**Лабораторна робота №11.**

**Тема:** Кров. Кількісні вимірювання складу крові і захисні механізми крові.

**Мета:** Ознайомитись за допомогою лабораторних досліджень із кількісним складом крові, методами підрахунку еритроцитів, лейкоцитів, гемоглобіну. Вивчити особливості будови та функції лейкоцитів, розглянути механізми захисту організму від інфекцій.

**Обладнання:** електронний посібник, навчальні відео, мікроскоп, лічильна камера Горяєва, пробірки, піпетки, скляні палички, 3% розчин хлориду натрію, 4% розчин оцтової кислоти, підфарбований метиленовим синім чи генціанвіолетом, стерильний скарифікатор, настойка йоду, вата.

**Література**

1. Лекційний матеріал.

2. Шмалєй С.В., Гайдай М.І., Гасюк О.М., Кравченко Ю.В. Методичні розробки лабораторних занять з фізіології людини та тварин. У ІІ ч. Ч. ІІ. Херсон: Вид-во ХДПУ, 2002. 80 с. Режим доступу:

http://www.kspu.edu/FileDownload.ashx/Metod\_r\_lab\_zan\_z\_fiziol\_lud\_ta\_tvarin2. doc?id=250aef3e-b44b-4e7a-8990-2cded1f3289a

