

Eesti koolinoorte 58. bioloogiaolümpiaad

Histoloogia praktiline töö



Eesnimi:

Perekonnanimi:

Juhendaja: Rudolf Bichele

Ülesanne 1

Veri ja vererakud (25,5 punkti)

Veri on paljude loomade spetsialiseeritud sidekude, mis transpordib metaboliite mööda organismi. Veri koosneb plasmast ja erinevat tüüpi vererakkudest. Käesoleva ülesande praktilises osas tutvud sa erinevate vererakkude tüüpidega, lisaks vastad erinevatele vere ja rakkudega seotud teooriaülesannetele.

Vajalikud vahendid:

- alusklaas laialimääritud ja fikseeritud terve inimese vereprooviga
- katteklaas
- glütserool
- Pasteuri pipetid
- kummikindad
- värvimisvann
- lahus 1 (roheline)
- lahus 2 (punane)
- lahus 3 (sinine)
- dest. vee pesupudel
- paberkäterätid
- värvipliatsid ja harilik pliats

Kõik värvimiseks vajalikud vahendid asuvad selleks ettenähtud töökohal. Teosta oma värvimine seal ja ära vii värvimiseks kasutatavaid vahendeid oma töölauale!

Kõik preparaadid on sulle antud ühes korduses ja ebaõnnestumise korral ei saa nendele küsida asendust. Veendu, et sa oled tööjuhendiga tutvunud enne töö alustamist.

Töö käik:

- 1) Märghista oma preparaat: kirjuta hariliku pliiatsiga klaasi valgele matile osale oma nimi. **OLULINE: preparaat peab olema korrektselt tähistatud. See korjatakse lõpus ära ja seda hinnatakse.** Värvimiseks aseta klaas värvimisvanni kohale, vererakud ülespoole. Pane kätte kummikindad!
- 2) Kanna pipetiga preparaadile **paar tilka lahust 1 (et preparaat oleks kaetud)**, oota umbes **5 sekundit** ja raputa klaas värvimisvanni kohal puhtaks (pesta/loputada ei ole vaja)
- 3) Kanna klaasile **umbes 0,5 mL lahust 2**. NB! Lahus 2 jääb esialgu preparaadile tilgana ja ei valgu iseenesest laiali. Raputa õrnalt klaasi, et värv kataks seda enam-vähem ühtlaselt, lase toimida **5...10 sekundit** ja raputa liigne värv vanni.
- 4) Kanna klaasile **paar tilka lahust 3**, hoia peal **5...10 sekundit** ja raputa liigne värv vanni
- 5) **Pese klaas** hoolikalt vanni kohal **destilleeritud veega**, raputa maha suuremad tilgad ja **lase** preparaadil **õhu käes kuivada**
- 6) Kui preparaat on kuivanud, aseta preparaadile **1-2 tilka glütserooli** ning **kata preparaat katteklaasiga**

1.1. Uuri oma preparaati mikroskoobi all. Kasutades 400x suurendust (40x objektiivi), joonista selleks ettenähtud kastidesse üles järgnevad raku tüübid:

- neutrofiil
- monotsüüt
- lümfotsüüt

Kõikide rakkude puhul joonista võrdluseks kõrvale mõni erütrotsüüt, et anda korrektselt edasi rakkude suhteline suurus. Tähistage igal joonisel raku osad, mida sa näed ja oskad tuvastada. Kasuta jooniste tegemiseks harilikku pliiatsit ja värvipliiatseid. Ära kasuta pastakat! (13 punkti)

Neutrofiil (joonis)

rakk õigesti tuvastatud +1p (ei ole – 0p)

preparaadi värvimine õnnestunud +2,5p (täielikult ebaõnnestunud 0p, enam-vähem 1p)

joonis arusaadav ja joonistatud raku suhteline suurus õige, ruum optimaalselt kasutatud +1,5p (kirbusitt joonis -0,5p, raku suhteline suurus vale -0,5p)

iga õigesti tuvastatud rakustruktuur joonisel +0,5p

Monotsüüt (joonis)

Lümfotsüüt (joonis)

Vasta oma preparaadi põhjal ja oma teadmistele tuginedes järgnevatele küsimustele.

