

ТЕМА 1. КРОВ ЯК ВНУТРІШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ ОРГАНІЗМУ. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КРОВІ ТА ПРОЯВИ ЇХ ПОРУШЕНЬ

Мета: Вивчити фізіологічні функції крові. Засвоїти склад, кількість та основні показники крові людини. З'ясувати фізико-хімічні властивості крові. Ідентифікувати види змін об'єму циркулюючої крові. Визначити межі коливань осмотичного тиску плазми крові, при яких ще зберігається цілісність оболонки еритроцитів і лейкоцитів, і дати оцінку стійкості оболонки цих видів клітин. Дослідити механічну резистентність еритроцитів. Визначити швидкість осідання еритроцитів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Фізіологічні функції крові.
2. Склад, кількість та основні показники крові людини.
3. Фізико-хімічні властивості крові.

Матеріали та обладнання: 5 звичайних лабораторних пробірок, 25 центрифужних або аглютинаційних пробірок об'ємом 10 мл, штативи для пробірок, гумові груші, піпетки, мікропіпетки, мікроскоп, лічильні камери Горяєва, піпетка від гемометра Салі, чотири змішувача для еритроцитів, предметні та шліфувальні скельця, скарифікатори, вата, прилад Панченкова, центрифуга на 500 і 2300 об/хв, 96% спирт етиловий, фізіологічний розчин, кров, свіжа або консервована 5% розчином цитрату натрію, 1 і 3% розчини хлориду натрію, 2,8 і 5% розчини цитрату натрію, 0,5% розчин желатини, рідина Локка (1 л дистильованої води, 9 г хлориду натрію, 0,42 г хлориду калію, 0,24 г хлориду кальцію та 0,2 г бікарбонату натрію), барвник для розведення крові (1,5 мл 1% розчину генціанового фіолетового, 1 мл розчину концентрованої оцтової кислоти, 20 мл дистильованої води), 0,1 н розчин соляної кислоти, дистильована вода.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Завдання 1. Визначення характеру змін об'єму циркулюючої крові.

Проаналізувати зміни об'єму циркулюючої крові, зображені на рис. 1 під номерами 2-9 (№ 1 – проста нормоволемія, або норма), та назвати патологічні стани, що їм відповідають.



Заштрихована частина смужок відповідає гематокриту, а їх загальна довжина – загальному об'єму крові.

Рисунок 1. Зміни об'єму циркулюючої крові.

Завдання 2. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів макроскопічним методом Лімбека та Ріб'єра.

Принцип методу. Резистентність еритроцитів – це здатність оболонки еритроцитів протистояти руйнівній дії низького осмотичного тиску розчину, в якому знаходяться еритроцити. Унаслідок таких впливів може виникнути гемоліз – тобто руйнування оболонки еритроцитів. Для практичної медицини важливо визначити осмотичну резистентність, що характеризує фізико-хімічні властивості еритроцитів, насамперед еластичність та щільність їх оболонки, що неоднакові у старих і молодих клітин. Осмотичний гемоліз еритроцитів у нормі має певні параметри, які дуже розширюються при різноманітних порушеннях функції червоного кісткового мозку.

Досліджують резистентність мембрани еритроцитів відносно гіпотонічних розчинів натрію хлориду. При концентрації 0,48-0,46% у нормі настає гемоліз лише найменш стійких еритроцитів (мінімальна резистентність). Візуальне визначення рівня мінімальної резистентності – це перші, ледь вловимі сліди гемолізу еритроцитів, тобто поява в розчині легкого відтінку рожевого або жовтого.

У разі подальшого зменшення концентрації натрію хлориду починається гемоліз і стійкіших еритроцитів. У 0,34-0,32% розчині натрію хлориду руйнуються навіть найстійкіші еритроцити (максимальна резистентність). Розчин стає прозорим, схожим на лак (так званий лаковий розчин). Інтервал між верхньою та нижньою межами резистентності називається амплітудою резистентності.

Клінічне значення. Зменшення осмотичної резистентності еритроцитів спостерігається при гемолітичній хворобі новонароджених, спадковому мікросфероцитозі, а також (у меншому ступені вираженості) при токсикозах, бронхопневмоніях, гемобластозах і цирозах печінки.

Збільшення осмотичної резистентності еритроцитів спостерігається при механічній жовтяниці, поліцитемії, залізодефіцитній анемії, гемоглобінозі S і після масивної крововтрати.

