

Stephanie [REDACTED]
BTA-OH
Gruppe A
Partner: Martin [REDACTED]

Kurse vom
12./13.09. und
10./11.10.2002

„Blut“

(Hämatologie humanen Blutes)

Zoologisches Praktikum
Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

bei Dr. Kurrat

Handhabung und Untersuchung humanen Blutes

Theorie

Das Blut ist eine Sonderform des Bindegewebes. Als Körperflüssigkeit übernimmt es innerhalb unseres Blutkreislaufsystems viele lebensnotwendige Funktionen. An erster Stelle steht wohl die **Atmungsfunktion**: das Blut transportiert mit Sauerstoff beladenes Blut von der Lunge zu den Organen und mit Kohlenstoffdioxid beladenes Blut von dort wieder zurück zur Lunge. An zweiter Stelle steht die **Transportfunktion**: alle Nährstoffe wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette werden ebenso wie Hormone und Vitamine zu den Zellen transportiert. Durch die **Spülfunktion** des Blutes werden Abfallstoffe zu den verschiedenen Ausscheidungsorganen befördert. Das Blut erhält das lebenswichtige Säure-Base-Gleichgewicht (konstanter pH-Wert) des Körpers aufrecht = **Pufferfunktion**. Durch das Blut findet auch ein Wärmeausgleich statt: Wärme wird mit dem Blut im Körper verteilt (**Wärmetransport**). Und nicht zu vergessen ist natürlich die **Abwehrfunktion** des Blutes: Krankheitserreger werden erkannt und vernichtet.

Das Blut besteht aus zwei Komponenten, dem Blutplasma zu 56% und dem Blutserum zu 44%. Das **Plasma** ist die Substanz zwischen den Blutzellen. Sie besteht zu 90% aus Wasser, 10% sind im Wasser gelöste Stoffe:

- Glucose (80-100 mg%)
- Aminosäuren
- Harnstoff transportierte Stoffe
- Lactat
- Lipide (Cholesterin, Lecithin)
- Proteine (7%) = 4,5% Albumine
2,5% Globuline (0,5% Fibrinogen)
- Salze (1%) = Magnesium
Calcium
Natrium
Kalium
Chlorid
Bicarbonat

Aufgaben einiger Bestandteile:

- Glucose ist die wichtigste Energiequelle des Körpers
- Aminosäuren werden als Bausteine der Proteine immer benötigt
- Harnstoff ist ein Abfallprodukt der Niere und muß ausgeschieden werden
- Lactat ist ein Gärungsprodukt, welches bei Sauerstoffmangel gebildet wird
- Albumine binden Wasser; ohne sie kommt es zu Ödemen = Wassereinlagerungen im Gewebe
- das wichtigste Globulin ist das Fibrinogen; zu Fibrin aktiviert ist es ein Gerinnungsfaktor des Blutes
- die Salze spielen so viele Rollen, z.B. Na/K-Pumpe, Reizleitung (Aktionspotentiale), Muskelaktivität.....

Das **Serum** enthält die Blutzellen: Erythrocyten (rote Blutkörperchen), Leukocyten (weiße Blutkörperchen) und die Thrombocyten (Blutplättchen). Der prozentuale Anteil der Zellen im Verhältnis zum Plasma ist der **Hämatokrit**. Im Blutbild werden die zellulären Anteile mikroskopisch und photometrisch analysiert. Ermittelt man den prozentualen Anteil der Leukozyten, so spricht man von einem **Differentialblutbild**.

Aufgaben der einzelnen Zellarten:

1. Erythrocyten

- kernlose Zellen, zentral abgeplattet
- ~ 7 bis 8 µm Durchmesser
- Bildung im roten Knochenmark in den Plattenknochen (z.B. Becken); die Bildung wird aktiviert durch das Hormon *Hämopoietin*
- ein Erythrocyt lebt etwa 120 Tage; dann wird er durch die Milz aussortiert (= Blutmauser) und dort abgebaut
- als Abbauprodukt des Hämoglobins bleibt Bilirubin; es wird in der Leber abgebaut und wird über die Galle ausgeschieden
- die Aufgabe der Ery's ist der Sauerstofftransport mit Hilfe des Hämoglobins, was 90% der Zellen ausmacht
- Normalwerte
Männer ~ 5 Mio/µl
Frauen ~ 4,5 Mio/µl
- enthält das Blut zu wenig Ery's, so spricht man von *Blutanämie*; hierzu kommt es z.B. durch Eisenmangel, chronischen Blutverlust, Vitaminmangel, Krebserkrankungen und Knochenmarkserkrankungen
- bei *Polyglobulie* kommt es zu einer krankhaften Vermehrung der Ery's, z.B. bei Nieren- und Eierstockkrebs, bei Lungen und Herzerkrankungen
- von *physiologischer Polyglobulie* spricht man bei der Anpassung an den verringerten Sauerstoffgehalt im Gebirge
- bei *hämolytischer Anämie* werden die Zellen in erhöhtem Maße angebaut, z.B. bei Leukämie

2. Thrombocyten

- ebenfalls kernlos und scheibenförmig
- ~ 3 µm Durchmesser
- Überlebensdauer etwa 10 Tage nach Bildung im Knochenmark
- Thrombo's sind wichtig für die *Blutgerinnung*; sie registrieren, wenn Gefäße verletzt sind und verschließen diese wieder
- so wird verhindert, dass Blut verloren geht oder Keime in den Körper gelangen
- gleichzeitig werden Stoffe frei gesetzt, die die Blutgerinnung in Gang setzen: Serotonin und Gewebsthrombokinasen
- die Gerinnung sieht dann wie folgt aus:



1. Hauptphase *Prothrombin* → *Thrombin* (Hemmung durch Antithrombin)

2. Hauptphase *Fibrinogen* → *Fibrin* (Hemmung durch Plasmin)

Nachphase *Fibrin + Thrombocyten + Blutzellen ? Blutpfropf*

- Normalwerte: 140.000 – 440.000 Mio/µl
- bei Störungen der Funktion oder zu wenig Thrombo's kommt es zu einer verstärkten *Blutungsneigung*, z.B. durch Vitamin B12-Mangel, Strahlentherapie, Alkoholismus, Überfunktionen der Milz...
- bei stark erhöhter Thrombo-Anzahl besteht die Gefahr einer *Thrombose* = Bildung eines Blutgerinnsels
- zu leichteren Erhöhungen kommt es z.B. nach Operationen, in Schwangerschaften, durch Eisenmangel nach Blutverlust...

3. Leukocyten

- weiße Blutkörperchen sind die „Blutpolizei“, sie dienen der Abwehr von Krankheitsregern, sind also unser *Immunsystem*
- die Leukocyten gliedern sich in fünf Zellarten mit unterschiedlichen Aufgaben und unterschiedlichem Erscheinungsbild:

1. neutrophile Granulocyten
2. basophile Granulocyten
3. eosinophile Granulocyten
4. Monocyten
5. Lymphocyten; hier unterscheidet man zwischen:

T-Lymphocyten

- steuern die Abwehr
 - 1. Prägung in der Kindheit und Jugend im Thymus
 - Auswanderung in die Lymphknoten
 - 2. Prägung auf ein spezifisches Antigen Immunoblasten
- Gedächtniszelle Immunocyten
- aktivieren T-Helferzellen, dadurch 1. Prägung des B-Systems

B-Lymphocyten

- bilden freie AK
 - 1. Prägung im Knochenmark (bone-marrow)
 - Auswanderung in die Lymphknoten
 - 2- Prägung auf ein spezifisches Antigen Immunoblasten
- Gedächtniszellen Plasmazellen
- aktivieren Suppressorzellen, dadurch wird das T-System gebremst

- die Lymphocyten sind das *spezifische Immunsystem* unseres Körpers
- die vier anderen Zelltypen werden zum *unspezifischen Immunsystem* zusammengefasst

Die Gesamtblutmenge eines Menschen beträgt etwa 8% seines Körpergewichtes. Bei einem normalgewichtigen Erwachsenen entspricht das etwa **5,5 Litern Blut**. Ein plötzlicher Blutverlust von etwa 1/3 der Blutmenge kann verkraftet werden. Das Blut regeneriert sich innerhalb von 48 Stunden. Ein Blutverlust von bis zu 40% führt zum Mangelschock. Es überlebt nur noch die Hälfte aller Patienten. Ein Blutverlust von mehr als 50% führt zum Tode. Blutverlust kann man durch **Bluttransfusionen** ausgleichen.

