis LS, Sanna J, Unger LK, O'Brien TD, Clinton CW, Davenport MP. Identification and interpretation of crystalluria in domestic animals: a light and scanning electron microscopic study. J Vet Med 1990; 85(1):18–37.
- Pivk B: Vaje iz hematologije [Elektronski vir]: delovni zvezek za 3. letnik srednje tehniške šole. Ljubljana: Center RS za poklicno izobraževanje, 2007.

LITERATURA

- Sjaastad ØV, Sand O, Hove K: Physiology of Domestic Animals. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, 2010.
- Stabler T, Peterson G: PhysioEx 5.0 laboratory simulations in physiology: with worksheets for human physiology. San Francisco: Benjamin Cummings, 2005.
- Zakon o zaščiti živali. Ur List RS 2013; 38: 1457 (3. 5. 2013)
- Zakon o meroslovju. Ur List RS 2005; 26: 892. (15.3.2005)
- Williams AG, Coleman GS: The rumen protozoa. New York: Springer-Verlag, 1992.