1.2. Sea oma preparaadil tuvastatud rakud suhtelise sageduse järgi ritta (1 – kõige sagedasem, 2 – keskmise sagedusega, 3 – kõige madalama sagedusega). Kirjuta allolevasse tabelisse igale rakutüübile vastav number. (1,5 punkti)

Rakutüüp	Sagedus
Neutrofiil	1
Monotsüüt	3
Lümfotsüüt	2

1.3. Mis oleks peamine vaadeldav erinevus, kui sa teeks samasuguse preparaadi linnu verest? (1 punkt)

- A. Linnu veres ei oleks näha lümfotsüüte
- B. Linnu veres oleks peamiseks immuunrakkude tüübiks basofiilid
- C. Linnu erütrotsüütides oleks näha tuumad
- D. Linnu immuunrakud oleks sarnaselt erütrotsüütidele samuti enamuses tuumata rakud
- E. Linnu veres oleks näha rohkearvuliselt megakarüotsüüte

Õige vastus (kirjuta kasti õigele vastusele vastav täht):

C

1.4. Milline järgnevatest kofaktoritest on vajalik gaaside (ennekõike O_2) hemoglobiin-vahendatud transpordiks erütrotsüütides? (1 punkt)

- A. Fe^{2+}
- B. Mg^{2+}
- C. Cu^{2+}
- D. Fe^{3+}
- E. Ca^{2+}

Õige vastus (kirjuta kasti õigele vastusele vastav täht):

A

- 1.5. Haiglasse toimetati patsient, kelleks on 12-kuu vanune poiss ning kellel diagnoositi bakteriaalne kopsupõletik. See on juba tema neljas selline nakkus viimase kuue kuu jooksul ja arstid on mures poisi tervisliku seisundi pärast, eriti kuna samas perekonnas on kolm tervet tüdart. Poisi vanemad (kes on mõlemad terved) kaotasid paari aasta eest oma esimese poja 10 kuu vanuselt samuti bakteriaalse kopsupõletiku tagajärjel. Lisaks on perekonna ajaloost teada, et poisi ema venna ainus poeg suri kolmeaastasena infektsiooni tagajärjel. Järgnevalt on toodud väljavõtte haige poisi vereanalüüsist:

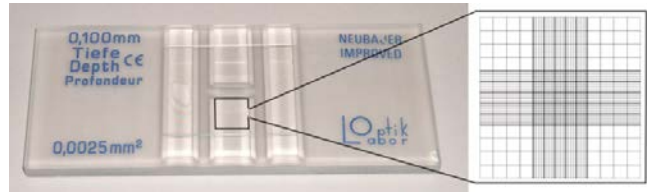
	Patsient	Referentsväärtuse vahemik
Erütrotsüüdid	4,2	3,5 - 5,6 × 10 ¹² / L
MCV*	80	71 - 90 fL
Hematokrit	38	31 - 44%
Hemoglobiin	116	106 - 145 (g/L)
Trombotsüüdid	220	145 – 390 × 10 ⁹ / L
Leukotsüüdid	15	6 - 17 × 10 ⁹ / L
Neutrofiilid	5,6	1,5 - 8,5 × 10 ⁹ / L
Monotsüüdid	1,2	0,2 – 1,4 × 10 ⁹ / L
Eosinofiilid	0	0,0 - 1,0 × 10 ⁹ / L
Basofiilid	0	0,0 - 0,2 × 10 ⁹ / L
CD3 (kõik T-lümfotsüüdid)	93,5	59,4 - 84,6 %
CD4/CD8 suhe	1,14	0,9 - 3,6
B-lümfotsüüdid	0,02	6,4 - 22,6 %
IgG	10	170 - 1069 mg / dL
IgM	8,4	41 - 173 mg / dL
IgA	6,0	11 - 106 mg / dL