Ebenso kann man heute viele Organe von einem Organismus in einen anderen transplantieren. Man differenziert:

analoge Transplantationen	vom Menschen auf sich selbst, z.B. Hauttransplantationen
heterologe Transplantationen	vom Tier auf den Menschen
homologe Transplantationen	von Mensch zu Mensch

Transfusionen und Transplantationen können jedoch nicht beliebig durchgeführt werden. Unsere Blutzellen enthalten agglutiable Substanzen (**Agglutinine**). Dies sind Antikörper, die 4 unterschiedliche Antigeneigenschaften haben können. Dadurch ist humanes Blut in **4 Blutgruppen** unterteilt:

Antigen	Antikörper	Blutgruppe	Merkmal
Faktor A	Anti B	A	-/-
Faktor B	Anti A	B	-/-
Faktor AB	-/-	AB	Unversalempfänger
-/-	Anti AB	0	Universalspender

Der Faktor A liegt in den Varianten A_1 und A_2 vor. Bei Blutgruppe A_2B wird in 26% aller Fälle Anti A_1 gebildet, bei Blutgruppe A_2 in 1-2% aller Fälle. Hier muss man also besonders gründlich die Blutgruppe bestimmen, da eine Transfusion mit A_1 zur Agglutination führen könnte. Deshalb führt man vor einer Transfusion immer eine **Kreuzprobe** durch: Spenderblut wird mit Empfängerblut gemischt. Ist der Test in Ordnung, kann das Blut übertragen werden.

Vermischt man Blut unterschiedlicher Blutgruppen, so kommt es zu Verklumpungen. Nach Transplantationen muß man die Immunreaktion auch unterdrücken, wenn der Spender die gleiche Blutgruppe hatte. Immundepressiva verhindern eine Abstoßung des transplantierten Organs.

Ein weiteres Merkmal des Blutes ist der **Rhesusfaktor**. Er kann positiv oder negativ sein, also vorhanden, oder nicht! Es handelt sich um ein Protein, welches in der Glykokalyx der Erythrocyten lokalisiert ist:

Rh ⁺	-/-
rh ⁻	Anti D (= Anti Rh ⁺)

Der Rhesusfaktor spielt besonders für rh⁻-Frauen eine Rolle, die Kinder haben möchten: ist der Partner positiv, so wird das Kind ebenfalls positiv. Während der Schwangerschaft bildet die Mutter Antikörper gegen den Rhesusfaktor. Bei einer weiteren Schwangerschaft würden diese Antikörper den Embryo angreifen und schädigen.

Bei Blutuntersuchungen werden kleine Mengen Blut venös oder (seltener) arteriell abgenommen. Für Einzelbestimmungen wie z.B. Blutzucker wird auch ein Tropfen Kapillarblut verwendet. Mit dem Blut werden unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt: Blutaussstrich, Blutbild, Blutgerinnung, Blutsenkung, Hämatokrit u.a. Im Praktikum habe wir einige dieser Untersuchungen an unserem eigenen Blut durchgeführt.

Material

Geräte:

Objektträger
Dauerpräparate eines Blutausstrichs mit Panoptischer Färbung
Blutlanzetten Solofix, steril von Braun
Kunststoffspatel FlexiStrip von Bivex N.V.
Hämatokrit-Versiegelungskitt von Brand
Mikro-Hämatokritröhrchen, Na-heparinisiert von Brand
Färbebank

Chemikalien:

May-Grünwald-Lösung, Eosin-Methylenblau von Merck (giftig)
Giemsa-Lösung, Azur Eosin-Methylenblau von Merck (giftig)
Aqua dest.
Anti-AB, Serumtest von Diamed AG, CH
Seraclone Anti A, Serumtest von Biotest AG
Seraclone Anti B, Serumtest von Biotest AG

