

ТЕМА 8. СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІ ЛЕЙКОЦИТІВ. ЗМІНИ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО СКЛАДУ ЛЕЙКОЦИТІВ

Мета: Знати загальну характеристику лейкоцитів. З'ясувати структурно-функціональні особливості гранулоцитів і агранулоцитів. Вивчити зміни якісного та кількісного складу лейкоцитів. Визначити загальну кількість лейкоцитів у периферичній крові.

ПИТАННЯ ДЛЯ ОБГОВОРЕННЯ

1. Загальна характеристика лейкоцитів.
2. Структурно-функціональні особливості гранулоцитів.
3. Структурно-функціональні особливості агранулоцитів.
4. Зміни якісного та кількісного складу лейкоцитів.
 - 4.1. Патологічні форми лейкоцитів.
 - 4.2. Лейкоцитози.
 - 4.3. Лейкопенії.

Матеріали та обладнання: мікроскоп, лічильна камера Горяєва, штатив, піпетки, скарифікатор, вата, гумова груша, 4%-й розчин оцтової кислоти, підфарбований метиленовим синім, дистильована вода, 96% етиловий спирт.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА

Завдання 1. Визначення кількості лейкоцитів у 1 мкл крові.

У пробірку внести 0,4 мл 4%-го розчину оцтової кислоти, підфарбованого метиленовим синім. Додати (піпеткою від гемометра Салі) 20 мкл крові і добре перемішати. Одержують 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.

Розрахунок зробити за формулою:

$$L = \frac{A \times 4000 \times B}{B}$$

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 еритроцитів 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 дослід. Записати отримані значення кількості лейкоцитів у 1 мкл крові. Зробити висновки.

Завдання 2. Приготування, фіксація та фарбування мазків крові.

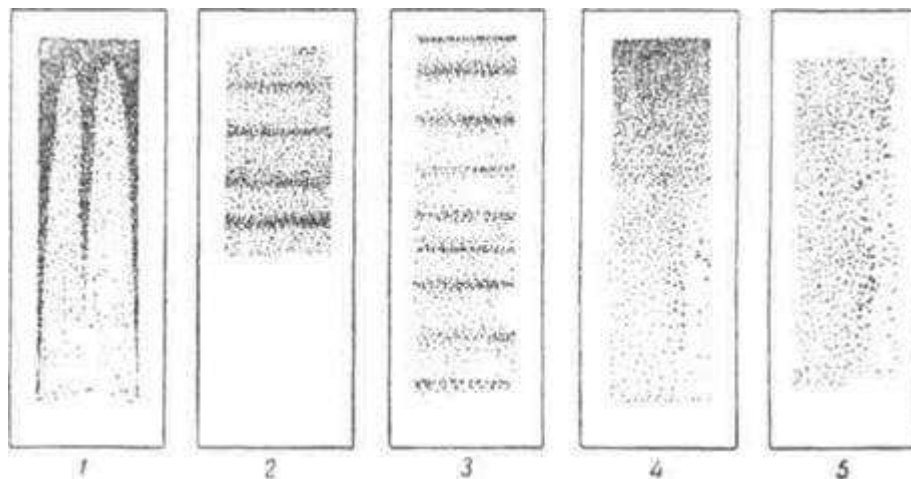
Вимоги до мазків крові:

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. 1).



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 1. Правильно і неправильно виготовлені мазки крові.

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° 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. 2).

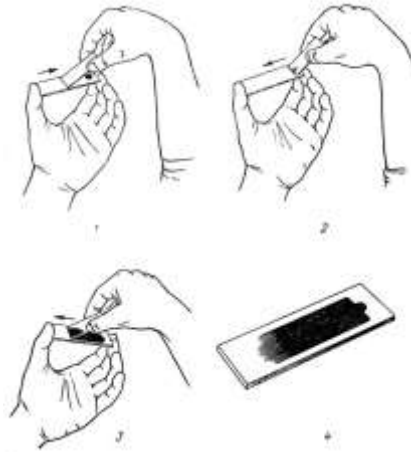


Рисунок 2. Етапи приготування мазка крові.

