

## ТЕМА 6. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЙКОЦИТІВ

**Мета:** Знати загальну характеристику лейкоцитів. З'ясувати структурно-функціональні особливості гранулоцитів і агранулоцитів. Визначити загальну кількість лейкоцитів та еозинофілів у периферичній крові. Приготувати та пофарбувати мазки крові по Романовському-Гімза. Визначити лейкоцитарну формулу, лейкоцитарний профіль та індекс регенерації (ядерного зсуву).

### ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Загальна характеристика лейкоцитів.
2. Структурно-функціональні особливості гранулоцитів.
3. Структурно-функціональні особливості агранулоцитів.

**Матеріали та обладнання:** мікроскоп, лічильні камери Горяєва, меланжер для лейкоцитів, механічний лічильник для визначення лейкоцитарної формули, штатив, піпетки, піпетка від гемометра Салі, знежирені предметні скельця, шліфоване скло, скарифікатори, кювета з містками, пінцети анатомічні, штатив для висушування мазків на повітрі, банка або невисока скляночка для фіксації мазків, гумова груша, вата, 96% етиловий спирт, метиловий спирт, 4%-й розчин оцтової кислоти, підфарбований метиленовим синім, барвник Романовського-Гімзи, 1 % розчин еозину, ацетон, дистильована вода.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

**Завдання 1.** Визначення кількості лейкоцитів у 1 мкл крові.

**Принцип методу.** Один з методів підрахунку лейкоцитів – це уніфікований метод підрахунку в лічильній камері. Підрахунок кількості лейкоцитів проводять під мікроскопом в певній кількості квадратів в лічильній камері і перераховують на 1 мкл крові, виходячи з обсягів квадратів і розведення крові.

**Клінічне значення.** Збільшення кількості лейкоцитів у крові – лейкоцитоз, зменшення – лейкопенія. Про наявність лейкоцитозу свідчить вміст лейкоцитів вище  $9 \times 10^9$ /л крові, про лейкопенії – менше  $4 \times 10^9$ /л. Лейкоцитоз і лейкопенія можуть мати абсолютний або відносний характер. Лейкоцитоз спостерігається при запальних процесах, бактеріальних інфекціях, інтоксикаціях, шоці, гострих крововтратах, коматозному стані, гемолітичному кризі, алергічних реакціях. Лейкопенія спостерігається при гіпотонічному стану, зниженні загального тонуусу, голодуванні. Лейкопенія може бути наслідком пригнічуючої дії деяких токсинів на дозрівання і виселення

лейкоцитів з кровотворних органів, що спостерігається при деяких інфекційних захворюваннях – грипі, кору, черевному тифі, краснусі, інфекційному гепатиті. Лейкопенія може виникати в результаті дії лікарських засобів – антибіотиків, сульфаніламідів, цитостатичних препаратів.

**Хід проведення.** У пробірку внести 0,4 мл 4% розчину оцтової кислоти, підфарбованого метиленовим синім. Додати (піпеткою від гемометра Салі) 20 мкл крові і добре перемішати, при цьому одержати розведення крові у 20 разів. Заповнити камеру Горяєва, як це робили при підрахунку еритроцитів. Оскільки лейкоцитів менше, ніж еритроцитів, то для точності підрахунок проводити в 100 великих квадратах (які не розграфлені на малі), що відповідає 1600 малим квадратам. Для більшої точності підрахунок лейкоцитів проводити по всій сітці в великих квадратах, починаючи від верхнього кута сітки, за правилом Єгорова: до цього квадрату відносяться тільки ті клітини, які знаходяться всередині квадрата або на його верхній і лівій межі.

Розрахунок зробити за формулою:

$$L = \frac{A \times 4000 \times B}{B}, \quad (1)$$

де  $L$  – кількість лейкоцитів в 1 мкл крові;  $A$  – полічена кількість лейкоцитів;  $B$  – кількість малих квадратів, у яких підраховували лейкоцити;  $B$  – ступінь розведення крові; 4000 – множник для перерахунку кількості лейкоцитів на 1 мкл.

Приклад розрахунку: у 100 великих квадратах (1600 малих) підраховано 148 лейкоцитів, кров розведена у 20 разів.

Кількість лейкоцитів дорівнює:  $\frac{148 \times 4000 \times 20}{1600} = 7400$  в 1 мкл.

Оформити протокол досліду. Записати отримані значення кількості лейкоцитів у 1 мкл крові. Зробити висновки.

