

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ

ФГБОУ ВО «БРЯНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра нормальной и патологической
морфологии и физиологии животных



Физиология и этология животных

Система крови

для студентов 2-го курса института ветеринарной
медицины и биотехнологии
по специальности 36.05.01 Ветеринария
очной и заочной формы обучения

Брянск 2018

УДК 636:612.1(07)
ББК 28.673
О 34

Овсеенко, Ю. В. **Система крови:** учебно-методическое пособие для студентов 2-го курса института ветеринарной медицины и биотехнологии по специальности 36.05.01 Ветеринария очной и заочной формы обучения / Ю. В. Овсеенко, Е. А. Кривопушкина, Е. В. Горшкова. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2018. - 50 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов 2-го курса института ветеринарной медицины и биотехнологии по специальности 36.05.01 Ветеринария очной и заочной формы обучения.

Рецензент: заведующая кафедрой эпизоотологии, микробиологии, паразитологии и ВСЭ, доктор биологических наук, профессор Е.В. Крапивина

Рекомендовано к изданию методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ протокол № 4 от 26 февраля 2018 г.

- © Брянский ГАУ, 2018
- © Овсеенко Ю.В., 2018
- © Кривопушкина Е.А., 2018
- © Горшкова Е.В., 2018

ВВЕДЕНИЕ

Система крови один из наиболее важных разделов физиологии и этологии животных. Изучение этого раздела необходимо для понимания процессов, происходящих в клетках, тканях, органах, системах органов и целостном организме, для разработки мер профилактики и лечения ряда заболеваний.

В ходе изучения этого раздела студенты приобретают навыки гематологических исследований и умения анализировать полученные результаты.

Данные учебно-методические указания помогут студентам самостоятельно выполнить лабораторные работы, более тщательно готовиться к коллоквиуму и экзамену, а в дальнейшем помогут в изучении клинических ветеринарных дисциплин.

В ходе изучения дисциплины «Физиология и этология животных» реализуются следующие компетенции ОК-1, ОК-7, ПК-2, ПК-4.

Приведенные работы, предусмотрены программой, в соответствии с ФГОС ВО по специальности 36.05.01 утвержденным приказом Минобрнауки РФ от 3 сентября 2015 г. № 962.

В результате изучения дисциплины студент должен:

Знать: Закономерности осуществления физиологических процессов и функций, их качественное своеобразие в организме млекопитающих и птиц, продуктивных сельскохозяйственных животных, домашних, лабораторных и экзотических животных на уровне клеток, тканей, органов, систем и организма в целом, с учетом влияния условий окружающей среды, технологии содержания, кормления и эксплуатации.

Уметь: Использовать знания физиологии и этологии при оценке состояния животного, самостоятельно проводить исследования на животных.

Владеть: Знаниями и навыками по исследованию физиологических функций, методами наблюдения и эксперимента.

Работа 1. Способы и техника взятия крови

Кровь (гр. *haima*) - разновидность соединительной ткани, составляющая вместе с лимфой и тканевой жидкостью внутреннюю среду организма.

Кровь в организме выполняет следующие функции: дыхательную (перенос кислорода от легких к тканям и от тканей углекислого газа к легким); питательную (перенос питательных веществ); выделительную (удаление продуктов обмена); гомеостатическую (через кровь осуществляется гуморальная регуляция деятельности органов и систем органов); защитную (фагоцитоз и образование антител); терморегуляторную (поддержание температуры тела).

Количество крови у разных видов сельскохозяйственных животных неодинаково. Так, у птиц оно составляет 90-120, лошадей 85-100, крупного рогатого скота 65-85, мелкого рогатого скота 70-90, свиней 65-80 (у сальных пород 45-50), пушных зверей 55-60, рыб 30-40 мл на кг живой массы. У человека 77-80 мл/кг.

Взятие крови производят с целью исключения инфекционных (бруцеллёз, лейкоз, лептоспироз) и инвазионных (мониезиоз, эхинококкоз, стронгилоидоз и др.) заболеваний, установления диагноза, выявления скрыто протекающих патологических процессов, оценки гомеостаза и происхождения животных.

Ход работы. У моногастричных животных кровь берут до кормления в утренние часы, у жвачных животных, имеющих непрерывное пищеварение, - в любое время (для проведения биохимических исследований - до кормления или спустя 4-6 часов после кормления).

Место взятия крови при необходимости освобождают от шерсти, обрабатывают антисептическими средствами (70 % раствор этилового спирта, хлоргексидин, 5% раствор йода и др.). После взятия крови место пункции (прокола) обрабатывают названными антисептиками. При использовании многоразовых игл их предварительно стерилизуют путем кипячения в дистиллированной воде в большом стерилизаторе не менее 45 минут. Пробу крови можно отбирать специальными вакуумными системами или обычными одноразовыми шприцами.

При взятии крови в шприц, переносить ее следует в пробирку сразу и медленно, не трясти (предотвращая вспенивание). Пробирки должны быть подписаны.

Кровь хранится не более 6-8 часов при комнатной температуре, 24 часа в холодильнике. Замораживать цельную кровь нельзя. Приготовление мазков производят в течение 1-2 часов после взятия крови. Сыворотка или плазма должны быть отделены как можно быстрее. Хранится сыворотка или плазма, в зависимости от требуемых для исследования показателей, от 30 минут (при комнатной температуре) до нескольких недель в замороженном виде (размораживать пробу можно только 1 раз).

Небольшое количество крови у лошадей и крупного рогатого скота можно получить путем прокола инъекционной иглой краевой ушной вены. Для получения большого количества крови производят пункцию яремной вены кровопускательной иглой в средней трети шеи. Предварительно необходимо ниже места пункции наложить резиновый жгут или сдавить вену большим пальцем левой руки, проколоть иглой кожу и стенку вены. Кровь собирают в стерильный сосуд аккуратно по стенке.

У крупного рогатого скота кровь можно получить из хвостовой вены. Для этого берут хвост рукой (в области средней трети) и медленно поднимают вертикально вверх. Иглу вводят на уровне 2-5 хвостового позвонка по линии, идущей вдоль хвоста и делящей его на две симметричные части под углом 90° и на глубину 0,5-1 см.

У свиней кровь берут из ушной вены, кончика хвоста, глазного синуса и передней полой вены. При взятии крови из ушной вены ее предварительно зажимают у корня уха. При получении крови из хвостовой вены надрезают или отсекают кончик хвоста (1-1,5 см), после получения крови рану дезинфицируют, и кончик хвоста перетягивают бинтом на одни - двое суток.

У собак и кошек большое количество крови получают из плюсневой вены, расположенной на наружной поверхности голени, для чего животное кладут на бок, конечность сдавливают рукой или жгутом ниже коленного сустава. Волосы на месте взятия крови выстригают, кожу протирают этиловым спиртом. Небольшое количество крови получают путем прокола мягкой части ступни.

У птиц небольшое количество крови получают путем скарификации гребня, сережек, мякоти ступни. Большое количество получают путем прокола подкрыльцовой вены, расположенной на внутренней поверхности крыла. Для этого в области локтевого сгиба выщипывают перья, сдавливают вену и делают

прокол. Место прокола протирают противосвертывающей жидкостью, т.к. у птиц кровь быстро свертывается.

Контрольные вопросы

1. Перечислите функции крови.
2. Количество крови у разных видов сельскохозяйственных животных.
3. С какой целью берут кровь у животных?
4. Способы и техника взятия крови у сельскохозяйственных животных.
5. Как хранят кровь, сыворотку, плазму?

Работа 2. Получение цельной (стабилизированной) крови, плазмы, сыворотки, дефибринированной крови и фибрина

Кровь состоит из жидкой части плазмы и взвешенных в ней форменных элементов - эритроцитов, лейкоцитов и кровяных пластинок (тромбоцитов). Кровь, в которую добавлены вещества, препятствующие ее свертыванию (антикоагулянты), называется цельной (или стабилизированной). При центрифугировании цельной крови (или отстаивании) происходит разделение ее на форменные элементы и плазму.

Плазма жидкая часть крови соломенно-желтого цвета (составляет примерно 60 % объема крови). Плазма крови, лишенная белка фибриногена, называется сывороткой.

Фибриноген, выпадающий в осадок при свертывании крови, называется фибрином. Количество фибриногена в крови составляет 0,2-0,4 %. Кровь, лишенная белка фибриногена, называется дефибринированной (она не свертывается).

Ход работы. Для предохранения крови от свертывания необходимо перед взятием добавить в пробирку один из следующих антикоагулянтов: гепарин (2 капли неразведенного аптечного гепарина на пробирку), лимоннокислый или щавелевокислый калий (или натрий) (20-30 мг на 10 мл крови), трилон Б (ЭДТА - этилендиаминтетраацетат 1-2 мг на 10 мл крови). Кровь в пробирку приливать аккуратно по стеночке. После взятия крови закрыть пробирку пробкой и несколько раз перевернуть для перемешивания крови с антикоагулянтом.

Для получения плазмы стабилизированную кровь центри-

фугируют в течение 15-20 минут при 3000 оборотов в минуту. При этом кровь разделяется на плазму и форменные элементы.

Для получения сыворотки в пробирку без антикоагулянта выпустить с места прокола 10-15 мл крови и, спустя 15-20 минут (после свертывания крови), обвести внутреннюю стенку пробирки металлической палочкой для отделения тромба от стенки пробирки. Пробирку поставить в термостат при температуре 38°C. Через 12-18 часов в крови крупного рогатого скота наступает полное стягивание (ретракция) и отделение сгустка. В крови лошади отделение сыворотки наступает через 1-3 часа.

Для получения дефибринированной крови в колбу поместить 5-10 стеклянных бусинок и выпустить из кровеносного сосуда 20-30 мл крови. В течение 10-15 минут кровь тщательно перемешивать вращательными движениями (фибриноген выпадает в осадок в виде белых нитей, оседающих на стеклянных бусинках). Профильтровать содержимое колбы через два слоя марли. Фильтрат представляет собой дефибринированную кровь, состоящую из сыворотки и форменных элементов.

Фибрин можно получить путем отмывания теплой водой форменных элементов от нитей фибрина, осевших на бусинках.

Контрольные вопросы

1. Морфологический состав крови.
2. Назовите основные антикоагулянты.
3. Как получить цельную (стабилизированную) кровь, плазму, сыворотку, дефибринированную кровь, фибрин?
4. Количество и функции фибриногена.

Работа 3. Определение показателя гематокрита

Гематокрит (HCT, Ht hematocrit гр. haima кровь + kritos отдельный, определенный) - объемное содержание форменных элементов в крови, выраженное в процентах. Этот показатель находится в пределах 35-45% (или л/л) и зависит от вида, функционального состояния и возраста животного.

Увеличение величины гематокрита отмечается при эритроцитозах, при недостаточной функции коры надпочечников, ожогах, дегидратации (удалении воды) крови (вызванной токсикомами, рвотами, поносами).

Снижение показателя гематокрита отмечается при анемии-

ях (малокровии), гипергидратации (избыточном содержании воды в крови).

Определение показателя гематокрита производят в лабораторной гематокритной микроцентрифуге (рис.1).

Ход работы. Для определения гематокрита с помощью автоматической лабораторной микроцентрифуги погружают нижний конец капилляра в стабилизированную кровь и наклоняют горизонтально. Вследствие капиллярности кровь поступает в капилляр. Когда кровь поднимется на 60-65 мм, указательным пальцем закрыть свободный верхний конец капилляра, а нижний конец погрузить в замазку, так чтобы она заполнила его на 4-5 мм. Затем поместить капилляр в гнездо центрифуги и центрифугировать в течение 5 минут при скорости вращения 8000 оборотов в минуту. После остановки центрифуги с помощью шкалы определить значение гематокрита.