*MCV – keskmine erütrotsüüdi ruumala

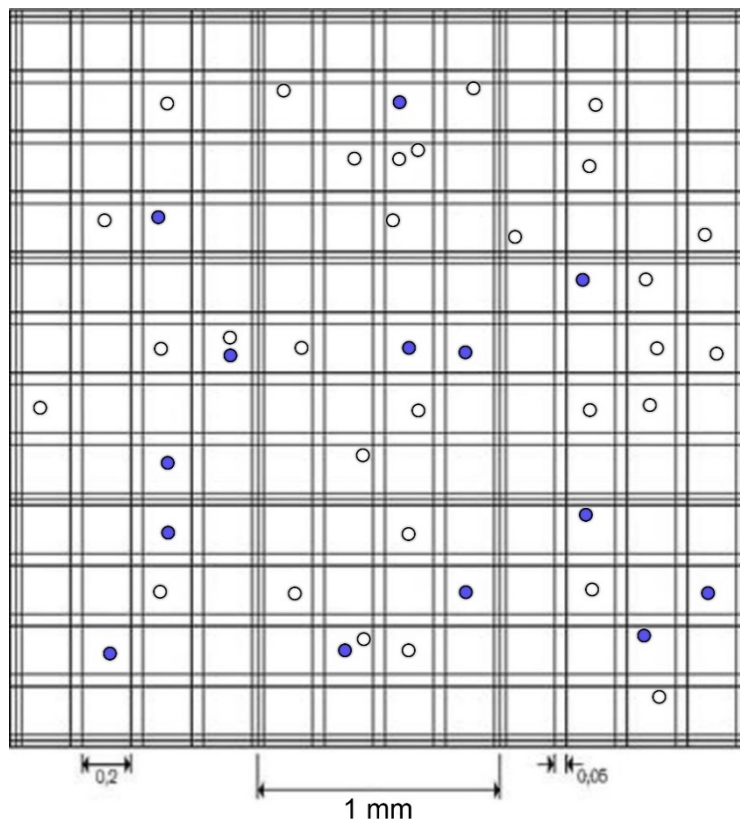
Otsusta, kas järgnevad väited poisi tervisliku seisundi kohta on õiged või valed. Tee märge vastavasse tabeli lahtrisse. (5 punkti)

Väide	Õige	Vale
Poisi haigus on seotud immuunsüsteemi hüperaktiivsusega		X
Käesoleval patsiendil on tõenäoliselt HIV nakkus		X
Patsient on värskest läbi põdenud parasiitnakkuse, mis on jäänud diagnoosimata		X
On alust arvata, et tegu on Y-liitelise geneetilise haigusega		X
Poisi sümptomid on tingitud spetsiifiliste antikehade ja neid tootvate rakkude puudulikkusest	X	
Patsiendil on aneemia		X
Patsiendil ei ole aratavasti probleeme vere hüübimisega	X	
Haigust põhjustab suure tõenäosusega retsessiivne mutatsioon	X	
Käesoleva patsiendi ravi peaks edaspidi keskenduma poisi loomuliku (kaasasündinud) immuunsuse parandamisele		X
Poisi tüümus töötab arvatavasti normaalselt	X	

- 1.6. Elus rakkudega tegelevates laborites on sageli vaja hinnata rakkude arvukust ja elulemust. Üks levinumaid vahendeid selle jaoks on nn hemotsütomeeter – klaasist loenduskamber rakkude suspensiooni tiheduse määramiseks. Tsütomeeter koosneb kahest osast: paks alusklaas, mille pinnale on graveeritud täpne ruudustik ning selle kohale paigaldatav katteklase. Katteklaasi ja ruudustikuga alusklaasi vahele jääb kindla paksusega vedeliku kiht, nii et meil on täpselt teada ruudustiku joonte vaheline kaugus ja vedelikukihi paksus. See võimaldab kindlal ruudustiku pinnal oleva rakkude arvu põhjal arvutada välja rakkude hulga kindlas ruumalas lahuses (rakkude kontsentratsioon).