**Короткі теоретичні відомості**

Кров складається із рідкої частини - плазми і формених елементів: еритроцити (червоні кров'яні тільця), лейкоцити (білі кров'яні тільця) і тромбоцити (кров'яні пластинки). Між плазмою і форменими елементами крові існує певне об'ємне співвідношення. Це співвідношення визначається за допомогою гематокриту. Гематокритний показник (гематокрит), який відображає відсотковий об'єм формених елементів (еритроцитів) в крові. Розрізняють венозний, капілярний і артеріальний гематокрит. Найнижчий гематокрит у артеріальній крові. На долю формених елементів приходиться 40-45% крові, тоді як на долю плазми - 55-60%. Загальний об'єм крові у організмі дорослої людини у нормі складає 6-8% маси тіла, приблизно 4,5-6 л. Кров є одночасно колоїдним розчином та суспензією. Частки речовин, суспендовані в рідкому середовищі, випробовують на дію протилежних сил, зокрема сили тяги, і це забезпечує осідання часток, і дифузії, за рахунок якої частки колоїдів перемішуються. Якщо прийняти в'язкість крові за одиницю, тоді в'язкість плазми крові буде дорівнювати 1,7-2,2 ум.од., в'язкість цільної крові - приблизно 5 ум.од. В'язкість крові обумовлена наявністю білків і особливо еритроцитів, які під час руху долають сили зовнішнього і внутрішнього тертя. Відносна в'язкість (питома вага) цільної крові дорівнює 1,050-1,060, еритроцитів - 1,090, плазми - 1,025-1,034. Активна реакція крові (рН), яка обумовлена співвідношенням у ній водневих (Н+) і гідроксильних (ОН- ) іонів, є одним із параметрів гомеостазу. Тільки за певної рН можливий оптимальний перебіг обміну 120 речовин. Кров має слабколужну реакцію (рН артеріальної крові дорівнює 4,7). Плазма крові містить 90-92% води і 8-10% сухої речовини, головним 48 чином білків і солей. Загальна кількість білка у плазмі крові людини складає 7- 8%. У плазмі знаходяться також безазотисті органічні речовини, глюкоза (4,4- 6,7 ммоль/л), нейтральні жири тощо. Мінеральні речовини плазми крові складають приблизно 0,9%. Значення білків плазми крові багатогранне: 1) вони створюють онкотичний тиск, що визначає об'єм води між кров'ю та тканинами; 2) володіють буферними властивостями, підтримують рН крові; 3) забезпечують в'язкість плазми крові, яка відіграє важливе значення у підтримці артеріального тиску; 4) приймають участь в згортанні крові; 5) перешкоджають осіданню еритроцитів; 6) вони є необхідним фактором імунітету; 7) є переносниками певних гормонів, мінеральних речовин, ліпідів, холестерину; 8) є резервом для будови тканинних білків та ін. Абсолютна кількість білків плазми майже у 10 разів переважає кількість кристалоїдів, хоча створюваний ними онкотичний тиск складає лише 1/200 осмотичного тиску плазми (25-30 мм рт. ст.). Найбільше містяться в плазмі альбуміни. Розмір їх молекул менший, а ніж глобулінів і фібриногену, кількісний вміст помітно більший, тому онкотичний тиск плазми більше, ніж на 80% визначається альбумінами. Онкотичний тиск відіграє вирішальну роль під час обміну води між кров'ю і тканинами. Він впливає на процеси утворення тканинної рідини, лімфи, сечі, всмоктування рідини із кишківника. Крупні молекули білків плазми, як правило, не проходять скрізь ендотелій капілярів Рідкий стан крові і замкнутість (цілісність) кровоносного русла є важливою умовою життєдіяльності. Ці умови створює система згортання крові система гемокоагуляції. Вона зберігає циркулюючу кров у рідкому стані та відновлює цілісність шляхів її циркуляції утворенням кров'яних тромбів у пошкоджених судинах. Лейкоцити, або білі кров'яні тільця - це безбарвні клітини, які містять ядра різноманітної форми. В 1 мм крові міститься від 5000 до 8000 лейкоцитів. Основна функція лейкоцитів - захисна. При розгляді ц мікроскоп мазка крові людини можна помітити, що лейкоцити мають різноманітну форму. Розрізняють дві групи лейкоцитів: зернисті та незернисті. В перших є у цитоплазмі дрібні зерна (гранули), які забарвлюються різними барвниками в синій, червоний чи фіолетовий колір. В залежності від того якими фарбами забарвлюються зернисті лейкоцити, вони називаються базофілами, еозинофіли чи нейтрофілами. В незернистих лейкоцитів таких зерен немає. Серед них розрізняють лімфоцити - круглі клітини із дуже темними округлими ядрами та моноцити - клітини великої величини із ядрами неправильної форми. Співвідношення різних форм лейкоцитів виражене у відсотках, називається лейкоцитарною формулою. 