

ТЕМА 2. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕРИТРОЦИТІВ. СПОЛУКИ ГЕМОГЛОБІНУ ТА ЙОГО ФУНКЦІЇ

Мета: Знати морфофункціональну характеристику еритроцитів. Вивчити структуру, властивості та сполуки гемоглобіну. З'ясувати шляхи надходження заліза в організм і синтез гемоглобіну. Визначити кількість еритроцитів і гемоглобіну в периферичній крові. Провести розрахунок індексів еритроцитів. Підрахувати кількість ретикулоцитів у мазку крові. Отримати кристали геміну та вивчити їх під мікроскопом.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Структура та функції еритроцитів.
2. Гемоглобін: структура, властивості, сполуки.
3. Надходження заліза в організм і синтез гемоглобіну.

Матеріали та обладнання: мікроскоп, лічильна камера Горяєва, штатив, піпетки, гемометр Салі (гемометр ГС-3), вологі камери (чашки Петрі з вологим фільтрувальним папером), скарифікатори, вата, гумова груша, предметні скельця, покривні скельця, спиртівка, 96% етиловий спирт, дистильована вода, фізіологічний розчин, 3%-й розчин хлориду натрію, 0,1 н розчин соляної кислоти, 1,2 % спиртовий розчин діаманткрезилового синього.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Завдання 1. Визначення кількості еритроцитів у 1 мкл крові.

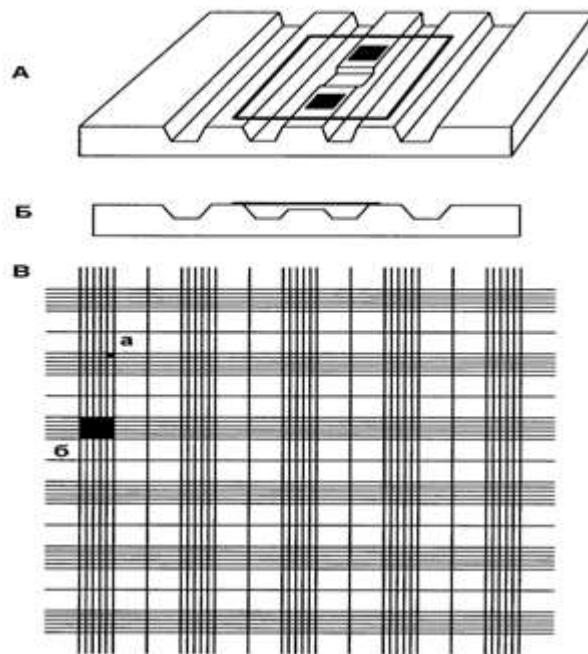
Принцип методу. В якості одного з уніфікованих методів використовують підрахунок еритроцитів у лічильній камері. Підрахунок кількості еритроцитів проводять під мікроскопом у певній кількості квадратів лічильної камери і перераховують на 1 л крові, виходячи з об'єму квадратів і розведення крові.

Клінічне значення. Зниження числа еритроцитів в крові є одним з основних критеріїв анемії. Ступінь еритропенії може варіювати при різних формах анемії. Підвищення кількості еритроцитів – еритроцитоз, може бути зумовлений багатьма причинами. Абсолютні еритроцитози супроводжують обструктивні захворювання легень, вади серця, захворювання центральної нервової системи. Відносні еритроцитози пов'язані з порушенням гемоконцентрації і характеризуються нормальним об'ємом циркулюючих еритроцитів при зниженні маси циркулюючої крові і маси циркулюючої плазми.

Будова камери Горяєва. Лічильна камера складається з товстого прямокутного (предметного) скла, в центральній частині якого нанесено дві

сітки Горяєва, що розмежовані глибокою поперечною канавкою. Збоку від сіток розташовані скляні прямокутні пластинки, до яких притирається шліфоване накривне скельце.

Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів. Частина з них розділено вертикально і горизонтально на 16 малих квадратів, які чергуються з квадратами, що поділені тільки горизонтальними або вертикальними лініями, і з чистими квадратами, без ліній. Глибина камери дорівнює 1/10 мм, бік малого квадрата – 1/20 мм, отже, об'єм одного малого квадрата становить 1/4000 мм³ (рис. 1).



А, Б – зовнішній вигляд камери Горяєва; В – лічильна сітка камери: а – малий квадрат; б – великий квадрат.

Рисунок 1. Камера Горяєва.

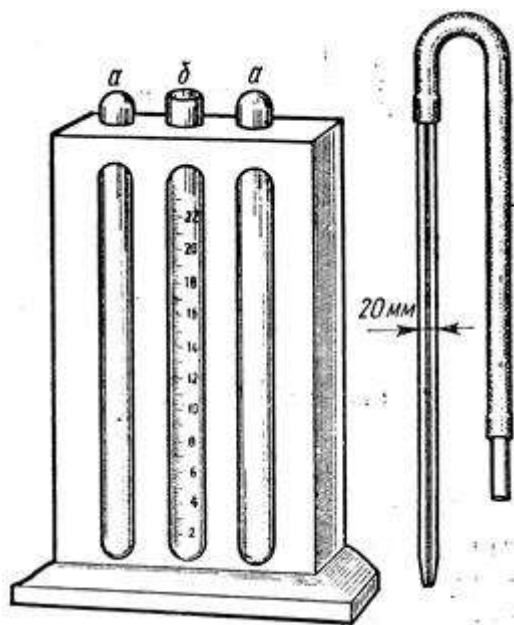
Хід проведення. У чисту суху пробірку відміряти піпеткою 4 мл 3%-го розчину хлориду натрію. З проколотою скарифікатором пальця в піпетку від гемометра Салі відібрати 20 мкл крові (до позначки на піпетці) і внести її в розчин у пробірці. Кілька разів промити розчином піпетку (втягуючи розчин у піпетку і видуваючи його у пробірку). Перемішати рідину в пробірці, стукаючи пальцем по її дну, щоб еритроцити розподілилися в рідині рівномірно. Кров розведена у 200 разів.

Потім заповнити камеру суспензією еритроцитів. Для цього піпеткою або скляною паличкою нанести краплю розведеної крові на середню пластинку біля краю покривного скла. Після заповнення камери вичекати 1-2 хв (доки осядуть формені елементи) і почати підрахунок при малому збільшенні мікроскопу в затемненому полі зору (з прикритою діафрагмою і трохи опущеним конденсором). Рахувати еритроцити у 5 великих або 80 малих квадратах

з соляною кислотою. При цьому червонуватий колір рідини стає бурим. Розчин розводять дистильованою водою до кольору стандарту з відомою концентрацією гемоглобіну.

Клінічне значення. Зниження концентрації гемоглобіну в крові є основним симптомом при гострій крововтраті або анемії: гіпопластичній, гемолітичній, В₁₂-дефіцитній. Підвищення концентрації гемоглобіну в крові може спостерігатися при мієлопроліферативних захворюваннях і при симптоматичних еритроцитозах.

Будова гемометра ГС-3 (гемометра Салі). Гемометр ГС-3 складається з пластмасового корпусу з трьома гніздами, задню стінку зроблено з матового скла. У два крайні гнізда вставлено запаяні пробірки, які містять кольоровий розчин солянокислого гематину. Середня відкрита градуйована пробірка призначена для досліджуваної крові. На ній нанесено дві шкали: одна показує концентрацію гемоглобіну в г% (градування від 2 до 23 г%), друга – відносних одиниць (градування до 140). 16,7 г% гемоглобіну прийнято за 100 одиниць. На всі три пробірки гемометра нанесено контрольні кругові позначки, які при аналізі мають бути на одному рівні. До приладу додано капіляр-піпетку на 20 мкл (0,02 мл) крові, скляні палички та очну піпетку (рис. 3).



а – запаяні пробірки зі стандартом, б – градуйована пробірка.

Рисунок 3. Гемометр Салі.