Рис.1. Центрифуга гематокритная СМ-70

Контрольные вопросы

1. Что такое гематокрит, от чего зависит его величина?
2. Как определить показатель гематокрита?
3. В каких случаях происходит изменение величины гематокрита?

Работа 4. Подсчет количества эритроцитов

Эритроциты (Er, RBC red blood cells) - красные кровяные клетки млекопитающих мелкие (диаметр 5-7 мкм), имеют форму двояковогнутого диска (у ламы и верблюда - овальные) и не содержат ядра. Эритроциты низших животных (рыб, рептилий, амфибий) и птиц более крупные, овальной формы и содержат

ядро. Эритроциты пластичны, способны к обратимой деформации при прохождении через капилляры.

Эритроциты осуществляют транспорт кислорода и углекислого газа, участвуют в регуляции кислотно-щелочного равновесия (гемоглибиновая буферная система) и поддержании ионного баланса в крови и тканях, транспортируют к тканям аминокислоты и липиды, адсорбируют токсины, поглощают ультрафиолетовые и инфракрасные лучи.

Количество эритроцитов колеблется в зависимости от возраста, пола, физиологического состояния, уровня кормления и ряда других факторов. Количество эритроцитов у животных составляет: крупный рогатый скот 5,0-7,5, свиньи 6,0-7,5, лошади 6,0-9,0, мелкий рогатый скот 7-12, собаки 5,2-8,4, кошки 5-10, пушные звери 8,5-11,0, куры 2,5-4,0, рыбы 1,5-2,0 млн./мм³. У человека 4,6 - 5,1 млн./мм³ (или в единицах СИ 4,6 - 5,1 · 10¹²/л). Коэффициент 10¹² называется ТЕРА (или 4,6 - 5,1 Т/л).

Образование эритроцитов (эритропоэз) происходит в красном костном мозге. Предшественниками эритроцитов являются ретикулоциты.

Продолжительность жизни эритроцитов составляет у лошадей 140-180, у крупного рогатого скота 110-120, у овец, коз 90-120, у свиней 86-100, у кроликов 45-50, у кур 25-30 дней. Разрушение эритроцитов происходит в макрофагах селезенки, печени, частично красного костного мозга.

Увеличение эритроцитов в крови (у мужчин более 6·10¹²/л и женщин более 5·10¹²/л) - эритроцитоз. Эритроцитоз может быть абсолютным (увеличение массы циркулирующих эритроцитов вследствие усиленного эритропоэза) и относительным (уменьшение объема плазмы без увеличения массы эритроцитов).

Эритроцитоз наблюдается при дегидратации (потере организмом воды) вследствие обильного потения, поносов, образования трансудатов и экссудатов, сильной мышечной нагрузки, и в условиях высокогорья.

Уменьшение количества эритроцитов в крови (у мужчин менее 4·10¹²/л и женщин менее 3,7·10¹²/л) - эритропения.

Эритропения наблюдается при анемиях, обусловленных недостаточным или неполноценным кормлением, при длительных и сильных интоксикациях, инвазионных болезнях, кровопотерях, злокачественных новообразованиях, лучевой болезни.

Ход работы. Для подсчета количества эритроцитов кровь

необходимо разбавить в 200 раз, чтобы создать нужную концентрацию клеток, удобную для подсчета.

Набрать в пробирку 4 мл 3% раствора хлористого натрия и при помощи лабораторного дозатора (рис. 2) перенести в нее 20 мкл (0,02 мл) крови. Перед внесением крови насадку дозатора вытереть фильтровальной бумагой и перенести кровь на дно пробирки. После чего, несколько раз промыть насадку дозатора раствором из верхней слоя жидкости.



Рис. 2. Дозатор с наконечником

В 3% растворе хлористого натрия происходит плазмолиз эритроцитов (выход воды из клетки), и они становятся более заметными под микроскопом.

Для учебных целей, при разведении крови, используют смесители. Смеситель (меланжер) представляет собой капилляр с расширением в средней части, в котором находится красная стеклянная бусинка, необходимая для перемешивания крови. На смесителе нанесены отметки 0,5, 1 и 101 (рис. 3).

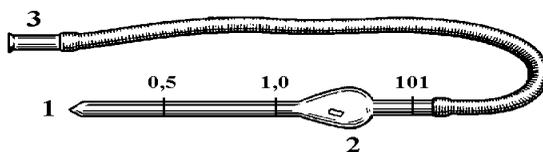


Рис. 3. Смеситель крови для подсчета эритроцитов:
1 - капилляр, 2 - ампула, 3 – наконечник

Надеть на смеситель резиновую трубочку с наконечником и набрать кровь с часового стекла до отметки 0,5. Кончик смесителя протереть фильтровальной бумагой. Затем набрать 3% раствора хлористого натрия до отметки 101. При этом кровь разбавляется в 200 раз. Набирать раствор хлористого натрия необходимо осторожно, не прерываясь, держа смеситель вертикально. После заполнения смесителя сразу перевести его в

горизонтальное положение. Зажать оба конца смесителя пальцами и, встряхивая его в течение 2-3 минут, тщательно перемешать кровь с раствором. Удалить из смесителя первые 3-4 капли. После этого положить смеситель на стол и подготовить микроскоп и счетную камеру Горяева к работе.

Камера Горяева (рис. 4) представляет собой стеклянный брусок с четырьмя поперечными желобками, образующими три площадки. Средняя площадка ниже соседних на 0,1 мм и разделена поперечным желобком. По обе стороны желобка на стекле нанесены сетки. Сетка состоит из 225 больших квадратов, каждый третий из которых разделен продольными и поперечными линиями на 16 маленьких квадратиков. Сторона маленького квадратика равна 1/20 мм (0,05 мм). Площадь маленького квадратика 1/400 мм², а объем над ним равен 1/4000 мм³.

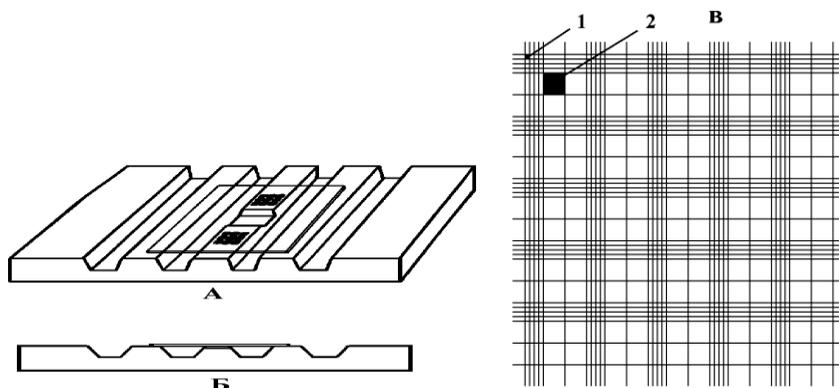


Рис. 4. Счетная камера Горяева.

А - вид сверху; Б - вид сбоку;

В - сетка камеры Горяева: 1 - маленький квадрат; 2 - большой квадрат

Перед началом работы камеру Горяева и покровное стекло необходимо обезжирить раствором спирта с эфиром. Наложить покровное стекло на боковые площадки камеры Горяева и движениями больших пальцев левой и правой рук притереть покровное стекло до появления радужных колец Ньютона. Это свидетельствует о том, что расстояние под стеклом составляет 0,1 мм.

Поместить камеру Горяева под микроскоп и при малом увеличении (окуляр х 16, объектив х 10) отыскать сетку. Сетку необходимо искать в затененном поле зрения с прикрытой диафрагмой и опущенным конденсором. После нахождения сетки

под микроскопом взять камеру и заполнить ее разбавленной кровью. Для заполнения камеры, можно использовать капилляр от гемометра Сали или стеклянную палочку. Приложить капилляр с выступающей каплей к краю покровного стекла (над счетной сеткой), в силу капиллярности жидкость заполняет пространство камеры.

После оседания эритроцитов (через 2-3 минуты) произвести их подсчет в 5 больших квадратах, разделенных на 16 малых (всего 80 малых квадратов), расположенных по диагонали сетки (или по углам и в центре).

Подсчет эритроцитов в большом квадрате (рис.5) начинают с верхнего левого малого квадрата и заканчивают правым нижним (по спирали).

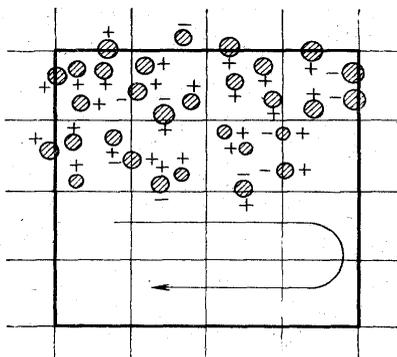


Рис. 5. Направление подсчета эритроцитов в большом квадрате

Для того чтобы не допустить двойного счета, учитывают эритроциты, находящиеся как в квадрате, так и на верхней и левой пограничных линиях. Эритроциты, лежащие на правой и нижней границе малого квадрата, не учитывают.

Расчет количества эритроцитов производят по формуле:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 200}{b}$$

где X - количество эритроцитов в 1 мм³ крови;

a - количество подсчитанных эритроцитов;

4000 - коэффициент для перевода результатов в 1 мм³ (т.к. объем над одним малым квадратом равен 1/4000 мм³);

200 - разведение крови;

б - количество подсчитанных малых квадратов.

Если при подсчете были учтены эритроциты в 5 больших квадратах (80 малых), то формула приобретает следующий вид:
 $X = a \cdot 10000$.

Контрольные вопросы

1. Функции эритроцитов?
2. Строение эритроцитов у низших животных и млекопитающих.
3. Количество эритроцитов у различных видов сельскохозяйственных животных.
4. Метод подсчета количества эритроцитов.
5. Что такое эритроцитоз и эритропения?

Работа 5. Подсчет количества лейкоцитов

Лейкоциты (L, WBC white blood cells) - белые кровяные тельца, разнородная группа бесцветных ядерных клеток. Основная функция лейкоцитов защитная, они обладают способностью к фагоцитозу, участвуют в формировании иммунитета, разрушении и удалении токсинов белкового происхождения, вырабатывают биологически активные вещества.

Размер лейкоцитов 10-20 мкм. В норме количество лейкоцитов в крови составляет у крупного рогатого скота 6-10, лошадей 7-12, свиней 8-16, овец 6-11, птиц 20-40, собак 8,5-10,5, кошек 5,5-19, пушных зверей 4-10, рыб 25-50, у человека 4-10 тыс./мм³ (или в единицах СИ 4-10 · 10⁹/л). Коэффициент 10⁹ называется ГИГА (или 4-10 Г/л).

Увеличение количества лейкоцитов (лейкоцитоз) может быть физиологическим и патологическим. Физиологические лейкоцитозы являются перераспределительными (лейкоциты выходят из депо) они кратковременны, не сопровождаются изменениями лейкоцитарной формулы. Физиологический (умеренный) лейкоцитоз бывает при беременности, после приема корма, после тяжелых физических нагрузок, при стрессах.

При патологическом лейкоцитозе усиливается образование белых кровяных телец в кроветворных органах и изменяет-

ся лейкоцитарная формула. Патологический лейкоцитоз отмечается при многих острых инфекционных, кровепаразитарных заболеваниях, лейкозах, гнойно-воспалительных процессах, интоксикациях.

Уменьшение числа лейкоцитов (лейкопения) является следствием угнетения функции кроветворных органов, пониженной реактивности организма. Встречается при вирусных болезнях, некоторых бактериальных и протозойных инфекциях, истощении защитных сил организма, лучевой болезни и др.

В зависимости от стадии болезни, состояния животного и многих других факторов при одном и том же заболевании может наблюдаться и лейкоцитоз, и лейкопения.