49 Таблиця 8. Лейкоцитарна формула корові здорової людини Зернисті лейкоцити Незернисті лейкоцити Базофіли Еозинофіли Нейтрофіли Лімфоцити Моноцити Граничні коливання (у %) 0,5-1,0 1-5 55-73 20-35 3-8 Абсолютна кількість у 1 мм3 крові 22-95 45-470 2250-6800 810-3600 90-950 Нейтрофіли та моноцити виконують основну захисну функцію. Вони захищають організм від мікробів та їхніх отрут (токсинів). Ці клітини мають здатність до амебоїдного руху. Вони вільно проходять через стінки капілярів та активно "пересуваються до місця скупчення бактерій, захоплюють їх і переварюють (фагоцитоз). Лімфоцити відіграють ведучу роль в імунологічних процесах. Особливим фактором імунологічної системи є Т - лімфоцити, на дозрівання яких впливає виличкова залоза. Базофіли продукують гепарин, який потрібен проти зсідання крові. Еозинофіли - руйнують токсини білкової природи. Характерна властивість лейкоцитів - зміни їхньої кількості і процентного співвідношення при зміні функціонального стану організму. Збільшення кількості лейкоцитів називається лейкоцитозом, а зменшення - лейкопенія. Розрізняють патологічні і фізіологічні лейкоцитози. До патологічних лейкоцитозів відносяться всі лейкоцитози, що спостерігаються при захворюваннях організму. Наприклад, при наявності глистів збільшується число еозинофілів, при запаленнях зростає число нейтрофілів, при туберкульозі звичайно збільшується кількість лімфоцитів. На лейкоцитарну формулу можуть впливати деякі ліки (антибіотики сприяють збільшенню еозинофілів). До фізіологічного відносяться лейкоцитози: 1) травні - під час процесів переварювання їжі; 2) лейкоцитози при вагітності; 3) лейкоцитози при м'язовій діяльності. Лейкоцитоз, що виникає при м'язовій діяльності називається міогений лейкоцитоз. У ньому виділяють три фази: лімфоцитарну, нейтрофільну та інтоксикаційну. Лімфоцитарна фаза характеризується невеликим збільшенням кількості лейкоцитів (до 10-12 тис.) і спостерігається в спортсменів при незначному фізичному навантаженні. Нейтрофільна фаза (16-18 тис.) спостерігається в спортсменів після значної за тривалістю та інтенсивністю м'язової діяльності. Інтоксикаційна фаза (30-50 тис.) зустрічається при надмірній роботі в мало тренованих людей. Утворюються лімфоцити в лімфатичних вузлах, а зернисті лейкоцити в червоному кістковому мозку. Місцем руйнування лейкоцитів, як і еритроцитів, є печінка, селезінка. Живуть лейкоцити в середньому протягом 1-2 тижнів. Хоча серед лімфоцитів є і «довгожителі». Захисна функція лейкоцитів реалізується разом з ретикулоендотеліальною системою (РЕС), захисними властивостями шкіри та імунітетом. РЄС - сукупність ретикулярних і ендотеліальних кліток селезінки, печінки, 50 кісткового мозку, лімфатичних вузлів тощо. Ці клітини сприяють видаленню з крові і лімфи продуктів метаболізму мікробів та підтримці нормального гомеостазу. На шляху мікробів у внутрішнє середовище знаходяться бар'єри у вигляді здорової шкіри і слизових оболонок. При цьому важливу роль відіграють речовини, що утворюються в шкірі і слизових оболонках. Ці речовини згубно діють на більшість мікробів. Несприйнятливість організму людини до інфекційних хвороб називається імунітетом. Виділяють природжений і набутий імунітет, який може бути активним і пасивним. Природжений або видовий імунітет передається спадково. При цьому людина (як вид) несприйнятлива до деяких хвороб тварин (чумка й ін.). Таблиця 9. Форми придбаного імунітету Імунітет Природно набутий Штучно набутий Активний Виникає після перенесеної інфекції (хвороби) Виникає після вакцинації ослабленою вакциною Пасивний Виникає в результаті передачі антитіл з молоком матері або через плаценту Виникає після введення в організм антисиворотки В організмі в процесі будь-якого імунітету знаходяться антитіла й антитоксини. Антитіла (імунні тіла) - це білкові речовини, що утворяться в організмі при потраплянні в нього чужорідних речовин або вводяться в кров у готовому вигляді. Вони можуть склеювати, осаджувати і руйнувати мікроорганізми. Антитоксини - захисні речовини, що циркулюють у крові і нейтралізують отрути мікрорганізмів (токсини). Велика роль належить профілактичним щепленням у зниженні захворюваності віспою, дифтерією, коклюшем, грипом та ін. Важлива роль у боротьбі з інфекцією належить підвищенню температури тіла. При цьому захисні сили організму активізуються: підвищується рухливість фагоцитів і їхня здатність пожирати мікроби, а також більш ефективно функціонують антитіла. Переливання крові застосовують: 1) при великих крововтратах; 2) при недокрів'ї; 3) при отруєннях організму отрутами; 4) при важких станах хворого тощо. Наукова відповідь на це питання дали вчені на початку XX століття (Я. Янский, Массо, К. Ландштейнер). Вони знайшли у людей 4 групи крові. При цьому установили, що сироватка крові однієї людини склеює еритроцити крові іншої. Це явище отримало назву аглютинація. В еритроцитах були виявлені речовини білкової