Хід проведення. У градуйовану пробірку гемометра Салі очною піпеткою налити 0,1 н розчин соляної кислоти до позначки «10». Потім взяти кров із судини в капіляр до позначки (20 мкл), обітерти кінчик капіляра ватою, занурюють його у пробірку і видути кров на дно пробірки так, щоб верхній шар соляної кислоти залишився непофарбованим. Не виймаючи піпетку, промити її

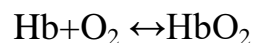
розчином соляної кислоти з верхнього шару, а потім дистильованою водою, видути її у пробірку. Після цього вміст пробірки перемішати, постукуючи пальцем по дну, поставити пробірку в середнє гніздо гемометра на 5-10 хв. Це час, необхідний для повного перетворення гемоглобіну на солянокислий гематин. Потім у пробірку по краплі додати очною піпеткою дистильовану воду доки колір розчину не стане однаковим із стандартом. Додаючи воду, розчин перемішати скляною паличкою. Провести відлік по градуйованій шкалі пробірки.

Цифра на рівні нижнього меніска одержаного розчину по шкалі грапроценти (г%) вказує на абсолютний вміст гемоглобіну (кількість гемоглобіну в 100 г крові). Друга шкала вказує на відносний вміст гемоглобіну – кількість гемоглобіну даної крові, виражена у відсотках до верхньої межі норми (16,7 г%).

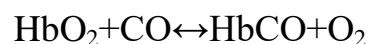
Оформити протокол, записати одержані результати. Зробити висновки щодо вмісту гемоглобіну в крові, виходячи з показників норми (абсолютний вміст гемоглобіну в крові чоловіків – 14,0-16,0 г% і жінок – 12,0-14,0 г%; відносний вміст гемоглобіну в крові чоловіків – 80-90 % і жінок – 70-80 %).

Завдання 3. Якісне визначення сполук гемоглобіну.

Принцип методу. Гемоглобін взаємодіє з киснем, утворюючи оксигемоглобін:

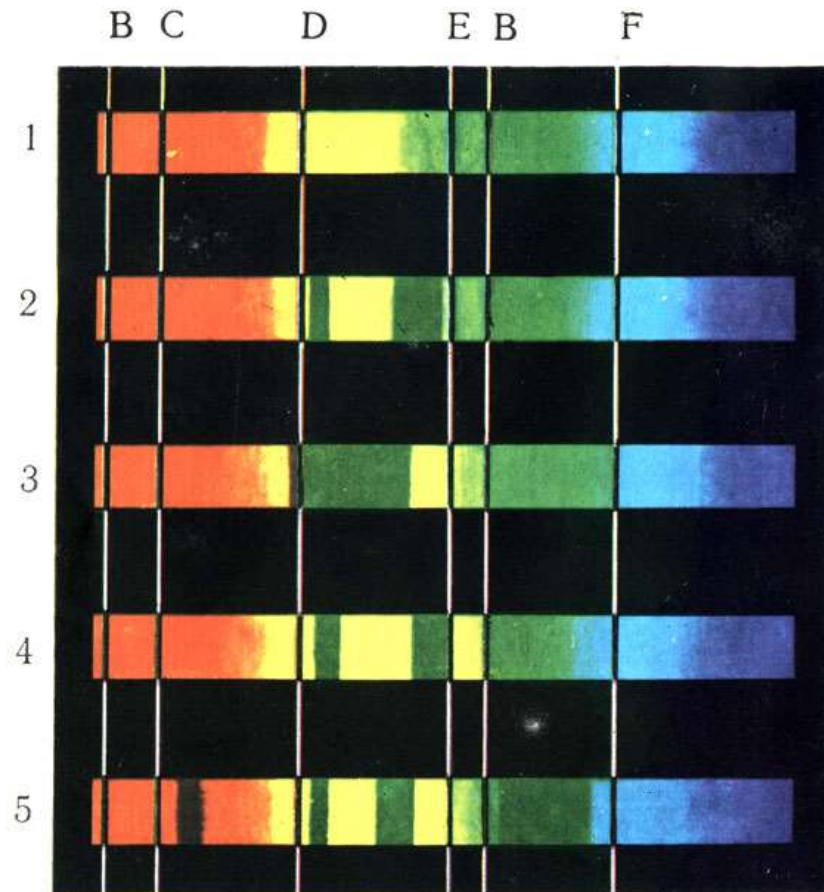


Оксид вуглецю має більшу спорідненість до гемоглобіну, ніж кисень:



Цим пояснюється висока токсичність окису вуглецю. Проте, оскільки ця реакція зворотна, є можливість витіснити СО, помістивши хворого в атмосферу, збагачену киснем. У здорових людей гемоглобін в крові знаходиться, головним чином, у вигляді оксигемоглобіну, карбогемоглобіну і в невеликій кількості – метгемоглобіну, карбоксигемоглобіну. Гемоглобін і його похідні являють собою забарвлені сполуки і мають характерні спектри поглинання у видимій області (рис. 4).

При спектральному аналізі HbO_2 має 2 смуги поглинання в зеленій (578) і жовтої області (540). Смуги поглинання HbCO розташовані подібним чином, але дещо зрушені в короткохвильову область. Hb дає одну широку смугу поглинання (смугу Стокса – 554). Метгемоглобін (Мет Hb) дає смугу поглинання в червоній області (637).



1 – сонячний спектр; 2 – оксигемоглобін; 3 – гемоглобін;
4 – карбоксигемоглобін; 5 – метгемоглобін.

Рисунок 4. Спектри поглинання гемоглобіну та його похідних.

Спектри поглинання гемоглобіну та його похідних зарисувати в зошит.

Завдання 4. Розрахунок колірного показника крові.

Принцип методу. Співвідношення між кількістю гемоглобіну крові та числом еритроцитів називають колірним показником. Колірний показник (КП) дозволяє оцінити ступінь насичення еритроцитів гемоглобіном.

Клінічне значення. Обчислення колірного показника має діагностичне значення при захворюваннях крові. За величиною колірного показника прийнято ділити анемії на гіпохромні, нормохромні і гіперхромні. Гіпохромні анемії (з колірним показником менше 0,85) широко поширені і спостерігаються насамперед при дефіциті заліза, викликаному різними причинами. Особливо вираженою гіпохромією (0,6-0,5 і нижче) характеризуються залізодефіцитні анемії, обумовлені хронічними крововтратами. Менш виражена гіпохромія еритроцитів (0,7-0,8) спостерігається при залізодефіцитній анемії вагітних, при інфекціях, пухлинах. підвищення колірного показника – гіперхромія – є характерною ознакою B_{12} -дефіцитних і фолієводефіцитних анемії. Особливо

виражена гіперхромія еритроцитів (1,2-1,3) при рецидивах анемії Аддісона-Бірмера. Нормохромні анемії спостерігаються при деяких гемолітичних формах неокрів'я, гострих крововтратах, лейкозах, які супроводжують цироз печінки.

Хід проведення. Колірний показник розрахувати його за формулою 2:

$$\text{КП} = \frac{\text{встановлена кількість гемоглобіну} \times \text{встановлена кількість еритроцитів}}{\text{нормальна кількість гемоглобіну} \times \text{нормальна кількість еритроцитів}} .$$

Наприклад, якщо в крові знайдено 80 % гемоглобіну та 4 млн/мкл еритроцитів, то колірний показник крові буде дорівнювати:

$$\frac{80}{100} \div \frac{4000000}{5000000} = \frac{80 \times 5000000}{100 \times 4000000} = \frac{8 \times 5}{10 \times 4} = 1$$

На практиці колірний показник можна вираховувати діленням встановленої кількості гемоглобіну на три перші цифри встановленого числа еритроцитів та множенням отриманого на 5.

У патології колірний показник може бути вище одиниці (гіперхромазія) або нижче одиниці (гіпохромазія). У нормі він складає 0,8-1,0.

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

Завдання 5. Визначення середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті.