Ход работы. Набрать при помощи дозатора 400 мкл (0,4 мл) 3 % подкрашенной уксусной кислоты (жидкость Тюрка) и перенести ее в пробирку. Вторым дозатором набрать 20 мкл (0,02 мл) крови (насадку дозатора вытереть фильтровальной бумагой) и перенести ее на дно пробирки. После чего, несколько раз промыть насадку дозатора раствором из верхней слоя жидкости.

При использовании смесителя (рис.6) набрать кровь до отметки 0,5. Затем набрать 3 % раствора уксусной кислоты, подкрашенной метиленовой синью до отметки 11 (кровь при этом разводится в 20 раз). Смеситель держать вертикально и после его заполнения перевести в горизонтальное положение. Зажать оба конца смесителя пальцами и, встряхивая его в течение 2-3 минут, перемешать содержимое. После чего удалить 3-4 капли и заполнить камеру Горяева.

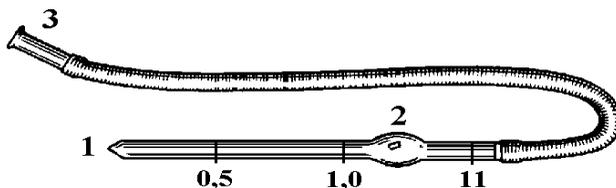


Рис. 6. Смеситель крови для подсчета лейкоцитов:
1 - капилляр, 2 - ампула, 3 - наконечник

Под действием уксусной кислоты происходит гемолиз эритроцитов. Ядра лейкоцитов не разрушаются и окрашиваются метиленовой синью. Под микроскопом они видны в виде темных точек. Заполнить камеру Горяева, как описано в предыдущей

работе. Пользуясь малым увеличением микроскопа (окуляр х 16, объектив х 10), подсчитать количество лейкоцитов в 100 больших (неразделенных на маленькие) квадратах. Большие квадраты (для подсчета лейкоцитов) сгруппированы по 4. Считать лейкоциты в затененном поле зрения, для чего опустить конденсор и закрыть диафрагму.

Расчет количества лейкоцитов производят по следующей формуле:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 20}{б},$$

где X - количество лейкоцитов в 1 мм³ крови (или мкл);

a - количество подсчитанных лейкоцитов;

4000 - коэффициент для перевода результатов в 1 мм³ (т.к. объем над одним малым квадратом равен 1/4000 мм³);

20 - разведение крови;

б - количество подсчитанных малых квадратов.

Если при подсчете были учтены лейкоциты в 100 больших квадратах (1600 малых), то формула приобретает следующий вид: $X = a \cdot 50$.

Для подсчета количества лейкоцитов в крови птиц используют специальный разбавитель (6 мл красителя Романовского-Гимза, 4 мл 1% раствора метилвиолета, 5 мл нейтрального формалина, 85 мл физиологического раствора). Лейкоциты окрашиваются в фиолетовый цвет, а ядра эритроцитов остаются не окрашенными. Подсчет лейкоцитов производится при увеличении 640 раз (окуляр х 16, объектив х 40) в 25 больших квадратах, разделенных на 16 маленьких.

Контрольные вопросы

1. Строение и размеры лейкоцитов.
2. Количество лейкоцитов в крови различных сельскохозяйственных животных.
3. Метод подсчета количества лейкоцитов.
4. Что такое лейкоцитоз и лейкопения?

Работа 6. Выведение лейкоцитарной формулы (лейкограммы)

В зависимости от наличия в цитоплазме зернистости (гранул) различают зернистые (гранулоциты) и незернистые (агранулоциты) лейкоциты. Зрелые зернистые лейкоциты имеют сегментированное ядро. В соответствии с окрашиванием зернистости гранулоциты делятся на три группы: базофилы, эозинофилы, нейтрофилы.

Незернистые лейкоциты характеризуются отсутствием зернистости в цитоплазме и несегментированным ядром, среди них выделяют два вида: моноциты и лимфоциты.

Лейкоциты образуются в красном костном мозге. Лимфоциты проходят дифференцировку в одном из лимфоидных органов (тимус, лимфатические узлы и др.). Различные виды лейкоцитов выполняют разные функции, поэтому определение соотношения разных видов лейкоцитов, содержание молодых форм, выявление патологических клеток имеет большое диагностическое значение.

Базофилы окрашиваются основными красками. Цитоплазма приобретает бледно-розовый или фиолетовый цвет. Зерна различной величины окрашиваются в интенсивно фиолетовый цвет. Ядро - большое темно окрашенное, бесструктурное, расплывчатое, покрытое большим количеством зернистости.

Синтезируют гепарин, серотонин, а также гистамин, участвующий в местных воспалительных реакциях (вызывает расширение капилляров и повышает их проницаемость). Гистамин основной медиатор аллергических реакций немедленного типа, вызывает покраснение кожи, зуд, жжение.

Увеличение содержания базофильных лейкоцитов отмечается при аллергических состояниях, заболеваниях системы крови, понижении функции щитовидной железы.

Уменьшение содержания базофильных лейкоцитов отмечается при повышенной функции щитовидной железы, беременности, стрессовых воздействиях, острых инфекциях и др.

Проникая в ткани базофилы, превращаются в тучные клетки (содержащие большое количество гистамина).

Эозинофилы окрашиваются кислыми красками. Цитоплазма окрашивается в слабо голубой цвет, однако эта окраска среди большого количества зерен мало заметна. Зерна круп-

ные, круглой формы, окрашиваются в желтовато-красный цвет. Ядро рыхлое и окрашивается в бледно-фиолетовый цвет.

В небольшой степени способны к фагоцитозу, содержат фермент гистаминазу, разрушающий гистамин и другие медиаторы аллергии и воспаления. Снижают местную воспалительную реакцию. Обладают цитотоксической активностью в отношении гельминтов и защите от инвазий. Инактивируют токсины белкового происхождения.

Повышение содержания эозинофилов (эозинофилия) отмечается при аллергических состояниях, астме, поражениях кожи, глистных инвазиях (особенно трихинеллезе, стронгилоидозе), инфекционных заболеваниях (скарлатина, сифилис, туберкулез), остром лейкозе и др.

Понижение содержания эозинофилов (эозинопения) отмечается при некоторых инфекционных заболеваниях (брюшной тиф, дизентерия), остром аппендиците, сепсисе, травмах, ожогах, физическом перенапряжении, стрессах.

Нейтрофилы (микрофаги) окрашиваются кислыми и основными красками в розово-фиолетовый цвет. Большую часть клетки занимает бледно-розовая цитоплазма с неравномерной мелкой зернистостью, окрашенной в розовато-синий или фиолетовый цвет. Ядро имеет темно-фиолетовый цвет.

Нейтрофилы (полиморфноядерные лейкоциты) по возрасту могут быть юные, палочкоядерные и сегментоядерные (зрелые). Ядро палочкоядерного нейтрофила имеет форму изогнутой палочки (ленты). У сегментоядерного нейтрофила ядро разделено на отдельные сегменты (от 2 до 5) различной величины и формы.

Основная функция - фагоцитоз. Играют важную роль в защите от бактериальных и грибковых инфекций. В противовирусной и антигельминтной защите нейтрофилы практической роли не играют. Нейтрофилы способны проходить через базальные мембраны и между клетками в тканях, направляясь к очагу воспаления. Нейтрофилы вырабатывают большое количество ферментов (протеазы, каталазы, оксидазы и др.).

При многих тяжелых бактериальных и грибковых инфекциях, септических и гнойных процессах, интоксикациях, злокачественных новообразованиях, стрессах, отмечается увеличение количества нейтрофилов (нейтрофилез, нейтрофилия).

Изменение лейкограммы с увеличением процентного со-

держания молодых форм нейтрофилов - метамиелоцитов и миелоцитов (сдвиг нейтрофилов влево) возникает при лейкозах и злокачественных новообразованиях и свидетельствует о стимуляции образования клеток этого вида.

При некоторых хронических и вирусных инфекциях, при действии ионизирующей радиации у ослабленных животных наблюдается понижение уровня нейтрофилов (нейтропения).

Моноциты (макрофаги) самые крупные клетки крови (до 20 мкм). Ядро (бобовидное или в форме бабочки не сегментировано) занимает большую часть цитоплазмы и окрашивается в красновато-фиолетовый цвет. Цитоплазма окрашивается в синевато-дымчатый, а иногда в синий цвет.

Циркулируют в крови 12-36 часов, затем переходят в ткани, превращаясь в тканевые макрофаги. Обладают хорошо выраженной фагоцитарной активностью, секретируют лизоцим, интерферон. В цитоплазме много лизосом.

Увеличение содержания моноцитов (моноцитоз) отмечается при тяжело протекающих инфекциях, ряде заболеваний системы крови, злокачественных новообразованиях и др.

Уменьшение содержания моноцитов (моноцитопения) считается признаком поражения костного мозга.

Лимфоциты главные клетки иммунной системы. Ядро (округлое или бобовидной формы) интенсивно окрашивается в темно- или светло-фиолетовый цвет. Цитоплазма светло-синяя.

По морфологическим признакам различают большие лимфоциты (NK- клетки и активно делящиеся лимфобласты) и малые (Т- и В - лимфоциты).

По функциональным признакам различают три типа лимфоцитов: В-клетки, Т-клетки и NK-клетки.

Т-лимфоциты образуют три основные субпопуляции:

Т-киллеры осуществляют иммунологический генетический надзор, разрушая мутированные клетки собственного организма, в том числе и опухолевые, и генетически чужеродные клетки трансплантатов.

Т-хелперы стимулируют иммунный ответ, воздействуя на В-лимфоциты и давая сигнал для синтеза антител против появившегося в организме антигена.

Т-супрессоры ограничивают силу иммунного ответа, контролируют активность Т-киллеров, блокируют деятельность Т-

хелперов и В-лимфоцитов, подавляя избыточный синтез анти-тел, которые могут вызывать аутоиммунную реакцию.

Содержание Т-лимфоцитов в крови составляет 65-80 % от общего количества лимфоцитов.

В-лимфоциты участвуют в гуморальном иммунитете, вырабатывая антитела (иммуноглобулины) против генетически чужеродных веществ. В-лимфоциты обеспечивают специфический приобретенный иммунитет. Содержание В-лимфоцитов в крови составляет 8-20 % от общего количества лимфоцитов.

НК - клетки или нормальные киллеры (от англ. natural killer) - это большие зернистые лимфоциты, обладающие цитотоксичностью против опухолевых клеток и клеток, зараженных вирусами. В настоящее время НК-клетки рассматривают как отдельный класс лимфоцитов. Способность НК клеток распознавать «свое» и «чужое» определяется поверхностными рецепторами. Естественные киллеры составляют от 5 до 20 всех лимфоцитов.

Повышение уровня лимфоцитов (лимфоцитоз) отмечается при ряде инфекционных заболеваний (бруцеллез, туберкулез и др.), заболеваниях системы крови.

Снижение содержания лимфоцитов (лимфопения) отмечается при, вторичных иммунодефицитах, отдельных формах лейкоза, длительном голодании, сопровождающемся дистрофией, длительном стрессе, почечной недостаточности и др.

Лейкоцитарная формула (лейкограмма) - процентное соотношение между отдельными видами лейкоцитов в мазке крови.

Первым изменением, которое может быть выявлено в лейкоцитарной формуле, является увеличение, или уменьшение, какого-либо вида лейкоцитов (видовой лейкоцитоз или видовая лейкопения).

Вторым изменением является появление молодых незрелых форм лейкоцитов (особенно нейтрофилов). Увеличение числа палочкоядерных и появление юных нейтрофилов и миелоцитов (предшественников нейтрофилов), обозначают как сдвиг ядра влево. Увеличение процента сегментоядерных нейтрофилов при уменьшении процента палочкоядерных - как сдвиг ядра вправо.