**Завдання 2.** Визначення кількості еозинофілів у 1 мкл крові.

**Хід проведення.** У меланжер для підрахунку лейкоцитів (рис. 1) набрати периферичну кров до позначки 1 та розбавити до позначки 11 розчином наступного складу: 2,5 мл 1 % розчину еозину; 2,5 мл ацетону, 50 мл дистильованої води. Розчин перед застосуванням профільтрувати.

Вміст меланжера обережно перемішати протягом 3 хв (при сильному струшуванні еозинофіли руйнуються). Перші дві краплі з меланжера зняти ватним тампоном, а третю нанести на сітку камери Горяєва і під мікроскопом з об'єктивом 15 підрахувати кількість еозинофілів (на двох сітках).

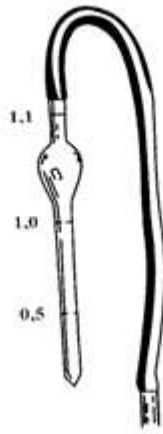


Рисунок 1. Змішувач (меланжер) для підрахунку лейкоцитів.

Гранули еозинофільних гранулоцитів забарвлюються в чорний колір, цитоплазма – в рожевий. Знайдену цифру перемножте на 100 і поділіть на 18. У результаті отримаєте абсолютні цифри еозинофілів в 1 мкл. Для перерахування в одиниці СІ треба одержану кількість гранулоцитів перемножити на  $10^6$  (Г/л).

Оформити протокол досліду. Записати отримані значення кількості еозинофілів у 1 мкл крові. Зробити висновки.

### **Завдання 3.** Приготування, фіксація та фарбування мазків крові.

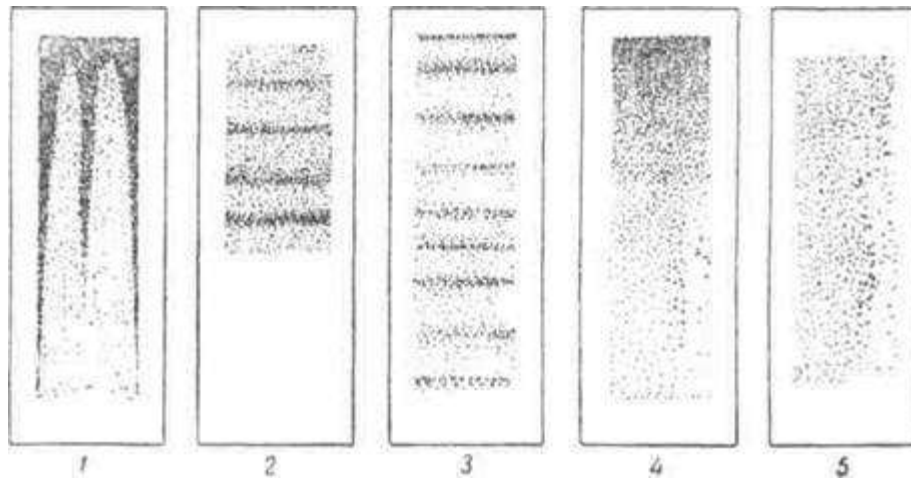
Вимоги до мазків крові:

1. Повинен розпочинатися на 1 см від початку предметного скла і закінчуватися на відстані 2-3 см від його протилежного краю, загальна довжина мазка повинна охоплювати  $\frac{1}{2} - \frac{3}{4}$  довжини скла.

2. Бути рівномірної товщини, а не хвилеподібної, гарний мазок більш щільний спочатку, потім поступово щільність зменшується та закінчується у вигляді сліду.

3. Шар крові не повинен досягати краю скла на декілька мм.

Мазки, які перевищують  $\frac{3}{4}$  довжини предметного скла, бувають дуже товстими; в них еритроцити лежать густим шаром, притиснені один до одного, утворюють монетні стовпчики, що заважає вивченню їх морфології. Мазки менш  $\frac{1}{2}$  предметного скла занадто тонкі: лейкоцити зустрічаються дуже рідко та деформовані. Коли відсутній вільний від мазка край предметного скла, то більша кількість клітин переміщуються до краю мазка, розподіляючись у ньому нерівномірно. У хвилеподібному мазку розподіл клітин також нерівномірний: товсті ділянки мають більш лімфоцитів, тонкі – моноцитів і сегментоядерних клітин (рис. 2).



1 – мазок на погано знежиреному склі; 2 – дуже короткий мазок; 3 – занадто довгий нерівномірний мазок; 4 – занадто товстий мазок; 5 – правильний мазок, тонкий, рівномірний і досить довгий.