Принцип методу. Показник відображає абсолютний вміст гемоглобіну в одному еритроциті в пікограмах (пг).

Клінічне значення. Зниження відображає гіпохромію та спостерігається при залізодефіцитних анеміях, підвищення має місце при макроцитарних і, особливо, мегалоцитарних анеміях.

Хід проведення. Визначити шляхом ділення концентрації гемоглобіну в 1 мкл крові на число еритроцитів в тому ж об'ємі.

Приклад: концентрація гемоглобіну в крові дорівнює 12 г / 100 мл, кількість еритроцитів в 1 мкл крові – 4 000 000.

$$12 \text{ г \%} = 12000 \text{ мг} / 100 \text{ мл} = 12 \text{ мг в } 1 \text{ мкл} = 120000000 \text{ пг} \left(1 \text{ пг} = \frac{1}{1000000000} \text{ мг} \right).$$

$$\text{Середній вміст гемоглобіну} = \frac{120000000 \text{ пг}}{4000000} = 30 \text{ пг, тобто практично треба}$$

вміст гемоглобіну в г / 100 мл помножити на 10 і розділити на число мільйонів еритроцитів в крові. Розрахунок показника можна зробити по номограмі (за Мазоном). У сучасних гематологічних автоматах цей показник (МСН) визначають розрахунковим шляхом. Нормальні величини складають 24-33 пг.

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

Завдання 6. Визначення середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті.

Принцип методу. Показник відображає ступінь насичення еритроцита гемоглобіном в процентах. У нормі на 100 мл крові припадає 42 мл еритроцитів, а вміст гемоглобіну на 100 мл становить 14,5 г гемоглобіну.

Клінічне значення. Зниження показника відображає абсолютну гіпохромію і є характерним для залізодефіцитних анемії. Чутливість цього індексу еритроцитів при залізодефіцитних анеміях становить 85%. Зниження показника виявлено так само при макроцитарних і особливо мегалоцитарних анеміях, коли обсяг еритроцитів, збільшений непропорційно більше значно порівняно зі збільшенням насичення еритроцитів гемоглобіном.

1. MCH – Mean Corpuscular Hemoglobin.
2. MCHC – Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration.
3. MCV – Mean Corpuscular Volume.

Хід проведення. Середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті розрахувати за формулою 3:

Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті = $(\text{Hb, г на 100 мл} / \text{загальний об'єм еритроцитів, мл на 100 мл}) \times 100$ (3).

Враховуючи, що 42 мл еритроцитів містять 14,5 г гемоглобіну, скласти просту пропорцію та отримати результат: 100 мл еритроцитів містять 34,5 г гемоглобіну.

Можна обчислити шляхом ділення концентрації гемоглобіну в г / 100 мл на гематокритну величину і множення на 100.

Приклад: концентрація гемоглобіну 12 г / 100 мл, гематокрит 40 об. %.

Середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті розрахувати за формулою 4:

$$(\text{MCHC})^2 = \frac{12}{40} * 100 = 30\% \quad (4).$$

Можна легко розрахувати, використовуючи номограму за Мазоном (рис.4). Показник включений в програму сучасних гематологічних автоматів.

Нормальні величини MCHC коливається в межах 30-38%. Величина найбільш константна, насичення вище 38% не буває.