Третьим изменением, является наличие патологических изменений в ядре и цитоплазме.

Из видовых лейкоцитозов в клинической практике чаще

всего встречаются нейтрофилии, лимфоцитозы и эозинофилии.

Нейтрофилия (нейтрофилез) наиболее типична для гнойно-воспалительных процессов.

Лимфоцитозом при нормальном или повышенном количестве лейкоцитов в сочетании с нейтропенией сопровождаются хронический туберкулез, бруцеллез, пироплазмоз лошадей, сильные ожоги кожи, сахарный диабет, тиреотоксикоз.

Лимфоцитопения может быть при сепсисе, ботулизме, в начальной стадии чумы свиней (в прогностическом отношении является неблагоприятным симптомом).

У крупного рогатого скота среднее значение лейкоцитарной формулы следующее: Б-1%, Э-6,5%, Н-31%, Л-57% и М-4,5%. У человека Б-0-1 %, Э-0,5-5%, Н-(п/я 1-6 %, с/я 47-72 %), Л-19-37 %, М-3-11 %.

Ход работы. На обезжиренное предметное стекло нанести небольшую каплю крови, отступив на 1,5-2 см от края. Для размазывания капли взять шлифованное стекло, поставить под углом 30-45° слева от капли, слегка придвинуть вправо до соприкосновения с ней (выждать пока капля не расплывется по всему ребру) и легким быстрым движением провести стеклом справа налево (рис. 7).

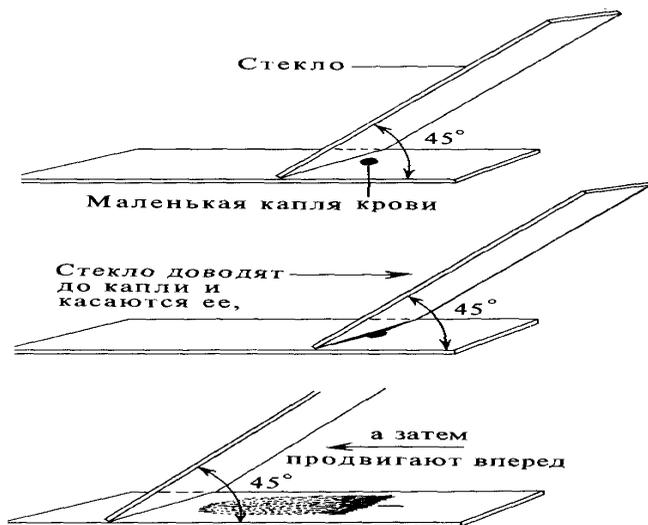


Рис. 7. Приготовление мазка крови

Мазок должен быть тонким, желтоватого цвета, длиной 3-4 см, располагаться на 1-1,5 см от краев предметного стекла и оканчиваться «метелочкой».

Для фиксации высохшие на воздухе мазки поместить в кювету (для окраски мазков со штативом контейнером) с 96 % этиловым спиртом и выдержать не менее 35 минут, затем извлечь и высушить на воздухе.

Фиксированные мазки поместить в кювету и залить рабочим раствором красителя Романовского-Гимза (2 капли готового заводского красителя на 1 мл дистиллированной воды) на 15-20 минут. Затем мазки промыть дистиллированной водой и высушить на воздухе.

Просмотр мазка проводят под иммерсионной системой (лат. *immersio* погружение) при большом увеличении микроскопа (окуляр 16 х, объектив 100 х). В качестве иммерсионной системой используют кедровое масло (показатель преломления 1,515). Для лучшей освещенности поля зрения конденсор поднять до конца и открыть диафрагму. Подсчет лейкоцитов ведут по зигзагу: 3-5 полей зрения вдоль края мазка, затем 3-5 полей зрения под прямым углом к середине мазка, затем 3-5 полей зрения параллельно краю мазка и вновь под углом 90° возвратиться к краю мазка. Подсчитывают 100 лейкоцитов. При подсчете использовать атлас крови и лабораторный клавишный счетчик.

В настоящее время для подсчета и анализа клеток крови используют гематологические анализаторы, позволяющие определять одновременно более 30 параметров (рис. 8).

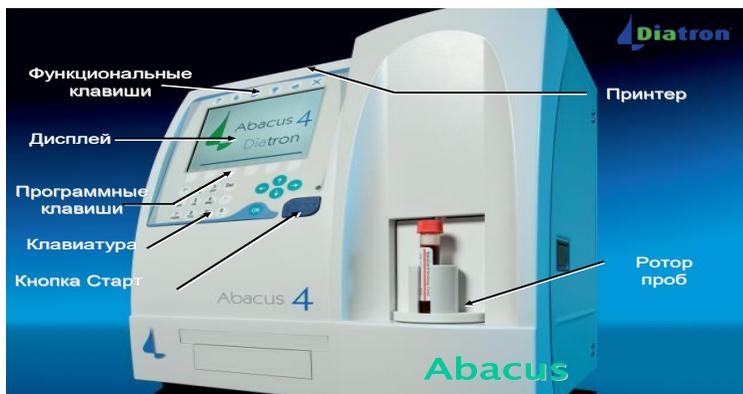


Рис. 8. Гематологический анализатор

Контрольные вопросы

1. Виды лейкоцитов, их функции.
2. Что такое лейкоцитарная формула?
3. С какой целью выводят лейкоцитарную формулу?
4. Как готовят мазок крови для выведения лейкоцитарной формулы?
5. Чему равна лейкоцитарная формула у крупного рогатого скота?

Работа 7. Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ, ESR erythrocyte sedimentation rate)

Стабилизированная кровь при отстаивании разделяется на плазму и форменные элементы. Оседание эритроцитов связано с изменением их электростатических свойств и их агрегацией (слипанием). Скорость оседания зависит от вида, пола, возраста животного, его физиологического состояния и свойств плазмы. На скорость оседания оказывает влияние количество эритроцитов и величина их отрицательного заряда, вязкость крови, реакция крови, количество белков и соотношение между белковыми фракциями. При увеличении доли глобулинов и фибриногена, обладающих положительным зарядом, отрицательный заряд эритроцитов снижается (за счет адсорбции этих белков на поверхности эритроцитов), что способствует их агрегации (образованию скоплений) и ускорению оседания. При увеличении содержания альбуминов СОЭ снижается.

Клиническое значение СОЭ состоит в том, что изменение этого показателя при некоторых патологических состояниях может иметь диагностическую и прогностическую ценность.

Повышением СОЭ сопровождаются различные анемии, инфекционные (сап, чума, туберкулез) и инвазионные (пироплазмоз, трипаносомоз) болезни, гнойные процессы, нарушения обмена веществ (сахарный диабет), опухолевые стадии лейкозов, беременность. Увеличение СОЭ при хроническом воспалении связано с повышением уровня фибриногена и иммуноглобулинов.

Снижение скорости оседания эритроцитов отмечается при сгущении крови (обильное потение, поносы), гастроэнтеритах, снижении щелочного резерва, увеличении количества сыворо-

точных альбуминов и вязкости крови.

Скорость оседания эритроцитов у здоровых животных в норме колеблется в следующих пределах: крупный рогатый скот 0,5-1,5; овцы 0,5-1,0; лошади 40-70; свиньи 2-9; птицы 2-3; собаки 2-6, кошек 2-3 мм/час. У человека 3-6 (у мужчин) 8-10 (у женщин) мм/час.

Ход работы. В капиллярную пипетку со шкалой 100 мм из прибора Панченкова (рис.9) набрать 4% раствор цитрата натрия до метки Р (50) и выпустить раствор на часовое стекло. С места прокола насосать кровь до отметки К (0) и выпустить взятую кровь на часовое стекло. Снова набрать кровь до метки К (0) и снова выпустить ее на часовое стекло. Таким образом, получают разведение 1:4.

Концом капилляра перемешать кровь на часовом стекле. Насосать смесь в капилляр до верхней отметки (0), закрыть пальцем верхний конец капилляра и установить в штатив. Через 1 час отсчитать по делениям капиллярной пипетки величину столбика плазмы.

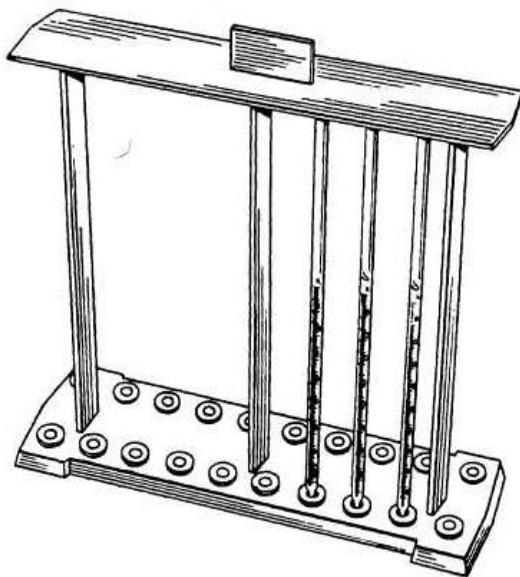


Рис. 9. Прибор Панченкова для определения СОЭ

Контрольные вопросы

1. Чем обусловлена и от чего зависит скорость оседания эритроцитов?
2. Чему равна скорость оседания эритроцитов у сельскохозяйственных животных?
3. Как определить скорость оседания эритроцитов?
4. При каких заболеваниях наблюдается увеличение СОЭ?

Работа 8. Определение количества гемоглобина

Гемоглобин (Hb, HGB hemoglobin) - сложный белок, хромопротеид с молекулярной массой 64500. Гемоглобин состоит из белковой части - глобина (96 %) и простетической группы - гема (4 %). Молекула глобина состоит из двух α - и двух β - полипептидных цепей, каждая из которых присоединяет одну гемогруппу. Молекула гема содержит один атом двухвалентного железа.

Различают следующие формы гемоглобина:

- гемоглобин взрослых животных HbA;
- фетальный гемоглобин, встречающийся у плода, и обладающий повышенным сродством к кислороду. Состоит из двух α -цепей и двух γ -цепей глобина. После рождения постепенно замещается гемоглобином HbA.

- миоглобин содержится в красных мышцах. Состоит из одной полипептидной цепи и одной гема группы (М.м.17 500). В крови появляется при распаде мышечной ткани (инфаркт миокарда, травматические повреждения мышц).

- восстановленный гемоглобин - **дезоксигемоглобин** (HbH);
- с кислородом - **оксигемоглобин** (HbO₂);
- с углекислым газом - **карбогемоглобин** (HbCO₂);
- с угарным газом - **карбоксигемоглобин** (HbCO);
- с окислителями и ядами - **метгемоглобин** (MtHb).

Функции гемоглобина - перенос кислорода от легких к тканям и частично (10 %) углекислого газа в обратном направлении (большая часть углекислоты транспортируется в цитоплазме эритроцитов в виде гидрокарбоната калия KНСО₃ и в плазме в виде гидрокарбоната натрия NaНСО₃), а также участие в поддержании кислотно-щелочного равновесия.

Содержание гемоглобина в крови зависит от вида, возраст-

та, пола и состояния здоровья животного. Количество гемоглобина в крови в норме колеблется в следующих пределах: крупный рогатый скот 90-120; овцы 70-110; лошади 80-140; свиньи 90-110; куры 80-120; собаки 110 -170; кошки 80-150 г/л. У человека 125-158 г/л.

Снижение концентрации гемоглобина (менее 120 г/л у мужчин и менее 110 г/л у женщин) в крови является основным лабораторным симптомом анемии. В зависимости от концентрации гемоглобина выделяют три степени тяжести анемии: легкую (HGB>90г/л); среднюю (HGB 70-90 г/л); тяжелую (HGB < 70 г/л).