Рисунок 2. Правильно і неправильно приготовані мазки крові.

**Хід проведення.** Техніка приготування мазка крові:

1. Гарно знежирити та промити предметне скло: занурити його у розчин хромпіку (суміш  $K_2Cr_2O_7$  + міцна  $H_2SO_4$ ) на 24 години, потім промити під проточною водою, протерти насухо та помістити в банку з сумішшю спирт-ефір. Перед використанням висушити.

2. До краплини крові доторкнутися предметним склом так, щоб воно не торкалось пальця. Крапля крові переходить на скло, вона повинна бути діаметром 2-5 мм. Шліфоване скло тримати під кутом  $45^\circ$  на відстані 1-2 мм перед краплиною, утримуючи його великим та вказівним пальцями правої руки. Шліфоване скло зсунути назад так, щоб воно доторкнулось краплі крові і та розпливлася у куті між шліфованим і предметним склом. Швидким рухом руки зробити рух уперед. Шліфоване скло повинно бути вужче, ніж предметне; коли їх ширина однакова, то у шліфованого скла відламати кути, зменшуючи на 1-2 мм (рис. 3).

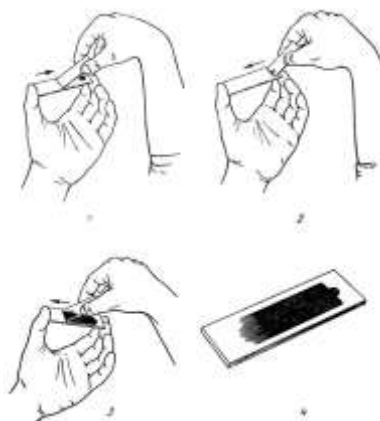


Рисунок 3. Етапи приготування мазка крові.

Мазки підсушити, зафіксувати за допомогою метилового спирту (3-5 хв) чи етилового спирту (абсолютного – 10-15 хв, 96% – 30 хв). Більш високі результати одержують при фіксуванні метиловим спиртом. Фіксуючу рідину наливають на скло, або скло занурюють у банку з фіксатором.

Після фіксації та підсушування виконати фарбування за методом Романовського-Гімзи. У лабораторіях завжди є готовий розчин цього барвника. Барвник Романовського-Гімзи складається з лужної (азур II) та кислій (еозин) часток. Азур її забарвлює структури клітин у яскраво-синій колір, а еозин у рожево-червоний. Лужні частини клітин зв'язуються та фарбуються кислими барвниками, а кислі – лужними.

Робочий розчин барвника отримати розведенням готового розчину дистильованої води. Вода повинна мати нейтральний рівень рН. Реакцію води визначити гематоксиліною пробою. У 4-5 мл води кинути крупинку гематоксиліну. Якщо вода має лужну реакцію, то фарбується не пізніше 3-й хв, якщо фарбування починається через 5 хв, або зовсім не відбувається, це вказує на кислу реакцію води. Якщо вода забарвлюється у рожево-фіолетовий колір через 1-4 хв, тоді вона нейтральна і придатна до споживання.

Робочий розчин барвника приготувати перед фарбуванням. Препарат розташувати мазком униз на 2 скляні палички, покладені на дно чашки Петрі. Барвник підливати під препарат, фарбувати 20-40 хв. Потім мазок промити під струмом води, висушити та мікроскопіювати під масляною імерсією. При фарбуванні за цим методом еритроцити забарвлюються у блідо-рожевий колір, ядра клітин – у синьо-фіолетовий, гранули еозинофілів – у яскраво-червоний, базофілів – у синій, цитоплазма лімфоцитів та моноцитів – у блакитний колір.

#### **Завдання 4.** Визначення лейкоцитарної формули.

**Хід проведення.** Приготувати до роботи світловий мікроскоп. Розглянути мазок при малому збільшенні, потім нанести краплю імерсійного масла, встановити велике збільшення (окуляр –  $\times 7$  або  $\times 10$ , об'єтив –  $\times 90$ ) і підрахувати 100 або 200 лейкоцитів, диференціюючи кількість їх за видами за допомогою 11-клавійного лічильника (рис. 4).