1. Blutausstrich

Methode

- mit einer Blutlanzette wird eine Kapillare einer gut durchbluteten Fingerkuppe angestochen
- 2-3 Tropfen Kapillarblut werden auf eine Spitze eines sauberen, fettfreien Objektträgers getropft
- ein Kunststoffspatel wird auf die der freien Fläche des Objektträgers zugewandte Seite des Blutstropfens im 40°-Winkel an diesen angesetzt, sodass eine Verbindung zwischen Spatel und Blut entsteht
- nun wird der Tropfen hinter dem Spatel her gleichmäßig über den Objektträger ausgestrichen
- das Blut sollte maximal $\frac{3}{4}$ des Objektträgers bedecken
- es sollten keine Banden entstehen (durch Ruckeln oder Absetzen)
- der Ausstrich wird an der Luft getrocknet

Ergebnis

Das Ausstreichen hat gut funktioniert. Auf diese Weise erhielt ich drei Objektträger mit einer Blutprobe, die ich im nächsten Versuchsteil benutzen konnte.

2. Färbung des Blutausstriches mit panoptischer Färbung

Methode

- die Ausstriche werden waagrecht auf die Färbebank gelegt
- Ausstriche mit May-Grünwald-Lösung bedecken, 3 Min. einwirken lassen
- kurz mit Aqua dest. abspülen und mit frischem Aqua dest. bedecken
- 3 Min. einwirken lassen
- nochmals mit Aqua dest. spülen
- Aqua dest abkippen
- Objektträger mit Giemsa-Lösung bedecken und 15 Min. einwirken lassen
- von der Seite her mit Aqua dest. abspülen
- Ausstrich schräggehend trocknen lassen
- Unterseite des Objektträgers mit EtOH reinigen

Auswertung

Die Blutausstriche wurden makroskopisch betrachtet relativ gut angefärbt. Unter dem Mikroskop erkannte man jedoch, dass die Kerne nicht so deutlich angefärbt waren, wie in den älteren Präparaten, die uns zur Verfügung standen. Wahrscheinlich war die May-Grünwald-Lösung nicht mehr frisch genug oder zu stark verdünnt. Die Erythrocyten waren gut angefärbt.

3. Differentialblutbild

Methode

- ein mit der panoptischen Färbung angefärbter Ausstrich wird bei 1000facher Vergrößerung unter dem Ölimmersinsobjektiv scharf eingestellt
- man sucht den äußersten Rand der dünnenschichtigen Ausstrichseite (Endstück); die Erythrocyten sollten einzeln liegen
- nun fährt man mäanderförmig über den Objektträger und zählt die Leukocyten nach folgendem Muster aus:

Zellart	stabk.	neutro.	eosino.	baso.	Mono.	Lympho.
Anzahl der Zellen (immer 10 pro Reihe)						
Summe = %						

- die Zellen unterscheiden sich anhand ihrer Struktur und ihrer Färbung
- da man 100 Zellen auszählt, entspricht das Endergebnis dem prozentualen Anteil der Zellen im Blut

Auswertung

Eine Auszählung meines Bluteausstriches ergab folgedes Ergebnis:

Zellart	stabk.	neutro.	eosino.	baso.	Mono.	Lympho.
Anzahl der Zellen (immer 10 pro Reihe)		### I			II	II
		###	II		I	II
		IIII	II		I	IIII
		### III	I			I
	I	IIII				###
	II	II				### I
		### III				II
	I	### II				II
		### II				IIII
		I	IIII			I
Summe = %	4	52	9	0	5	30

Die regulären Werte für ein gesundes Diferenzialblutbild schwanken in der Literatur ziemlich. Im allgemeinen kann man von folgenden Normalwerten ausgehen:

stabkernige	0-5%
neutrophile	40-80%
eosinophile	0-6%
basophile	0-2%
Monocyten	1-12%
Lymphocyten	15-50%

Mein Blutbild war zu diesem Zeitpunkt also ziemlich gesund. Lediglich die eosinophilen waren leicht erhöht, was aber auch ein Zählfehler sein kann (Zellen mehrfach gezählt).