Снижение количества гемоглобина (гипохромия) наблюдается при анемиях, возникающих вследствие дефицита железа, витамина В₁₂ и фолиевой кислоты, алиментарном (пищевом) истощении, потерях крови, ряде инфекционных болезней, плохих условиях содержания животных.

Увеличение количества гемоглобина (гиперхромия) встречается при поносах, повышенной потливости, обильной рвоте, образовании экссудатов, эмфиземе легких и других болезнях.

Ход работы. Определение количества гемоглобина производят колориметрическим способом. Визуальная колориметрия осуществляется с помощью гемометра Сали (ГС-3). Гемометр представляет собой пластмассовый корпус, задняя стенка которого сделана из матового стекла (рис. 10).

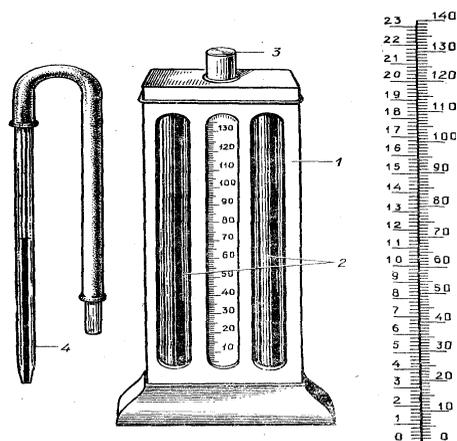


Рис. 10. Гемометр ГС-3; 1 - корпус прибора; 2 - пробирки со стандартным раствором; 3 - градуированная пробирка; 4 - пипетка для взятия крови. Справа - вид шкалы, нанесенной на градуированной пробирке (грамм-проценты и относительные единицы гемоглобина)

В корпус вмонтированы две запаянные пробирки со стандартным раствором солянокислого гематина. Концентрация солянокислого гематина в стандартных пробирках соответствует 16,7 г % гемоглобина. Между двумя пробирками со стандартным раствором вставлена градуированная пробирка того же диаметра для исследуемой крови. Принцип определения основан на способности гемоглобина вступать в реакцию с соляной кислотой и образовывать солянокислый гематин, который имеет бурую окраску. Путем разбавления дистиллированной водой содержимого средней пробирки до цвета стандартов определяют содержание гемоглобина в г % (количество граммов гемоглобина в 100 мл крови).

При помощи глазной пипетки налить в градуированную пробирку до нижней круговой метки 0,1 н. раствор соляной кислоты. В капиллярную пипетку набрать кровь до метки 0,02 мл. Излишек крови удалить путем прикладывания фильтровальной бумаги к кончику капилляра. Опустить кончик капиллярной пипетки в кислоту и осторожно выпустить кровь на дно градуированной пробирки так, чтобы верхний слой кислоты оставался неокрашенным. Не вынимая пипетки, ополоснуть ее путем всасывания соляной кислоты из верхнего, прозрачного слоя.

Ударяя пальцем по дну градуированной пробирки, тщательно перемешать содержимое и оставить стоять в течение 5 минут. За это время происходит полный гемолиз, и весь гемоглобин превращается в солянокислый гематин. Затем, при помощи капельницы или глазной пипетки, добавляют по каплям дистиллированную воду до тех пор, пока цвет раствора не станет таким же, как и цвет стандартов. Во время разведения жидкость в пробирке тщательно перемешивают при помощи стеклянной палочки. Показатель содержания гемоглобина в г % снять по нижнему мениску (уровню) жидкости.

Для перевода в систему СИ (г/л), полученный результат умножить на 10. Например: по шкале градуированной пробирки содержание гемоглобина составляет 12,2 г%, тогда $12,2 \text{ г}\% \cdot 10 = 122 \text{ г/л}$.

Контрольные вопросы

1. Какова химическая природа гемоглобина?
2. Назовите функции гемоглобина.
3. Чему равно содержание гемоглобина в норме у сельскохозяйственных животных?
4. Назовите формы и соединения гемоглобина.
5. Определение количества гемоглобина.

Работа 9. Расчет эритроцитарных индексов

Цветовой показатель (ЦП, синоним цветной показатель, **F_i** фарб-индекс farb цвет + index показатель) отражает отношение уровня гемоглобина к количеству эритроцитов в 1 мкл (мм³) крови, т.е. относительное содержание гемоглобина в эритроците. При некоторых заболеваниях нарушается соотношение между содержанием гемоглобина и количеством эритроцитов. Поэтому для определения насыщенности эритроцитов гемоглобином используют условную величину - цветовой показатель.

$$F_i = \frac{Hb_1}{Hb_2} : \frac{Er_1}{Er_2},$$

где F_i - цветовой показатель;

Hb₁ - найденное количество гемоглобина (г%; г/л);

Hb₂ - нормальное количество гемоглобина (г%; г/л);

Er₁ - найденное количество эритроцитов (млн./мм³; 10¹²/л);

Er₂ - нормальное количество эритроцитов
(млн./мм³; 10¹²/л).

Например, установлено, что в крови крупного рогатого скота содержится 11,2 г% гемоглобина и 6,5 млн./мм³ эритроцитов (при норме, соответственно 11,0 г% и 6,3 млн./мм³), тогда цветовой показатель будет равен:

$$F_i = \frac{11,2}{11,0} : \frac{6,5}{6,3} = 0,97$$

Цветовой показатель (для человека) по упрощенной методике можно определить как: 3 умножить на Hb (г/л) и разделить на три первые цифры числа эритроцитов (в млн.). Например: количество эритроцитов равно 4,5·10¹²/л, а концентрация гемоглобина 140 г/л. Цветовой показатель будет равен (3 · 140) : 450, или 420 : 450 = 0,93.

В норме цветовой показатель должен быть: у крупного рогатого скота 0,7-1,1; лошадей 0,8-1,2; свиней 0,8-1,0; овец 0,5-0,7; кур 2,0-3,0; собак 0,85-1,15. У человека 0,9-1,1. Если цветовой показатель ниже указанной нормы, то содержание гемоглобина в эритроцитах понижено (гипохромия), если больше - повышено (гиперхромия).

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ, MCH mean corpuscular hemoglobin) используют для оценки насыщения эритроцитов гемоглобином. Этот показатель более точно отражает синтез Hb и его уровень в эритроците. На основании этого индекса анемии подразделяют на нормо-, гипо- и гиперхромные:

$$MCH = \frac{Hb}{Er},$$

где MCH - среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг
(1 пикограмм = 10^{-12} г);

Hb - количество гемоглобина, г/л;

Er - количество эритроцитов, $10^{12}/л$

Например, при содержании Hb в крови 140 г/л и эритроцитов $4,6 \cdot 10^{12}/л$ MCH (СГЭ) будет равен:

$$MCH = \frac{140}{4,6 \times 10^{12}} = 31 \times 10^{12} \text{ или } 31 \text{ пг}$$

Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците составляет: у крупного рогатого скота 16,5-18,5; лошадей 17,0-20,0; овец 10,0-13,0; кроликов 21,0-23,0; кур 36,0-40,0; человека 27,0-31,0 пг.

Средний объем эритроцита (MCV mean corpuscular volume) рассчитывают по формуле:

$$MCV = \frac{Ht}{Er} \times 10$$

где MCV - средний объем эритроцита (фл или $мкм^3$)

Ht - показатель гематокрита, %;

Er - количество эритроцитов, млн./мкл;

Средний объем эритроцита измеряется в фемтолитрах (fl, фл) или $мкм^3$. Один фемтолитр равен 10^{-15} литра.

На основании этого индекса различают анемии (у человека) микроцитарные (менее 80 фл), нормоцитарные (80-100 фл) и макроцитарные (более 100 фл).

Средний объем эритроцита вычисляют путем деления гематокрита (в $мкм^3$) на общее число эритроцитов в 1 мкл: $MCV = Ht (мкм^3) / RBC (10^6 / мкл)$.

Пример: гематокрит составляет 42% (или 0,42 мкл), общее число эритроцитов $4,5 \cdot 10^{12}/л$ (или $4,5 \cdot 10^6/мкл$). Поскольку 1 мкл (или $мм^3$) = 10^{-6} литра или 10^9 $мкм^3$, то $MCV = 0,42 \cdot 10^9$ $мкм^3 / 4,5 \cdot 10^6/мкл = 0,42 \cdot 10^3 / 4,5 = 420 / 4,5 = 93$ $мкм^3$ или 93 фемтолитра.

$$MCV = \frac{42\%}{4,5 \text{ млн} / \text{мм}^3} \times 10 = 93 \text{ мкм}^3 \text{ или } 93 \text{ фл}$$

Практически для вычисления среднего объема эритроцита необходимо значение гематокрита в %, увеличить в 10 раз и разделить на число миллионов эритроцитов в 1 мкл.

В некоторых моделях современных гематологических счетчиков осуществляется автоматическое измерение объема каждого эритроцита. Таким образом, значение MCV в этих приборах представляет собой среднюю величину объема всех измеренных эритроцитов.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (МСНС mean corpuscular hemoglobin concentration) вычисляется как отношение гемоглобина (г/дл) к гематокриту (%) и умноженное на 100. $МСНС = Hb$ (г/дл) / Ht (%) $\cdot 100\%$. Различия между двумя последними индексами заключается в том, что МСН указывает на массу гемоглобина в одном эритроците и выражается в долях грамма (пикограммах), а МСНС показывает концентрацию гемоглобина в одном эритроците, т.е. соотношение содержания гемоглобина к объему клетки.

Пример: концентрация гемоглобина в крови 120 г/л (или 12 г/дл), гематокрит 40%. $МСНС = (12/40) \cdot 100\% = 30\%$.

В норме значение МСНС колеблется в пределах 32-36%. Снижение показателя МСНС ниже 30% характерно для абсолютной гипохромии эритроцитов (например, при железодефицитных анемиях, талассемии). Уменьшение МСНС может встречаться и при макроцитарных и особенно мегалоцитарных формах анемии. В этих случаях происходит непропорционально большое увеличение объема эритроцита по сравнению с увеличением его насыщения гемоглобином.

Повышение МСНС больше 37% в клинике практически не встречается, так как это значение является верхним пределом растворимости гемоглобина в воде.

Наиболее стабильный гематологический показатель. Любая неточность, связанная с определением гемоглобина, гематокрита, MCV, приводит к увеличению МСНС, поэтому этот па-

раметр используется как индикатор ошибки прибора или ошибки, допущенной при подготовке пробы к исследованию.

В настоящее время большинство показателей определяют на автоматических гематологических анализаторах. Из них основными являются количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, количество эритроцитов, средний объём эритроцита, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, среднее содержание гемоглобина в эритроците, полуширина распределения эритроцитов по размерам, количество тромбоцитов, средний объём тромбоцита и др.

Нормы показателей приведены для взрослого (18-45 лет) мужчины.

WBC (white blood cells белые кровяные тельца) - абсолютное содержание лейкоцитов (норма $4,5-11 \cdot 10^9$ кл/л)

RBC (red blood cells красные кровяные тельца) - абсолютное содержание эритроцитов (норма $4,3-5,7 \cdot 10^{12}$ кл/л)

HGB (Hb, hemoglobin) - концентрация гемоглобина в цельной крови (норма 132-173 г/л).

HCT (hematocrit) - гематокрит (норма 39-49 % или 0,39-0,49 л/л) от общего объёма крови, приходящаяся на форменные элементы крови.

PLT (platelets кровяные пластинки) - абсолютное содержание тромбоцитов (норма $150-400 \cdot 10^9$ кл/л)

Эритроцитарные индексы (MCV, MCH, MCHC):

MCV - средний объём эритроцита в кубических микрометрах (мкм) или фемтолитрах (фл)(норма 80-95 фл). В старых анализах указывали: микроцитоз, нормоцитоз, макроцитоз.