Хід проведення. З 1 % розчину хлориду натрію в центрифужних або аглютинаційних пробірках виготовити ряд розведень за схемою:

№ пробірки	Кількість мл 1% NaCl	Кількість мл дистильованої води	Одержана концентрація розчину
1	0,70	0,30	0,7%
2	0,68	0,32	0,68%
3	0,66	0,34	0,66%
4	0,64	0,36	0,64%
5	0,62	0,38	0,62%
6	0,60	0,40	0,6%
7	0,58	0,42	0,58%
8	0,56	0,44	0,56%
9	0,54	0,46	0,54%
10	0,52	0,48	0,52%
11	0,50	0,50	0,5%
12	0,48	0,52	0,48%
13	0,46	0,44	0,46%
14	0,44	0,56	0,44%
15	0,42	0,58	0,42%
16	0,40	0,60	0,4%
17	0,38	0,62	0,38%
18	0,36	0,64	0,36%
19	0,34	0,66	0,34%
20	0,32	0,68	0,32%
21	0,30	0,70	0,3%
22	0,28	0,72	0,28%
23	0,24	0,76	0,24%

У кожен пробірку додати по 1 краплі свіжої або дефібринованої крові. Кров краще набирати піпеткою від гемометра Салі та вводити в кожен пробірку по 20 мкл. Вміст пробірок обережно перемішати до рівномірного забарвлення і залишити на 1 годину в штативі при кімнатній температурі. Через 1 годину, не збовтуючи вмісту пробірок, подивитись, де спостерігається руйнування оболонки еритроцитів (гемоліз). Стан крові оцінити за ступенем забарвлення розчину натрію хлориду, що міститься над осілими еритроцитами у пробірках.

Якщо візуально важко визначити результати дослідження, то потрібно провести центрифугування вмісту в пробірках впродовж 3 хв при 2300 об/хв.

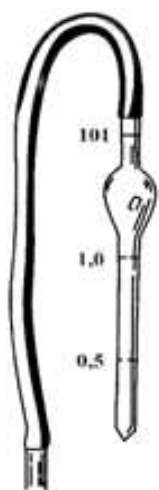
Оформити протокол досліду. Записати значення мінімальної та максимальної резистентності еритроцитів. Розрахувати її амплітуду. Зробити висновки.

Завдання 3. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів мікроскопічним методом Яновського.

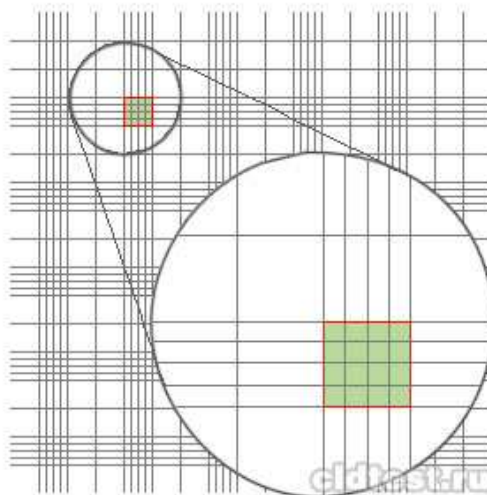
Принцип методу. Підрахунок у лічильній камері кількості еритроцитів, які залишаються в гіпотонічних розчинах.

Хід проведення. Використовувати три розчини хлориду натрію різної концентрації: 0,5% розчин, в якому гемоліз нормальної крові можливий, 0,4% розчин, в якому в звичайних умовах гемоліз достатньо виражений, і проміжний 0,46% розчин.

Досліджувану кров набрати в чотири змішувача для еритроцитів до мітки «0,5» і в трьох з них розвести кров зазначеними вище розчинами, а в четвертому – 3% розчином хлориду натрію до мітки «101» (розведення 1 : 200). Під малим збільшенням мікроскопу (об'єктив – 8×, окуляр – 15×) у затемненому полі зору (з прикритою діафрагмою і трохи опущеним конденсором) підрахувати кількість еритроцитів у 5 великих квадратах по діагоналі сітки Горяєва. За результатами підрахунку в лічильній камері обчислити процент стійких еритроцитів по відношенню до загальної кількості їх у 1 мкл крові, для чого провести підрахунок еритроцитів у 3 % розчині.



А



Б

А – змішувач (меланжер) для підрахунку еритроцитів; Б – лічильна сітка камери Горяєва (у збільшеному вигляді продемонстровано великий квадрат, поділений на 16 малих квадратів).

Рисунок 2. Обладнання для підрахунку кількості еритроцитів.

Оформити протокол досліду. Записати отримані результати. Зробити висновки.

Завдання 4. Визначення механічної резистентності еритроцитів методом Мармонта та Біанкі.

Принцип методу. Еритроцити травмуються механічно не до повного руйнування, а тільки до розпаду їх на окремі фрагменти.