Oletame, et oled asunud tööle laborisse, kus vastutad rakkude kasvatamise eest. Et hinnata, kas sa peaks ühte oma rakukultuuridest ümber külvama, pead määrama rakkude tiheduse selles kultuuris. Rakud kasvavad Petri tassil 10 mL söötmes. Korjad tassilt kogu söötme koos rakkudega, võtad ühtlaselt läbisegatud raku suspensioonist 10 μL ja pipeteerid selle proovi eraldi tuubi. Rakkude elulemuse hindamiseks lisad väljavõetud 10 μL raku suspensiooni tilgale 40 μL trüpaansinise värvi (see vitaalvärv siseneb ainult katkise rakumembraaniga rakkudesse), kannad osa oma proovi loenduskambris ja uurid seda mikroskoobi all. Loenduskambris on vedelikukihi paksus alusklaasi ja katteklaasi vahel 0,1 mm. Sulle avaneb järgmine pilt:



Arvuta, mitu elus raku oli algupäraselt sinu Petri tassis. Esita täispikk lahenduskäik. (4 punkti)

Tee arvutused siin:

Lahenduskäik:

kokku 30 elus raku 9 ruudu kohta (elus rakud õigesti kokku loetud 0,5p)

ühe suure ruudu (kolme joonega piiratud) pindala 1 mm^2

täispindala 9 mm^2

vaadeldava lugemiskambri ruumala $9 \times 0,1 = 0,9 \text{ mm}^3 = 0,9 \text{ }\mu\text{L}$ (1p)

rakkude kontsentratsioon $30/0,9 = 33,3 \text{ raku}/\mu\text{L} = 33\,333 \text{ raku}/\text{mL}$ (arvutus 1p, teisendus 0,5p)

algne rakkude kogus $33\,333 \times 10 = 333\,333 = 3,3 \times 10^5$ elus raku (õige vastus 1p)

Vastus: algselt oli Petri tassis elus raku

Ülesanne 2

Torujad organid (30 punkti)

Kõik värvimiseks vajalikud vahendid asuvad selleks ettenähtud töökohal. Teosta oma värvimine seal ja ära vii värvimiseks kasutatavaid vahendeid oma töölauale!

Kõik preparaadid on sulle antud ühes korduses ja ebaõnnestumise korral ei saa nendele küsida asendust. Veendu, et sa oled tööjuhendiga tutvunud enne töö alustamist.

Käesolevas töös pead sa uurima nelja koelõiku, mis on tehtud erinevatest torujatest organitest. Kõik koelõigud kujutavad endast organite ristlõike (mitte ükski ei ole pikilõik). Organid, kust sulle antud koelõigud pärinevad, on järgmised: **trahhea, söögitoru, õõnesveen** ning **aort**. Kõik organid pärinevad rotist ning on seetõttu märkimisväärselt väiksemad, kui nende inimese vasted, kuid oma ehituselt on nad sarnased.

Sul tuleb koelõigud värvida ning tuvastada, millisest organist need pärinevad. Oma tööd planeerides arvesta, et **värvimise peale kulub umbes 35-45 minutit!**

A	B	1/2
---	---	-----

Alusklaasil on kaks poolt. Koelõigud asuvad samal klaasi poolel, kuhu on kirjutatud klaasi number (1 või 2). Hilisemate küsimuste juures arvesta, et koelõikude nummerdus jälgib ülaltoodud skeemi. Kummagi alusklaasi peal on kaks koelõiku. Näiteks lõik koodiga 1-B on parempoolne lõik klaasil number 1 (kui klaas on pööratud numbri ja koelõikudega ülespoole ja number jääb paremale poole).

Vajalikud vahendid:

- kaks alusklaasi koelõikudega (tähistatud 1 ja 2)
- 2x katteklaas
- glütserool
- Pasteuri pipetid
- kummikindad
- värvimisvann
- fiksaatori lahus (tähistatud FIX)
- hematoksüliin (H)
- eosiin (E)
- preparaadihoidik kraaniveega
- dest. vee pesupudel
- paberkäterätid
- värvipliatsid ja harilik pliats

Töö käik:

- 1) Märgista oma preparaati: kirjuta harilikult pliitsiga klaasi valgele matile oma nimi. **OLULINE: preparaadid peavad olema korrektselt tähistatud. Need korjatakse lõpus ära ja neid hinnatakse.** Värvimiseks aseta klaas värvimisvanni kohale, koelõik ülespoole. Pane kätte kummikindad!
- 2) Kanna pipetiga lõikudele **paar tilka fiksaatori lahust (FIX)** ja jäta toimima **10 minutiks**. Lahus ei pea katma tervet klaasi - piisab sellest, kui lahus katab vahetult koelõiku ennast.
- 3) Raputa maha fiksaatori lahus, **pese** oma preparaati õrnalt **destilleeritud veega** ja raputa maha suuremad veetilgad.
- 4) Kanna koelõikudele **paar tilka hematoksüliini lahust (H)** ja jäta toimima **10 minutiks**.
- 5) Raputa hematoksüliini lahus värvimisvanni ja **loputa** oma preparaati õrnalt **aeglaselt voolava kraanivee all**.
- 6) Aseta oma preparaati **kraanivett täis preparaadihoidikusse** ja jäta see sinna **10 minutiks**.
- 7) Eemalda oma preparaati preparaadihoidikust (võid kasutada pintsette) ja raputa maha suuremad veetilgad.
- 8) Aseta preparaati tagasi värvimisvanni kohale. **Lisa** preparaadile **paar tilka eosiini (E)**, lase toimida **10-20 sekundit**, pärast mida raputa liigne värv vanni.
- 9) **Pese** oma preparaati **hoolikalt destilleeritud veega**, raputa maha suuremad veetilgad ja **lase** sellel paar minutit **õhu käes kuivada**
- 10) Kui preparaati on kuivanud (mõni väike veetilk võib veel peal olla), aseta preparaadile **paar tilka glütserooli ning kata preparaati katteklasisiga**. Soovituslik on kanda üks tilk glütserooli vahetult kummagi koelõigu peale.

2.1. Uuri oma preparaate mikroskoobi all. Kasutades sobivat suurendust, tee selleks ettenähtud kastidesse skemaatilised joonised sinu poolt värvitud koelõikudest. Tuvasta, mis organist antud koelõik pärineb (kirjuta see lahtrisse "ORGAN"). Märgi joonisele ka summaarne suurendus, millega joonis tehtud on.

Tähista igal joonisel organi osad alltoodud kudede loetelust, mida sa oskad oma preparaadilt tuvastada. Tähistage igal preparaadil mingi kude ainult siis, kui see on olemas! (kokku 21 punkti)

- endoteel
- silelihaskude
- vöötlihaskude
- ripsepiteel
- sarvestumata lameepiteel
- sarvestunud lameepiteel
- elastne sidekude
- kõhrkude
- luukude

Koelõik 1-A

organ õigesti tuvastatud +1p (ei ole – 0p)

koelõigu värvimine õnnestunud +2p (täielikult ebaõnnestunud 0p, enam-vähem 1p)

joonis arusaadav, ruum optimaalselt kasutatud +1p (kirbusitt joonis -0,5p, suurendus märkimata -0,25)

iga õigesti tuvastatud kude joonisel + 0,5p

ORGAN:

Koelõik 1-B

ORGAN:

Koelõik 2-A

ORGAN:

Koelõik 2-B

ORGAN:

2.2. Varajases embrüonaalses arengus on eristatavad kolm lootelehte – ektoderm, mesoderm ja endoderm – millest igaüks panustab kindlate kudede arengusse. Vaatleme sinu poolt uuritavaid organeid. Millistest lootelehtedest need arenevad? Tee mäрге alloleva tabeli vastavasse lahtrisse, kui antud lootelehest pärit rakud panustavad kindla organi arengusse. (3 punkti)

Organ	Ektoderm	Mesoderm	Endoderm
Trahhea		X	X
Söögitoru		X	X
Õõnesveen		X	
Aort		X	

2.3. Millist rakustruktuuri/millist koe osa värvib hematoksüliin? (1 punkt)

- A. tsütoplasma
- B. tuum
- C. Golgi kompleks
- D. kollageenikiud
- E. limanäärmed

Õige vastus (kirjuta kasti õigele vastusele vastav täht):

B

2.4. Millised järgnevalt loetletud haigustest mõjutavad otseselt sinu poolt tuvastatud organeid? Tee mäрге vastavasse tabeli lahtrisse, kui antud haigus kindlat organit mõjutab. Iga haigus võib mõjutada ühte, mitut või mitte ühtegi nendest organitest. (5 punkti)

Haigus	Trahhea	Söögitoru	Õõnesveen	Aort
Ateroskleroos				X
Vähk	X	X	X	X
Hepatiit C				
Gastroösofageaalne refluks		X		
Tuberkuloos	X			