MCH - среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (норма 27-31 пг). MCH более объективный показатель, чем цветовой показатель, который не отражает синтез гемоглобина и его содержание в эритроците, а во многом зависит от объёма клетки.

MCHC - средняя концентрация гемоглобина в эритроците (норма 330-370 г/л), отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином.

Тромбоцитарные индексы (MPV, PDW, PCT):

MPV (mean platelet volume) - средний объём тромбоцитов (норма 7-10 фл).

PDW - относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму, показатель гетерогенности тромбоцитов.

PCT (platelet crit) тромбокрит (норма 0,108-0,282)- доля (%) объёма цельной крови, занимаемую тромбоцитами.

Лейкоцитарные индексы

LYM% (LY%) (lymphocyte) - относительное (%) содержание лимфоцитов.

LYM# (LY#) (lymphocyte) - абсолютное содержание лимфоцитов.

MXD% - относительное (%) содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов.

MXD# - абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов.

NEUT% (NE%) (neutrophils) - относительное (%) содержание нейтрофилов.

NEUT# (NE#) (neutrophils) - абсолютное содержание нейтрофилов.

MON% (MO%) (monocyte) - относительное (%) содержание моноцитов (норма 0,04-0,11).

MON# (MO#) (monocyte) - абсолютное содержание моноцитов (норма $0,1-0,6 \cdot 10^9$ кл/л).

EO% - относительное (%) содержание эозинофилов.

EO# - абсолютное содержание эозинофилов.

BA% - относительное (%) содержание базофилов.

BA# - абсолютное содержание базофилов.

IMM% - относительное (%) содержание незрелых гранулоцитов.

IMM# - абсолютное содержание незрелых гранулоцитов.

ATL% - относительное (%) содержание атипичных лимфоцитов.

ATL# - абсолютное содержание атипичных лимфоцитов.

GR% - относительное (%) содержание гранулоцитов.

GR# - абсолютное содержание гранулоцитов.

ESR (СОЭ скорость оседания эритроцитов) (Erythrocyte Sedimentation Rate) - неспецифический индикатор патологического состояния организма (норма 0-10 мм/час).

Контрольные вопросы

1. Что характеризует цветовой показатель крови?
2. Чему равна величина цветового показателя крови у сельскохозяйственных животных?
3. Как рассчитать цветовой показатель крови?
4. Чему равно среднее содержание гемоглобина в эритроците сельскохозяйственных животных и как его рассчитать?

Работа 10. Гемолиз

Гемолиз - процесс разрушения оболочки эритроцита и выхода гемоглобина в плазму. Гемолиз может быть: химический - вызванный воздействием химических веществ (кислоты, щелочи, хлороформ, эфир, спирт и т.д.); биологический - яды змей, насекомых, токсины микроорганизмов, при переливании несовместимой крови; физический - при сильном встряхивании, под воздействием высоких и низких температур; осмотический - при помещении эритроцитов в гипотонический раствор.

Осмоз - односторонняя диффузия растворителя через полупроницаемую мембрану из раствора с меньшей концентрацией в раствор с большей концентрацией. Он обусловлен стремлением системы к выравниванию концентрации раствора по обе стороны мембраны.

Осмотический гемолиз происходит в результате поступления воды через полупроницаемую мембрану эритроцита внутрь клетки до тех пор, пока мембрана не лопнет.

Осмотическое давление - сила, обуславливающая переход растворителя через полупроницаемую мембрану. Осмотическое давление крови обусловлено, в основном, содержанием в ней минеральных веществ (главным образом NaCl).

Растворы, обладающие одинаковым с кровью осмотическим давлением, называются изотоническими. Для теплокровных животных и человека изотоническим является 0,9 % раствор NaCl. Такой раствор называют физиологическим. Раствор с более высоким осмотическим давлением, чем осмотическое давление плазмы крови, называется гипертоническим, а имеющий более низкое давление - гипотоническим.

При помещении эритроцитов в гипертонический раствор происходит плазмолиз. Плазмолиз (гр. plasma вылепленное, сформированное и lysis освобождение) - потеря воды клеткой.

При помещении в гипотонический - вода переходит из раствора в клетку и она увеличивается в объеме.

Часть осмотического давления, обусловленная белками плазмы крови, называется онкотическим давлением. Величина онкотического давления в 200 раз меньше осмотического. Однако, несмотря на свою малую величину, оно играет исключительную роль в процессах образования тканевой жидкости, лимфы, мочи, всасывания воды в кишечнике.

Ход работы. Пронумеровать 7 пробирок. В пробирку №1 налить 3 мл физиологического раствора, в пробирку №2 - 3 мл дистиллированной воды, в пробирку №3 - 3 мл 0,1 % раствора HCl, в пробирку №4 - 2 мл физиологического раствора и 1 мл 10% водного раствора аммиака (нашатырный спирт), в пробирку №5 - 3 мл 5% раствора глюкозы, в пробирку №6 - 3 мл этилового спирта, в пробирку №7 - 3 мл стабилизированной крови.

В первые шесть пробирок добавить по две капли взвеси эритроцитов. Пробирку №7 поместить в морозильную камеру холодильника. Через час пробирку вынуть из морозильной камеры и поставить в теплую воду.

Определите отсутствие или наличие гемолиза во всех пробирках. При наличии гемолиза кровь становится прозрачной (лаковой).

Контрольные вопросы

1. Что такое гемолиз, и какие факторы его вызывают?
2. Что такое осмос и осмотическое давление?
3. Чем обусловлено осмотическое давление крови?
4. Какие растворы называются гипер-, изо- и гипотоническими?
5. Что такое плазмолиз?
6. Что такое онкотическое давление крови и чем оно обусловлено?

Работа 11. Определение осмотической резистентности эритроцитов

Осмотическая резистентность (устойчивость) - способность эритроцитов противостоять снижению осмотического давления.

Минимальная резистентность - концентрация раствора NaCl, в которой происходит начальная стадия гемолиза наименее устойчивых эритроцитов.

Максимальная резистентность - концентрация раствора NaCl, в которой происходит полный гемолиз эритроцитов.

Наименьшую резистентность имеют эритроциты овец (0,65 % NaCl), а наибольшую птиц (0,40 % NaCl) и рыб (0,28% NaCl). Резистентность эритроцитов у свиней 0,64, лошади 0,54, крупного рогатого скота 0,53, пушных зверей 0,46, кроликов

0,43, у человека 0,40 % NaCl. Молодые эритроциты осмотически менее устойчивы, чем старые. Снижение резистентности эритроцитов наблюдается при голодании, мышечном переутомлении, отравлениях, кровопотерях.

При ряде инфекционных и инвазионных болезней, а также при беременности осмотическая устойчивость эритроцитов повышается.

Ход работы. Пронумеровать 9 пробирок и заполнить их раствором NaCl по следующей схеме (табл. 1).

В каждую пробирку внести по две капли взвеси эритроцитов и, закрыв пробирку пробкой, несколько раз перевернуть ее вверх дном. Через 5 минут наблюдать результат. Отметить номера пробирок, в которых произошел полный гемолиз (+), частичный (\pm) и отсутствие гемолиза (-).

Таблица 1

Содержимое пробирок	Номера пробирок								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1% раствор NaCl, мл	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Дистиллированная вода, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Концентрация NaCl, %	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Результат (+, -, \pm)									

Контрольные вопросы

1. Чему равна осмотическая устойчивость эритроцитов у сельскохозяйственных животных?
2. Что такое минимальная и максимальная устойчивость эритроцитов?

Работа 12. Определение щелочного и кислотного буфера

Кровь имеет слабощелочную реакцию 7,35-7,55. Значение рН артериальной крови - 7,4, венозной - 7,35, тканевой жидкости - 7,0-7,2 (вследствие образования в ней кислых продуктов обмена). Стойкий сдвиг рН крови на 0,2-0,3 единицы приводит к гибели. В организме существует определенное соотношение

между кислыми и основными продуктами обмена веществ - кислотно-щелочное равновесие, которое поддерживается благодаря наличию в крови буферных систем и деятельностью выделительных органов (легких, почек, кожи, кишечника).

В крови имеются следующие буферные системы: карбонатная, фосфатная, гемоглобиновая и белковая.

Карбонатная буферная система представлена угольной кислотой (H_2CO_3) и гидрокарбонатом натрия (NaHCO_3). В случае поступления в плазму крови более сильной кислоты, чем угольная, ее анионы взаимодействуют с ионами Na^+ , образуя нейтральную соль, а ионы H^+ , соединяясь с ионами HCO_3^- , образуют слабо диссоциирующую угольную кислоту. Эта буферная система очень лабильна.

Запас бикарбонатов (солей угольной кислоты) способных нейтрализовать поступающие в кровь кислые продукты называется щелочным резервом крови.

Щелочной резерв имеет очень большое клиническое значение и определяется по количеству углекислого газа, которое может быть вытеснено серной кислотой из 100 мл плазмы крови. В норме этот показатель равен: у крупного рогатого скота 46-66, свиней 48-60, лошадей 50-65, овец 45-54, кур 48-52 об % CO_2 .

Фосфатная буферная система состоит из двух- и однозамещенного фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4). Первая соль обладает основными свойствами и реагирует с поступающими в кровь кислотами, а вторая соль обладает кислыми свойствами и реагирует со щелочами.

Белковая буферная система представлена белками плазмы крови. В кислой среде белки ведут себя как основания, а в щелочной как кислоты.

Гемоглобиновая буферная система представлена восстановленным гемоглобином, являющимся более слабой кислотой, чем угольная, вследствие чего он отдает ей ионы K^+ , а сам присоединяет ионы H^+ .

Различают щелочной и кислотный буфер. Щелочной буфер нейтрализует кислоты, а кислотный щелочи.

В процессе обмена веществ образуется большое количество кислот и для их нейтрализации необходим мощный щелочной буфер. В связи с этим буферные системы крови и тканей обеспечивают большую устойчивость к действию кислот, чем к действию оснований.

При поступлении в кровь большого количества кислых продуктов обмена происходит уменьшение щелочного буфера, и рН может сместиться в кислую сторону. Такое явление называется некомпенсированным ацидозом. Уменьшение щелочного буфера, при котором рН не изменяется, называется компенсированным ацидозом. При поступлении в кровь щелочных продуктов происходит аналогичное изменение с кислым буфером и возникает, соответственно, некомпенсированный и компенсированный алкалоз.

Метаболический ацидоз возникает при нарушении обмена веществ, болезни почек, при скармливании животным большого количества закисших кормов, атонии преджелудков, кетозах и других заболеваниях.

Ацидоз, возникающий в результате патологического уменьшения выделения легкими CO_2 , называется газовым (или респираторным). Респираторный ацидоз возникает при эмфиземе легких, бронхиальной астме, бронхите вследствие гиповентиляции легких.

Метаболический алкалоз может возникнуть при перекорме животных сахаросодержащими кормами, при некоторых заболеваниях.

Респираторный алкалоз может возникнуть при гипервентиляции легких (повышенное выделение из организма CO_2), вызванное перегреванием организма и рядом заболеваний мозга.

Ход работы. Определение кислотного буфера. Налить в пробирку 5 мл дистиллированной воды, добавить 1 каплю фенолфталеина и одну каплю 0,1 н. раствора NaOH. При этом появляется слабо-красное окрашивание.

Во вторую пробирку налить 4,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл сыворотки, добавить 1 каплю фенолфталеина. При помощи капельницы добавить по каплям 0,1 н. раствор NaOH до появления такого же окрашивания, что и в первой пробирке, считая количество капель, пошедшее на титрование.

Определение щелочного буфера. Налить в пробирку 5 мл дистиллированной воды, добавить 1 каплю метилоранжа и одну каплю 0,1 н. раствора HCl. При этом появляется слабо-красное окрашивание.