Клінічне значення. Дослідження механічної резистентності еритроцитів має особливе значення при надбаних формах гемолітичної анемії, при яких, як відомо, зміни осмотичної резистентності часто не можуть бути виявлені без інкубації. Механічна резистентність знижена у хворих на гіпер- і гіпохромні анемії, для яких у розпал хвороби характерні сплюснена форма еритроцитів і підвищена осмотична резистентність. У хворих з вродженим сфероцитозом розпад еритроцитів на фрагменти не спостерігається.

Хід проведення. Кров взяти в кількості 1 мл (можна взяти з пальця) та стабілізувати її сумішшю 2,8% розчину цитрату натрію, 0,5% розчину желатини та рідини Локка (по 2 мл кожного). Потім кров потрібно центрифугувати 5 хв при 500 об/хв (не більше). Уламки еритроцитів, які при цьому утворюються, спливають у верхній шар розведеної плазми. Останню злити в іншу пробірку, знову центрифугувати також 5 хв при 500 об/хв. Фрагменти осідають на дно. З осаду приготувати мазки.

На свіжих препаратах серед маси еритроцитів, які збереглися, знайти фрагменти різної величини та форми: дрібні, великі, округлі, безформні, передstadії фрагментації, які залишаються ще з'єднаними з еритроцитами, що розпадаються. У забарвлених препаратах кількість фрагментів у мазках крові для підрахунку ступеня розпаду краще підраховувати по відношенню до 1000 еритроцитів, тобто в проміле (‰).

У нормі кількість фрагментів, які утворюються, не перевищує 0,75-3‰.

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

Завдання 5. Визначення осмотичної резистентності лейкоцитів методом Педерціні, модифікованим Кучерою та співав.

Принцип методу. Зменшення через певні проміжки часу кількості лейкоцитів у крові, змішаною з гіпотонічним розчином хлориду натрію.

Клінічне значення. При сепсисі, пневмонії стрептококової етіології, анемії Бірмера виявлено зниження осмотичної стійкості полінуклеарів з подальшою нормалізацією в період клінічної ремісії. Підвищення осмотичної резистентності полінуклеарів відмічено при грипозних пневмоніях та в окремих випадках при злоякісних новоутвореннях.

Хід проведення. Кров, взяту з пальця в кількості 0,1 мл, ретельно перемішати в пробірці з 0,9 мл 0,2% розчину хлориду натрію. Перед кожним підрахунком розведену кров розмішати, до 0,1 мл її додати 0,1 мл барвників і після повторного розмішування заповнити лічильну камеру. Підрахунок формених елементів провести відразу після взяття крові та через 30, 60, 120 і 180 хв. Кінцеве розведення буде 20-кратне.

При визначенні у здорових людей осмотичної стійкості лейкоцитів по відношенню до 0,2% розчину хлориду натрію через 30, 60, 120 і 180 хв незруйнованими відповідно залишаються в середньому 94, 82, 43 і 26% полінуклеарів і 86, 68, 42, 25 % мононуклеарів. При значних зсувах формули вліво спостерігається швидке набухання й округлення ядра паличкоядерних і юних нейтрофілів у гіпотонічному розчині, що може призвести до помилкового зарахування цих клітин до групи мононуклеарів.

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

Завдання 6. Визначення швидкості осідання еритроцитів методом Панченкова.

Принцип методу. Кров є одночасно справжнім колоїдним розчином і суспензією. Частки речовин, суспендовані у рідкому середовищі, випробовують на дію протилежно спрямованих сил: сили тяги, що забезпечує осідання часток, та дифузії, за рахунок якої частки колоїдів перемішуються.

Встановлено, що швидкість осідання частки прямо пропорційна квадрату її радіуса та різниці щільності суспендованої речовини й розчинника, а також зворотно пропорційна в'язкості розчинника. Велике значення мають і заряди часток, що містяться в розчині.

Формені елементи, суспендовані в розчині колоїдів плазми та міцно зв'язані з ними зарядами, осідатимуть у стабілізованій крові за рахунок посилення їх агломерації. При цьому кров розділиться на 2 шари: верхній – плазма та нижній – формені елементи.

Клінічне значення. Співвідношення холестерину й лецитину в плазмі, вміст жовчних пігментів та жовчних кислот, зміна в'язкості, рН, властивості еритроцитів, кількість гемоглобіну тощо впливають на швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ).

Головними ж чинниками, від яких залежить ШОЕ, вважають якісні та кількісні зміни білків у плазмі. Так, збільшення кількості великодисперсних білків (глобулінів) призводить до підвищення ШОЕ, а зменшення їх концентрації та збільшення вмісту альбумінів зумовлює її зниження.

ШОЕ дає деяке уявлення про співвідношення між білками плазми та їх електростатичну взаємодію з еритроцитами крові.