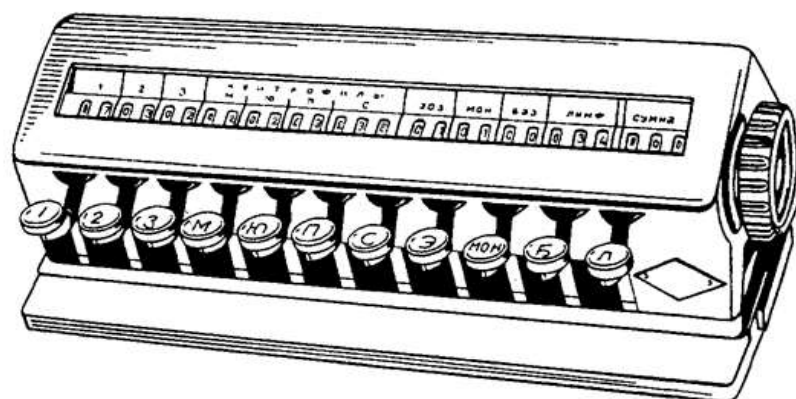


Рисунок 4. Механічний лічильник для визначення лейкоцитарної формули.

Підрахувати лейкоцити на мазку способом меандрів у чотирьох умовних зонах, розділених поперечної і поздовжньої осьовими лініями, візуально проведеними через центр мазка (рис. 5). У кожній зоні треба порахувати 25% клітин від необхідної кількості (100 або 200).

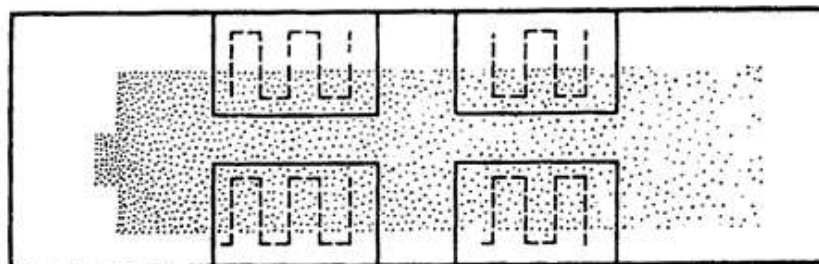


Рис. 5. Підрахунок лейкоцитів способом меандрів у чотирьох умовних зонах крові.

Підрахунок на мазку провести наступним чином: підрахувати лейкоцити у 3-4 полях зору вздовж краю мазка, потім у 3-4 полях зору в напрямку до середини мазка; потім підрахувати в 3-4 полях зору паралельно краю мазка і знов повернутися до краю. Такий рух продовжувати доти, доки не будуть підраховані 50 клітин. Тоді на протилежному краю мазка так само підрахувати ще 50 клітин (до суми 100 або 200 клітин). Підрахунок краще робити в найтоншому місці мазка, ближче до кінця, де добре видно структуру клітин.

Нормальні показники лейкоцитарної формули: нейтрофіли – 46-76%; еозинофіли – 1-5%; базофіли – 0-1%; моноцити – 2-10%; лімфоцити – 18-40%.

Оформити протокол досліду. Записати отримані показники лейкоцитарної формули та порівняти їх з табличними даними. Зробити висновки.

**Завдання 5.** Визначення лейкоцитарного профілю та індексу регенерації (ядерного зсуву).

**Хід проведення.** Підрахувавши кількість лейкоцитів в 1 мкл крові та знаючи процентне співвідношення елементів білої крові (лейкоцитарна формула), обчислити їх абсолютну кількість у заданому об'ємі (лейкоцитарний профіль).

Формула 2 призначена для переведу відносних показників (тобто %) лейкоцитарної формули в абсолютні:

$$\text{Абсолютне значення} = \frac{\%}{100} \times L, \quad (2)$$

де L – кількість лейкоцитів в одиниці об'єму крові (у мкл або л).

Визначення індексу регенерації (ядерного зсуву). Цей показник являє собою відношення суми молодих форм нейтрофілів до зрілих.

Обчислити індекс регенерації за формулою 3:

$$\text{Індекс регенерації} = \frac{\% \text{ М} + \% \text{ Ю} + \% \text{ П}}{\% \text{ С}} \quad (3)$$

У нормі він дорівнює 0,065. За індексом регенерації можна судити про віковий склад нейтрофілів. Збільшення цього показника свідчить про активацію мієлопоезу, зниження – про його пригнічення.

Оформити протокол досліду. Записати отримані показники індексу регенерації та порівняти їх з табличними даними. Зробити висновки.

### ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Чому для підрахунку лейкоцитів кров розводять 4 % розчином оцтової кислоти. Для чого цей розчин підфарбовують метиленовим синім?
2. Як практично можна визначити загальну кількість лейкоцитів у крові?
3. Які вимоги висуваються до приготування мазків?
4. Яке клінічне значення лейкоцитарного профілю та індексу регенерації (ядерного зсуву)?

### 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.