Во вторую пробирку налить 4,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл сыворотки, добавить 1 каплю метилоранжа. При помощи капельницы добавить по каплям 0,1 н. раствор HCl до по-

явления такого же окрашивания, что и в первой пробирке, считая количество капель, пошедшее на титрование.

Сравните величину щелочного и кислотного буфера.

Например, для смещения реакции в щелочную сторону на 5 мл дистиллированной воды потребовалась 1 капля щелочи, а в пробирке, где была сыворотка - 5 капель щелочи. Разница составила 4 капли. На нейтрализацию кислого буфера в 1 мл сыворотки пойдет 8 капель щелочи, а на нейтрализацию 5 мл - 40 капель. Следовательно, чтобы вызвать одинаковое изменение pH к сыворотке нужно добавить в 40 раз больше щелочи, чем к воде.

Аналогичный расчет проведите и по щелочному буферу. Определите, во сколько раз щелочной буфер больше кислотного.

Контрольные вопросы

1. Назовите буферные системы крови.
2. Чему равен pH артериальной, венозной крови и тканевой жидкости?
3. За счет чего поддерживается постоянство pH крови?
4. Что такое кислотный и щелочной буфер?
5. Каков принцип действия буферных систем?
6. Что такое щелочной резерв и чему он равен у сельскохозяйственных животных?
7. Что такое ацидоз и алкалоз?
8. Что способствует возникновению ацидоза и алкалоза?
9. Какой буфер в крови больше и почему?

Работа 13. Определение общего белка в сыворотке крови

Общее содержание белков в плазме крови млекопитающих колеблется в пределах 65,0 - 85,0 г/л. Основными из них являются альбумины, глобулины, фибриноген.

Белки плазмы крови обеспечивают оптимальную вязкость крови; удерживают воду в кровяном русле, поддерживают онкотическое давление плазмы; являются резервом для построения тканевых белков; транспортируют биологически активные вещества (гормоны, витамины, метаболиты, липиды, липоиды, катионы и др.); участвуют в регуляции кислотно-щелочного равновесия; играют важную роль в процессе свертывания крови (фибриноген); выполняют защитные функции, являются факто-

рами специфического и неспецифического иммунитета.

Снижение общего белка сыворотки крови (гипопротеинемия) отмечают при длительном голодании, неполноценном питании, остеодистрофии, хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта, нефрите, нефрозе, циррозе печени, гепатите, туберкулезе.

Повышение уровня белка (гиперпротеинемия) отмечается при белковом перекорме, кетозе, токсикозах, острых воспалительных процессах и вследствие тяжелых травм.

Количество белка в сыворотке крови колеблется в следующих пределах: крупный рогатый скот 72-87; свиньи 65-85; лошади 65-78; куры 43-59; собаки 54-77; кошки 57-79. У человека 65-85 г/л.

Ход работы. Рефрактометрический метод определения белка основан на преломлении лучей света при прохождении через сыворотку крови.

Установить рефрактометр (рис. 11) против источника света, открыть зеркало шкалы коэффициентов преломления и осветительное окошко верхней призмы, отрегулировать равномерность освещения поля зрения.

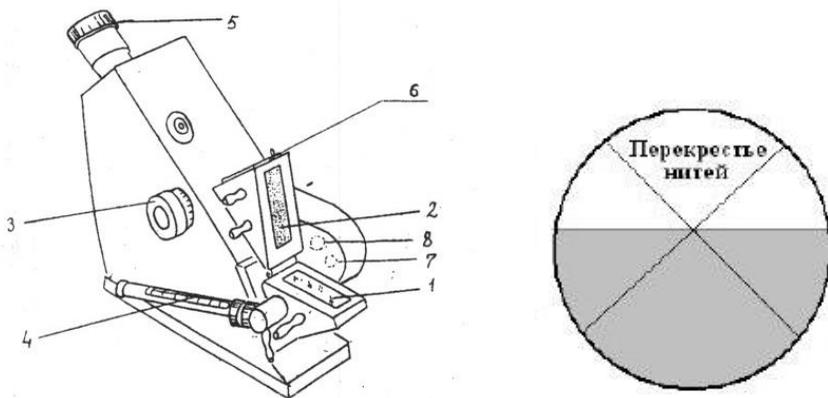


Рис. 11. Внешний вид рефрактометра. 1 - измерительная призма; 2 - верхняя призма; 3 – регулировочный винт; 4 – термометр; 5 – окуляр; 6 - осветительное окошко верхней призмы

Открыть измерительную призму и протереть её салфеткой, смоченной спиртом. Нанести на нижнюю измерительную призму 2-3 капли дистиллированной воды, закрыть крышку

призмы. Установить окрашенность границы светотени (контрастность) регулировочным винтом, расположенным справа. Установить вертикальную линию окуляра на коэффициент 1,3330 (показатель преломления воды), специальным ключом из комплекса ЗИП установить границы линии светотени на середину перекрестия.

Поверхность призм досуха вытереть мягкой марлевой салфеткой. При помощи дозатора нанести на нижнюю призму 25-50 мкл сыворотки крови и плотно закрыть камеру. Измерительным винтом, расположенным на рефрактометре слева, установить границу светотени в середине перекрестия и по нижней шкале снять показания. Расчет результатов производят по таблице Рейса, концентрацию белка выражают в г/л (приложения табл. 4).

Контрольные вопросы

1. Назовите функции белков сыворотки крови.
2. Каково количество белков в сыворотке крови у различных сельскохозяйственных животных?
3. Что такое гипо- и гиперпротеинемия и каковы причины их вызывающие?
4. Как определить количество белка в сыворотке крови?

Работа 14. Определение групп крови

В основе деления крови на группы лежит наличие специфических белков (агглютиногенов) на поверхности эритроцитов и в плазме крови (агглютининов).

Антигены - сложные органические вещества, несущие признаки чужеродной для организма генетической информации и способные при поступлении в организм вызвать ответную иммунную реакцию (т.е. образование антител).

Антитела - сложные белки плазмы крови (иммуноглобулины), образующиеся в организме под воздействием различных антигенов и нейтрализующие их вредное воздействие.

Впервые в 1901 году австрийский ученый Карл Ландштейнер обнаружил в крови человека агглютиногены А и В. За это открытие получил Нобелевскую премию. В 1907 году чешский ученый Ян Янский открыл у человека IV группу и предложил классификацию групп крови.

В плазме крови были обнаружены агглютинины α и β . В крови никогда одновременно не встречаются агглютиноген А и агглютинин α , агглютиноген В и агглютинин β . При взаимодействии одноименных агглютиногенов и агглютининов наступает агглютинация (склеивание) эритроцитов. Взаимодействие антиген-антитело проходит в две стадии. Вначале антитела фиксируются на клетке крови и вызывают склеивание форменных элементов. Затем происходит присоединение к антиген-антителу комплимента плазмы, что приводит к образованию комплекса антиген-антитело-комплемента, который лизирует мембрану эритроцитов, вызывая гемолиз. Для такой реакции должно быть достаточное количество (титр) антител.

В крови человека содержится индивидуальный набор специфических антигенов. В настоящее время известно около 500 антигенов форменных элементов и плазмы крови, объединенных десятки групповых антигенных систем.

В эритроцитах человека содержатся такие системы, как АВ0, Rhesus (D, C, E, d, c, e), Kell (K, k), Kidd (Jk^a, Jk^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), P (P₁, P₂, p, p^k), Lewis (Le^a Le^b), Lutheran (Lu^a, Lu^b) и многие другие. На поверхности белков плазмы крови обнаружено более 200 антигенов, которые объединены в 10 антигенных комплексов (Ym, Hp, Yc, Tf и другие).

Однако антигенные свойства большинства из них выражены слабо и при переливании крови ими пренебрегают.

Наибольшее значение при переливании крови имеет система АВ0 и Rh. Система АВ0 представлена четырьмя группами: 0, А, В и АВ (табл. 2).

Таблица 2

Группы крови

Группа крови	Агглютиногены эритроцитов	Агглютинины плазмы
I (0)	Нет	α, β
II (A)	A	β
III (B)	B	α
IV (AB)	A, B	нет

Известны разновидности агглютиногена А - А₁ и А₂. Соответственно группа II (А) имеет подгруппы II(А₁), II(А₂), а группа IV(АВ) - IV(А₁В) и IV(А₂В). Эритроциты подгруппы А₁ хорошо агглютинируются соответствующими сыворотками, а эритроциты подгруппы А₂ - слабо, и для выявления их необходимо применять высокоактивные стандартные сыворотки группы Вα и 0αβ. Эритроциты группы А₁ встречаются в 88%, а группы А₂ - в 12%. В настоящее время найдены варианты эритроцитов с еще более слабо выраженными агглютинирующими свойствами: А₃, А₄, А₅, А_z, А0 и др.

Соотношение групп крови: в России I(0) - 33 %, II(А) - 36%, III(В) - 23 % и IV(АВ) - 8; в США соответственно 45, 40, 10 и 5%; в Китае - 45, 23, 25 и 7 %.

Переливание крови. В настоящее время переливают только одногруппную (по системе АВ0) и однорезусную кровь.

Переливают чаще не саму кровь, а ее компоненты: эритроцитарную, тромбоцитарную, лейкоцитарная массу, альбумин, протеин, криопреципитат (содержит антигемофильный глобулин, фибринстабилизирующий фактор, фибриноген), фибриноген, протромбиновый комплекс, препараты иммунологического действия и др.

В экстремальных ситуациях (на усмотрение врача) допускается переливание донорской крови 0(I) группы всем реципиентам до 500 мл, так как при этом агглютинины разводятся кровью реципиента в несколько раз, и их концентрация не достигает уровня, при котором они могут агглютинировать эритроциты (правило Оттенберга).

Реципиентам АВ(IV) группы можно переливать кровь других групп, поскольку она не содержит агглютининов (универсальный реципиент).

Возможно переливание плазмы АВ(IV) всем реципиентам, плазмы А(II) и В(III) - реципиентам 0(I) группы, эритроцитарной массы II (А) Rh и III (В) Rh групп в IV группу.

Но это абсолютно недопустимо у детей.

Для того, чтобы избежать ошибок, связанных с неправильным подбором сыворотки, ложной оценкой результата, или (в редких случаях) несовместимости по другим групповым признакам, производят перекрестную биологическую пробу. Для этого эритроциты донора смешивают с сывороткой реципиента. Затем эритроциты реципиента смешивают с сывороткой донора.

Переливание осуществляют лишь при четком отрицательном результате обеих проб.

В эритроцитах сельскохозяйственных животных обнаружено большое количество антигенов. Так, у крупного рогатого скота их насчитывается более 100, свиней более 70, лошадей и овец 30, кур 60. Однако у большинства видов сельскохозяйственных животных в плазме очень мало или совсем отсутствуют естественные антитела. Поэтому о группах крови животных делают заключение только по антигенной характеристике эритроцитов.

Совокупность антигенов, контролируемых одним локусом, называется генетической системой группы крови. Каждая система включает в себя несколько антигенов. Так, система группы крови В (крупного рогатого скота) включает около 50 антигенов.

Совокупность всех генетических систем групп крови одного животного называется типом крови.

У крупного рогатого скота установлено 13 систем групп крови (A,B,C,F,J,L,M,S,Z,R₁,T₁,N), у свиней 17, лошадей 9 и овец 16, кур 14.

Практическое значение определения систем групп крови имеет в селекционной работе, так как для организации племенной работы на высоком уровне необходим иммуногенетический контроль происхождения животных. Иммуногенетический контроль проводят при испытании производителей по качеству потомства, а также для анализа моно- и дизиготных близнецов.

Ход работы. Определение групп крови проводят с помощью стандартных гемагглютинирующих сывороток, полученных из донорской крови или моноклональных синтетических цоликлонов с антителами анти-А и анти-В (цоликлон анти-А окрашен в красный, а анти-В в синий цвет).