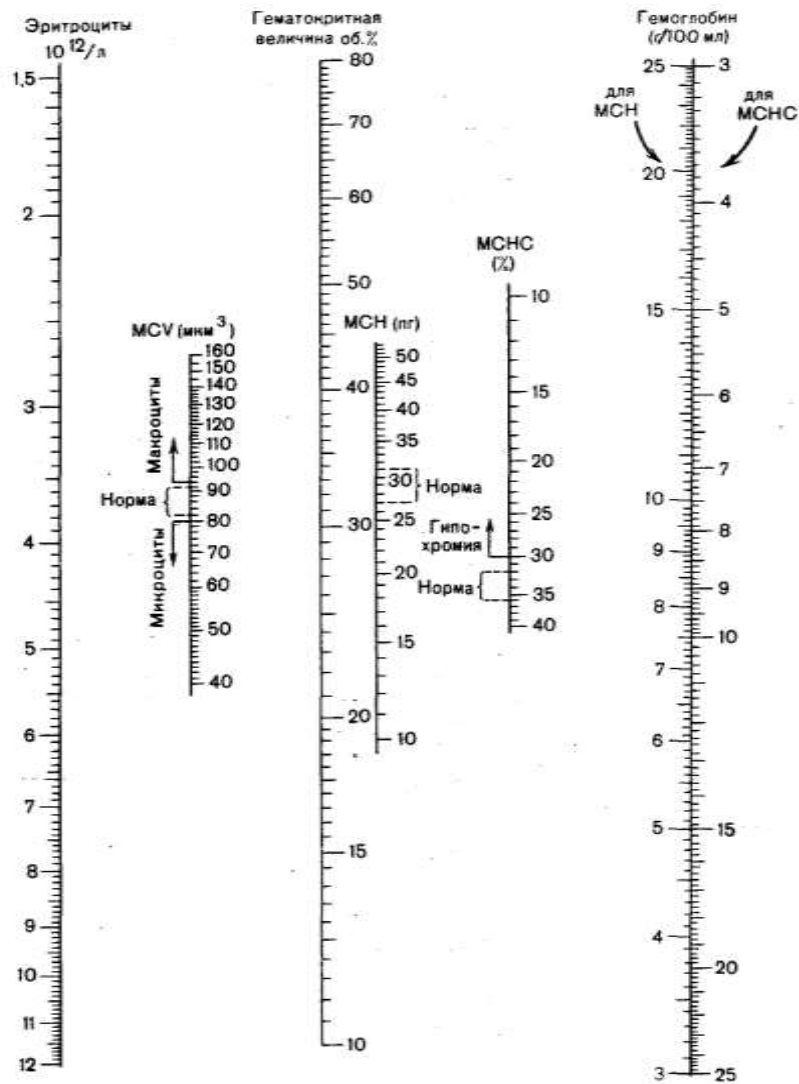


Рисунок 5. Номограма для обчислення індексів еритроцитів за Мазоном.

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

Завдання 7. Визначення середнього об'єму еритроцитів.

Принцип методу. Показник є важливим при діагностиці різних форм анемії.

Клінічне значення. Підвищення показника спостерігається при макроцитарних і мегалоцитарних анеміях, особливо високе значення відмічається при В₁₂-дефіцитних анеміях. Зниження показника відзначається при мікроцитарних анеміях.

Хід проведення. Обчислити шляхом ділення гематокритної величини на загальну кількість еритроцитів у крові. Середній обсяг еритроцитів (MCV)³ виражають у кубічних мікронах або кубічних мікрометрах.

Приклад: гематокрит – 40 об.% (або 0,40 мм³, або 400 000 000 мкм³); еритроцити – 4 500 000 в 1 мкл. Розрахувати за формулою 5:

$$MCV = \frac{400000000 \text{ мкм}^3}{4500000} = \frac{4000}{450} = 88 \text{ мкм}^3 \quad (5).$$

Практично для обчислення показника треба величину гематокриту поділити на число еритроцитів в мільйонах і помножити на 10.

Можна розрахунок вести по номограмі.

У програмі сучасних гематологічних комплексів і автоматів цей параметр визначають або кондуктометрично (вітчизняний гематологічний комплекс КГ-2), або розрахунковим шляхом. Нормальні величини складають 75-95 мкм³.

Оформити протокол, записати результати, зробити висновки.

Завдання 8. Підрахунок кількості ретикулоцитів у мазку крові.

Принцип методу. Виявлення зернисто-сітчастої субстанції еритроцитів при забарвленні лужним барвником з подальшим підрахунком їх у мазку крові.

Клінічне значення. Ретикулоцити – молоді еритроцити. В умовах стимуляції еритропоезу при анемії кількість ретикулоцитів у периферичній крові збільшується. Зменшення кількості ретикулоцитів або відсутність їх свідчить про пригнічення або припинення еритропоезу.