Ich habe die Zellen auch photographiert und gezeichnet, wobei die Bilder meiner Leukocyten wie schon erwähnt nicht so gut angefärbt waren wie die Dauerpräparate. Im einzelnen konnte man folgende Zelltypen gut unterscheiden (siehe Photos und Zeichnungen):

1. neutrophile Granulocyten =

~ 14 µm Durchmesser
Segmentkern mit 3-4 Segmenten
feine, farblose Granula
50-80 %
phagozytieren Bakterien und
Gewebetrümmern, vorallem in Lunge und
Milz
Hauptbestandteil des Eiters

2. eosinophile Granulocyten =

~ 14 µm Durchmesser
bisegmentierter Kern
mit Eosin gefärbte Granula (rot)
2-4 %
Vernichtung von Antigen-Antikörper-

Komplexen (Fremdeiweiße),
Gegenspieler der Monocyten
Inaktivierung von Histamin

3. basophile Granulocyten =

~ 14 µm Durchmesser
meist unsegmentierter Kern
Granula blaugrün, oft klebsartig
0,5-1 %
Bildung von Histamin (fördert lokal die Durchblutung)
Bildung von Heparin
Gegenspieler der eosinophilen G.

4. Monocyten =

~15-20 µm Durchmesser
nierenförmiger Kern, oval, gelappt
Azurgranula am Rand (vereinzelt)
2-8 %
Phagozytose (Teil des Reticulo-Endothelialen-Systems = RES = alle phagozytierenden Zellen)
können das Blut verlassen
aktivieren die Lymphocyten
fördern mit den basophilen G. allergische Reaktionen

5. Lymphocyten =

~ 6-10 µm kleine L.
~ 11-16 µm große L.
Kern füllt fasst die ganze Zelle aus
viele Azurgranula nahe der Zellwand
25-40 %

In den Photos erkennt man gut, dass die Nucleoli blau-violett angefärbt sind. Sie wurden durch die basischen Farbstoffe Methylenblau und Azur II gefärbt. Die Proteine des Cytoplasmas und das Hämoglobin hingegen sind rosa-rot. Sie wurden durch den sauren Farbstoff Eosin gefärbt.

4. Hämatokrit
Durchführung

- 2-3 Tropfen Kapillarblut werden mit einer Hämatokritkapillare aufgenommen, bis diese zu etwa $\frac{3}{4}$ gefüllt ist
- die Kapillare enthält Heparin, welches eine Gerinnung des Blutes verhindert
- das blutfreie Ende der Kapillare wird mit Versiegelungskitt verschlossen
- nun wird das Blut 15 Minuten bei etwa 8000 upm zentrifugiert
- das Serum wird so vom Plasma getrennt, es entstehen zwei Phasen
- der Anteil der Zellen zum Plasma wird in mm abgelesen und in Prozent umgerechnet

Auswertung

Die meisten Hämatokritröhrchen sind in der Zentrifuge kaputt gegangen. Eines jedoch konnten wir retten und auswerten:

Volumen insgesamt= 17 mm
Volumen Zellen = 8 mm

Das entspricht einem Hämatokritwert von $(100 / 17) * 8 = 47,06 \%$. Es handelte sich um Männerblut. Der Hämatokrit sollte bei Männern etwa zwischen 42-50% liegen. Unser Mann war also gesund. Bei Frauen liegt der Wert bei 37-45%.

5. Blutgruppenbestimmung

Durchführung

- 3 Kammern der Testplatte werden mit den Testseren Anti A, Anti B und Anti AB gefüllt
- in jede der Kammern wird ein Tropfen Blut gegeben
- mit einem Glasstäbchen wird das Blut vermischt
- hat man Blutgruppe (BG) A, so verklumpt das Serum Anti A und Anti AB
- hat man BG B, so verklumpt das Serum Anti B und Anti AB
- hat man BG 0, so verklumpt kein Serum
- bei BG AB verklumpen alle Seren

Auswertung

Bei meinem Blut ist keins der Seren verklumpt. Ich habe also Blutgruppe 0. Das Ergebnis kann ich bestätigen, da ich aus Laboruntersuchungen weiß, dass ich 0 Rh⁺ habe.