На обратной стороне предметного стекла при помощи воскового карандаша отметить номер стандартной сыворотки. Разными пипетками нанести на предметное стекло с одного края каплю стандартной сыворотки II группы, а с другого края - III группы. Одним концом стеклянной палочки перенести каплю крови в сыворотку II группы, вторым концом этой же палочки перенести каплю крови в сыворотку III группы. Соотношение сыворотки к крови 1:5 - 1:10.

Кровь тщательно размешать в стандартной сыворотке. Спустя 3-4 минуты после смешивания определить наличие или

отсутствие агглютинации. При наличии агглютинации капля становится прозрачной, и появляются многочисленные мелкие хлопья из слипшихся эритроцитов. Если агглютинация отсутствует в обеих каплях сыворотки, то исследуемая кровь относится к I группе, при агглютинации с сывороткой III группы исследуемая кровь II группы, при агглютинации с сывороткой II группы - кровь III группы, при агглютинации с сывороткой II и III групп - кровь IV группы.

Контрольные вопросы

1. Что такое антигены и антитела?
2. Что лежит в основе деления крови на группы?
3. Дайте характеристику группам крови системы АВО.
4. Как определить группу крови?
5. Что такое система групп животных?
6. Какое количество систем групп крови у различных сельскохозяйственных животных?
7. Что такое тип крови?
8. Какое практическое значение имеет определение системы групп крови животных?

Работа 15. Определение резус-фактора

На мембране эритроцитов людей имеется несколько антигенов системы резус (С, D, E, с, d, е). Наиболее выражены антигенные свойства у агглютиногена D. Кровь, содержащую D агглютиногены, называют резус-положительной (Rh^+), а не содержащую - резус-отрицательной (Rh^-).

Впервые обнаружили D антиген в 1940 году Карл Ландштейнер (Австрия) и Александр Винер (США) у обезьян вида *Macacus rhesus*.

В крови людей нет готовых антител по отношению к резус-фактору. Они вырабатываются лишь после введения резус отрицательным реципиентам резус-положительной крови (при переливании резус-положительной крови или во время беременности резус-отрицательной женщины от резус-положительного плода). Выработанные в организме резус-антитела сохраняются, и при повторном введении резус-положительной крови (сенсibilизированному человеку) возникает иммунный конфликт.

Большинство Rh-агглютининов представляют собой неполные антитела, размеры которых, в отличие от α - и β -агглютининов достаточно малы, и поэтому они способны проникать через плацентарный барьер. Высокое содержание Rh-антител в крови Rh⁻ матери (в случае если у плода кровь Rh⁺) может привести к нарушению жизнедеятельности резус-положительного плода и даже к внутриутробной смерти. Для предупреждения образования резус-антител у матери, не позднее двух часов после родов, вводят сыворотку, содержащую антирезус-гамма глобулин (АГГ), который связывает и разрушает эритроциты плода, попавшие в организм матери, в результате собственной иммунизации не происходит, а введенные резус-антитела разрушаются и выводятся из организма.

Ход работы. Взять микропробирку и поместить в нее 1 каплю антирезусной сыворотки (D). С места прокола насосать в капилляр примерно такое же количество крови и перенести ее в микропробирку. Перемешать содержимое путем вращения микропробирки. Через 5 минут наблюдать результат. Для более точного выявления агглютинации (через 5 минут) можно добавить 0,5-1,0 мл физиологического раствора. Если агглютинация наступила, то такая кровь резус-положительная, а если нет - то резус-отрицательная.

Контрольные вопросы

1. Что такое резус-фактор и как его определить?
2. Где и когда учитывают резус-фактор?

Приложения

Таблица 1

Лейкограмма крови здоровых животных

Вид животных	Б	Э	Нейтрофилы				Л	МОН
			М	Ю	П	С		
КРС	0-2	5-8	-	0-1	2-5	20-35	40-65	2-7
Лошади	0-1	2-6	-	0-1	3-6	45-62	25-44	2-4
Свины	0-1	1-4	-	0-2	2-4	40-48	40-50	2-6
Овцы	0-1	4-12	-	0-2	3-6	35-45	40-50	2-5
Собаки	0-1	3-8	-	-	1-6	43-71	21-40	1-5
Кошки	0-1	2-10	-	0-1	3-9	40-45	36-51	1-5
Куры	1-3	6-10	-	-	-	24-30	52-60	4-10

Таблица 2

Некоторые гематологические показатели у человека

Показатели	Референтные значения
Гематокрит, %	у мужчин 40-48; у женщин 36-42
Эритроциты, $10^{12}/л$	у мужчин 4,2-5,6; у женщин 3,8-5,1
Ретикулоциты, %	0,2-1,0
Объем эритроцита, фл	80-100
СОЭ, мм/ч	у мужчин 3-6; у женщин 8-10
Гемоглобин, г/л	у мужчин 130-160; у женщин 120-140
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	27-31
Цветовой показатель	0,85-1,05
Лейкоциты, $10^9/л$	4,0-9,0
Базофилы, %	0 -1,0
Эозинофилы, %	0,5-5,0
Нейтрофилы:	
Палочкоядерные, %	1,0 - 6,0
Сегментоядерные, %	47,0 -72,0
Моноциты, %	3,0 -11,0
Лимфоциты, %	19 - 37 %
Тромбоциты, $10^9/л$	180,0 - 320,0
Глюкоза, мг% (ммоль/л)	80-120 (3,5-5,5)

Таблица 3

Гематологические показатели здоровых животных

Показатели	Вид животных							
	КРС	Лошади	Свины	Овцы	Собаки	Кошки	Кролики	Куры
Объем крови, мл/кг массы	65-82	85-100	65-80	70-90	55-65	55-60	52-56	90-120
Гематокрит, л/л	0,36-0,46	0,32-0,48	0,36-0,43	0,27-0,45	0,37-0,55	0,30-0,45	0,35-0,45	0,37-0,43
Время свертывания, мин	7-9	10-12	3-4	4-5	4-6	4-5	4-5	2-3
Эритроциты, $\cdot 10^{12}/л$	5,0-7,5	6-9	6-7,5	7-12	5,2-8,4	6,6-9,4	5,0-7,5	2,5-4,0
Лейкоциты, $\cdot 10^9/л$	6-10	7-12	8-16	6-11	8,5-10,5	5,5-19	6-9	20-40
Тромбоциты, $\cdot 10^9/л$	260-700	200-500	180-300	270-500	250-530	300-660	190	32-100
Гемоглобин, г/л	90-120	80-140	90-110	70-110	110-170	80-150	80-150	80-120
СОЭ, мм/ч	0,5-1,5	40-70	2-9	0,3-1,0	2-6	2-3	1-2	2-3
* Общий белок, г/л	60-80	60-85	60-80	60-75	59-73	54-77	65-75	60-75
* Глюкоза, ммоль/л	2,6-3,0	3,0-4,8	3,3-4,7	2,5-3,3	4,4-5,6	4,4-7,8	3,85-8,32	8,3-11,1
* Кальций, ммоль/л	2,5-3,0	2,7-3,2	2,5-3,0	2,7-2,8	2,2-2,8	2,0-2,8	2,4-4,2	2,7-3,2
* Фосфор, неорганический, ммоль/л	1,7-2,1	1,5-1,8	1,6-2,0	1,5-1,8	0,8-2,0	0,9-2,3	1,1-2,0	2,3-2,9

* В сыворотке крови. Коэффициент перевода мг% в ммоль/л для глюкозы 0,0555, кальция 0,2495, фосфора 0,325, гемоглобина (ммоль/л - г/литр · 0,0621)

Таблица 4

Содержание общего белка в сыворотке крови

Степень рефракции	Содержание белка, %	Степень рефракции	Содержание белка, %	Степень рефракции	Содержание белка, %
1.3410	3.00	1.3450	5.25	1.3491	7.63
1.3411	3.03	1.3451	5.31	1.3492	7.69
1.3412	3.06	1.3452	5.37	1.3493	7.74
1.3413	3.10	1.3453	5.42	1.3494	7.79
1.3414	3.15	1.3454	5.49	1.3495	7.87
1.3415	3.20	1.3455	5.54	1.3496	7.92
1.3416	3.27	1.3456	5.61	1.3497	7.98
1.3417	3.32	1.3457	5.66	1.3498	8.04
1.3418	3.39	1.3458	5.71	1.3499	8.09
1.3419	3.44	1.3459	5.76	1.3500	8.17
1.3420	3.52	1.3460	5.83	1.3501	8.21
1.3421	3.55	1.3461	5.89	1.3502	8.28
1.3422	3.62	1.3462	5.94	1.3503	8.33
1.3423	3.68	1.3463	6.01	1.3504	8.39
1.3424	3.74	1.3464	6.06	1.3505	8.45
1.3425	3.79	1.3465	6.12	1.3506	8.50
1.3426	3.85	1.3466	6.18	1.3507	8.56
1.3427	3.92	1.3467	6.24	1.3508	8.62
1.3428	3.97	1.3468	6.29	1.3509	8.69
1.3429	4.02	1.3469	6.36	1.3510	8.74
1.3430	4.09	1.3470	6.42	1.3511	8.80
1.3431	4.17	1.3471	6.48	1.3512	8.86
1.3432	4.20	1.3472	6.58	1.3513	8.91
1.3433	4.26	1.3473	6.61	1.3514	8.96
1.3434	4.32	1.3474	6.63	1.3515	9.03
1.3435	4.38	1.3476	6.77	1.3516	9.08
1.3436	4.43	1.3477	6.82	1.3517	9.14

Содержание

1. Способы и техника взятия крови	4
2. Получение цельной крови, плазмы, сыворотки, дефибринированной крови и фибрина	6
3. Определение показателя гематокрита	7
4. Подсчет количества эритроцитов	8
5. Подсчет количества лейкоцитов	13
6. Выведение лейкоцитарной формулы	16
7. Определение скорости оседания эритроцитов	22
8. Определение количества гемоглобина	24
9. Расчет эритроцитарных индексов	27
10. Гемолиз	32
11. Определение осмотической резистентности эритроцитов	33
12. Определение щелочного и кислотного буфера	34
13. Определение общего белка в сыворотке крови	37
14. Определение групп крови	39
15. Определение резус-фактора	43
Приложения	45

Список использованной литературы

1. Сборник заданий к лабораторному практикуму по физиологии и этологии животных / Т.В. Ипполитова, В.И. Максимов, Т.Е. Ткаченко и др. М.: ФГОУ ВПО МГАВМ иБ, 2010. 119 с.
2. Практикум по физиологии и этологии животных / В.Ф. Лысов, Т.В. Ипполитова, В.И. Максимов и др. М.: КолосС, 2005. 256 с.
3. Физиологические показатели животных / Н.С. Мотузко, Ю.И. Никитин, В.К. Гусаков и др. Минск: Техноперспектива, 2008. 95 с.
4. Овсеенко Ю.В. Курс лекций «Физиология и этология животных»: учебно-методическое пособие для студентов специальности «Ветеринария». Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2015. 295 с.
5. Овсеенко Ю.В., Овсеенко Е.В. Словарь физиологических терминов: учебно-методическое пособие. Брянск: Изд-во Брянская ГСХА, 2014. 174 с.
6. Овсеенко Ю.В., Кривопушкина Е.А. Система крови: учебно-методическое пособие. Брянск: Изд-во Брянская ГСХА, 2011. 44 с.

Учебное издание

Овсеенко Юрий Валентинович
Кривопушкина Елена Андреевна
Горшкова Елена Валентиновна

ФИЗИОЛОГИЯ И ЭТОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

Система крови

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 05.03.2018 г. Формат 60x84. 1/16.

Бумага печатная Усл.п.л. 2,90. Тираж 100 экз. Изд. № 5542.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