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 кислоти (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 3. 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'єктив – $\times 90$) і підрахувати 100 або 200 лейкоцитів, диференціюючи кількість їх за видами за допомогою 11-клавійного лічильника (рис. 3).

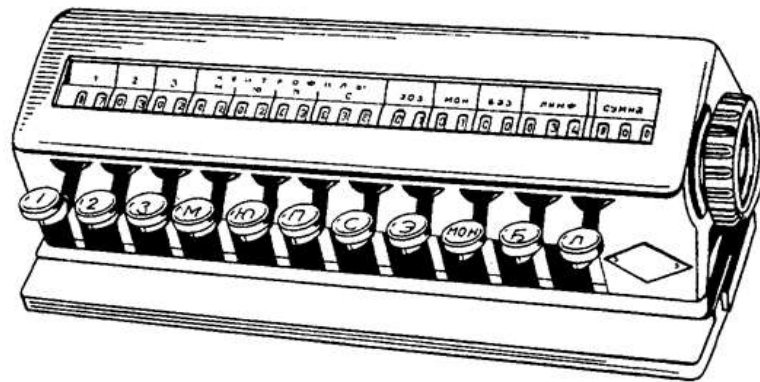


Рисунок 3. Механічний лічильник для визначення лейкоцитарної формули.

Підрахувати лейкоцити на мазку способом меандрів у чотирьох умовних зонах, розділених поперечної і поздовжньої осьовими лініями, візуально проведеними через центр мазка (рис. 4). У кожній зоні треба порахувати 25% клітин від необхідної кількості (100 або 200).

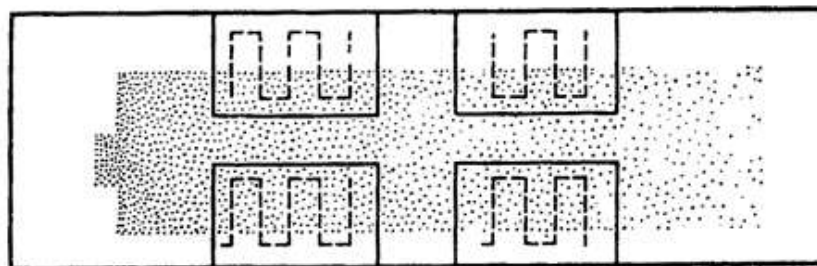


Рисунок 4. Підрахунок лейкоцитів способом меандрів у чотирьох умовних зонах крові.

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 4. Проаналізувати лейкограми.

Лейкоцити	Базо-філи	Еози-філи	Нейтрофіли			Лімфо-цити	Моно-цити
			метаміє-лоцити	палич-коядерні	Сегмен-тоядерні		
$14,0 \times 10^9/\text{л}$	-	1%	2%	15%	58%	20%	4%
$12,3 \times 10^9/\text{л}$	-	1%	-	2%	46%	48%	3%
$1,35 \times 10^9/\text{л}$	-	-	-	-	17%	68%	15%
$11,4 \times 10^9/\text{л}$	2%	16%	-	1%	55%	24%	2%

Зробити висновки на підставі аналізу кожної лейкограми:

1. Назвати виявлені зміни загальної кількості лейкоцитів.
2. Вказати зміни процентного вмісту окремих форм лейкоцитів.
3. Як називають ці зміни?

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 форми лейкоцитів належать до патологічних?
4. За якими ознаками розрізняють лейкоцитози?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Бульда В. І., Дземан М. І., Радіонова І. О. Гематологічні захворювання в клінічній практиці. Київ : Медкнига, 2023. 196 с.
2. Воробель А. В. Основи гематології : монографія. Івано-Франківськ : Вид-во «Плай» ЦІТ Прикарпатського університету імені Василя Стефаника, 2009. 148 с.

3. Гематологія : посіб. / за ред. А. Ф. Романової. Київ : Медицина, 2006. 456 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.
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. Міщенко І. В., Павленко Г. П., Коковська О. В. Фізіологія системи крові : навч.-метод. посіб. для студентів медичних вузів України. Полтава : УМСА, 2019. 210 с.
7. Третяк Н. М. Гематологія. Київ : Зовнішня торгівля, 2005. 240 с.