Хід проведення. Приготування мазка крові. Для виявлення ретикулоцитів використати прижиттєве забарвлення їх у нефіксованому вологому мазку крові. При забарвленні на предметному склі нанести на нього попередньо тонкий шар барвника – діаманткрезилового синього (1,2 % розчин в абсолютному спирті). Потім зробити на цьому склі звичайний мазок крові та швидко помістити його у вологу камеру (чашка Петрі з вологим фільтрувальним папером) на 10 хв. За цей час сухий барвник, попередньо нанесений на предметне скло, забарвлює еритроцити, особливо їх базофільні елементи, які є в молодих еритроцитах. Базофільні елементи клітини випадають у вигляді сіточки (ретикулуму) або зерен. Після забарвлення протягом 10 хв у вологій камері мазок вийняти і висушити його на повітрі, а потім дослідити під мікроскопом при імерсійному збільшенні з піднятим конденсором. При забарвленні таким методом еритроцити стають зеленими або жовто-зеленими, а зернисто-ретикулярна субстанція – темно-синьою.

Підрахунок кількості ретикулоцитів. Переглядаючи мазок, порахувати в обмеженому полі зору еритроцити (до 1000) і визначити кількість ретикулоцитів у цьому ж полі зору у відсотках (%). Обмеження поля зору досягти вкладанням усередину окуляра вирізаної з паперу діафрагми.

Нормальний вміст їх у крові дорослих людей – 0,5-4%; у новонароджених – 2,8-6%; у дітей 6 міс. – 1,4%; 1 року – 0,9%.

У протоколі роботи зарисувати ретикулоцити, навести результати підрахунку їх кількості і зробити висновок про інтенсивність еритропоезу в обстеженої людини.

Завдання 9. Отримання кристалів геміну та вивчення їх під мікроскопом.

Принцип методу. Гемоглобін крові в присутності концентрованої оцтової кислоти та хлориду натрію переходить у сполуку, що називається гемін. У геміні залізо тривалентне та пов'язане з хлором. Практично для отримання кристалів геміну додається тільки концентрована оцтова кислота, або іони Na^+ та Cl^- завжди є в плазмі крові.

Клінічне значення. Гемін має характерну форму кристалів (рис. 6), що дозволяє використовувати цю реакцію в практиці судової медицини для виявлення плям крові.

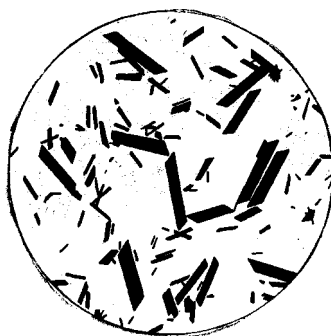


Рисунок 6. Кристали геміну під мікроскопом.

Хід проведення. Помістити краплю крові на край предметного скла та розподілити її по всій поверхні тонким шаром. Для цього друге предметне скло приставити коротким краєм до краплі крові так, щоб між двома скельцями утворився гострий кут. Зробити мазок крові, переміщуючи друге скло по поверхні першого.

Підсушити мазок на повітрі (без нагріву). Зішкребти підсушену кров, залишивши її на тому ж склі. Додати 1-2 краплі концентрованої оцтової кислоти, ретельно перемішати, накрити покривним склом та дуже повільно, обережно нагрівати отриману суміш, проносячи скло над полум'ям спиртівки.

Знайти кристали геміну, що утворилися, при малому збільшенні, а потім розглянути їх при великому збільшенні. Зарисувати форму кристалів у зошит.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Опишіть будову камери Горяєва.
2. Як практично можна визначити рівень гемоглобіну в крові?
3. Про що свідчить зниження колірного показника в крові?
4. На що вказує зменшення кількості ретикулоцитів у мазку крові?

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. Патолофізіологія крові / пер. с англ. Н. Б. Серебряной, В. И. Соловьева. Москва : Санкт-Петербург : Бином, 2016. 448 с.