У фізіологічних умовах ШОЕ збільшується при вагітності (у другій половині) та при інтенсивній фізичній роботі.

Значний вплив на ШОЕ здійснює прийом деяких лікарських препаратів і терапевтичні заходи. Так, пришвидшення ШОЕ відмічається при специфічній та неспецифічній подразнюючій терапії, вакцинотерапії, переливанні крові, тривалому прийомі соди і т. д.

Уповільнення ШОЕ спостерігається при прийомі саліцилових, ртутних і кальцієвих препаратів, діуретиків, снодійних і протималярійних засобів.

Хід проведення. Прилад Панченкова складається з дерев'яного або пластмасового штатива з гніздами і скляних капілярів з мітками 0, К, Р. Мітки 0 і К знаходяться на одному рівні – 100 мм від кінця піпетки (рис. 3).

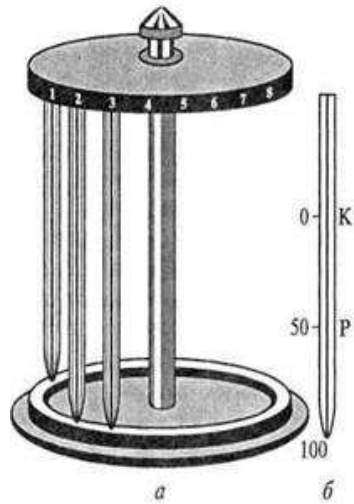


Рисунок 3. Прилад (апарат) Панченкова: а – загальний вигляд, б – капіляр.

Кров донора, змішану з 5 % розчином натрію цитрату у співвідношенні 4:1, перемішати й набрати її до відмітки К за допомогою груші. Для цього на початку роботи капіляр змочити 5 % розчином цитрату натрію. Потім розчин набрати до мітки Р (50 мм), перенести його на предметне скло. Після чого в цей же капіляр до мітки К двічі набрати кров. Для попадання крові в капіляр кінчик його потрібно приставити до краплі крові, а сам капіляр потрібно тримати майже горизонтально, тоді кров набирається в капіляр швидше. Набрану кров видути на те саме предметне скло в розчин цитрату натрію. Суміш, яка утворилася, потрібно ретельно перемішати, набрати в піпетку та знов видути на предметне скло. Повторити декілька разів. Потім стабілізовану кров набрати в піпетку до мітки 0 і поставити в штатив. Для забору суміші потрібно капіляр перевести в горизонтальне положення, а кінчик його приставити до суміші, що знаходиться на предметному склі. Капіляр слід перевести у вертикальне положення, попередньо зажавши верхній отвір великим пальцем, і поставити в одне з гнізд апарата Панченкова. Верхній кінець капіляра можна відкрити тільки тоді, коли його нижній кінець щільно придавить гумову прокладку, що є в апараті Панченкова. Верхню частину капіляра також слід ретельно закріпити в апараті. Через 30 хв. та 1 год. визначити рівень осілих еритроцитів у капілярі. Швидкість осідання еритроцитів визначають за висотою стовпчика плазми, який знаходиться над осадом крові (у мм).

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Чи відповідають нормі межі зміни осмотичного тиску, за яких зберігається цілісність оболонки еритроцитів?
2. Про що може свідчити підвищення (чи зниження) меж резистентності?

3. Які бувають види гемолізу?
4. Про які зміни у складі плазми крові свідчить підвищення ШОЕ?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Воробель А. В. Основи гематології: монографія. Івано-Франківськ : Вид-во «Плай» ЦІТ Прикарпатського університету імені Василя Стефаника, 2009. 148 с.
2. Гематологія : посібник / за ред. А. Ф. Романової. Київ : Медицина, 2006. 456 с.
3. Гематологія і трансфузіологія / за ред. С. М. Гайдукової. Київ : Три крапки, 2001. 752 с.
4. Григорова Н. В. Гематологія : навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра спеціальності «Біологія» освітньо-професійної програми «Біологія». Запоріжжя : ЗНУ, 2020. 80 с. (затверджено вченою радою ЗНУ, протокол № 9 від 28.04.2020 р.).
5. Іонов І. А., Комісова Т. Є., Слюсарев В. Ф., Шаповалов С. О. Фізіологія крові та внутрішнього середовища: методичні рекомендації. Харків : ЧП Петров В.В., 2017. 48 с.
6. Третьяк Н. М. Гематологія. Київ : Зовнішня торгівля, 2005. 240 с.
7. Шиффман Ф. Дж. Патофізіологія крові / пер. с англ. Н. Б. Серебряной, В. И. Соловьева. Москва : Санкт-Петербург : Бином, 2016. 448 с.