природи, що назвали аглютиногенами (речовинами, що склеюються). У людей їх існує два види. Умовно їх позначили буквами латинського алфавіту - А й В. У людей І групи крові в еритроцитах аглютиногени відсутні, кров II групи містить аглютиноген А, кров III групи містить аглютиноген В, а кров IV групи містить аглютиногени А та В. У зв'язку з цим І позначають нульовий (0), II - А, 51 III -В, ІV-АВ. У плазмі крові містяться аглютиніни (речовини, що склеюють). Їх позначають буквами грецького алфавіту - α (альфа) і β (бета). Аглютинін α склеює еритроцити з аглютиногеном А, а аглютинін β склеює еритроцити з аглютиногеном В. У плазмі І групи крові містяться аглютиніни α і β, у плазмі крові II групи - аглютинін β, у плазмі крові ІІІ групи - аглютинін α, а в плазмі крові IV групи аглютинінів немає. При переливанні крові важливо, щоб еритроцити крові, що вводиться (донора), не аглютинювали кров'ю людини, що отримує кров (реципієнта). У протилежному випадку еритроцити крові, що вводиться, будуть склеюватися в грудочки і піддаватися гемолізу (руйнуванню). Це приводить до важких порушень функцій організму і навіть до смерті. У зв'язку з цим, • кров І групи можна переливати всім людям; • кров людей II групи - тільки людям що мають II або IV групу; • кров людей ІІІ групи - людям III і IV групи; • кров людей IV групи, тільки людям що мають IV групу крові. Визначити групу крові можна, якщо мати готові сироватки II і III груп. Принцип методики визначення групи крові наступний. У межах однієї групи крові аглютинації (склеювання) еритроцитів немає: однак аглютинація може відбутися й еритроцити зберуться в грудочки, якщо вони потраплять у плазму і сироватку крові іншої групи. Отже, сполучаючи кров випробуваного зі свідомо відомою (стандартною) сироваткою, можна по реакції аглютинації вирішити питання про групу крові. Поряд із групами крові при переливанні необхідно враховувати резусфактор (особливий білок, що міститься в еритроцитах). 85 % людей мають в еритроцитах резус-фактор. Це резус-позитивні (Rh+), 15 % - резус-негативні люди (Rh- ). Якщо в кров резус-негативним людям перелити кров резуспозитивну, то руйнування еритроцитів при першому переливанні не наступить, оскільки в крові реципієнта немає готових антитіл до резус-фактора. Але після першого переливання вони утворяться, тому що резус-фактор є чужорідним білком для крові резус негативної людини. При повторному переливанні (Rh+) крові в кров (Rh- ) людини, антитіла, які утворилися раніше, викликають руйнування еритроцитів перелитої крові. Прикладом може служити гемолітична хвороба немовлят, що викликається несумісністю еритроцитів матері і плоду за резус-фактором. Це відбувається в тому випадку, якщо мати має резус-негативну кров, а плід успадкував від батька резус-позитивну. У період внутрішньоутробного розвитку відбувається наступне. Еритроцити плоду, що мають резус-фактор (Rh+), потрапляючи в кров матері, еритроцити якої не містять його, є там «чужорідними», антигенами, і проти них виробляються антитіла. Але кров матері через плаценту знову попадає в організм дитини, тепер уже маючи антитіла проти еритроцитів плоду. Виникає резус-конфлікт «мати - резус-негативна, а плід - резус-позитивний», наслідком чого є руйнування еритроцитів дитини і гемолітична жовтяниця. З кожною новою вагітністю концентрація антитіл у крові матері зростає, що може привести навіть до загибелі плоду. У шлюбі резус-негативного 52 чоловіка з резус-позитивною жінкою діти народжуються здоровими. До хвороби дитини може привести лише комбінація «резус-негативна мати і резуспозитивний батько». Встановлено, що резус-фактори бувають трьох типів - Д, С, Е. Особливо важливий облік цих факторів при пологах, тому що в 10 % випадків у матері і плоду резус-позитивна кров, але явище гемолітичної анемії настають. Приналежність до тієї або іншої групи крові і наявність резус-фактора не залежить від віку, статі, національності і не змінюється протягом життя людини. Зміст і послідовність виконання роботи Завдання 1 Вивчення методів взяття крові. Камера Горяєва. Невелику кількість крові можна взяти у людини, уколовши пучку четвертого пальця на лівій руці після обмивання шкіри цієї ділянки спиртом та ефіром. Прокол шкіри роблять на глибину 2-3 мм спеціально для цього пристосованим стерильним скарифікатором. Першу краплину крові знімають сухою марлею. Підносять піпетку до каплі крові, не торкаючись ранки, нахиляють капіляр до низу та нагнічують кров у піпетку. Відразу після взяття крові на пучку накладають марлю з розчином спирту (іноді додатково обробляють розчином йоду) і тримають великим пальцем, поки не припиниться кровотеча. Знайомство з камерою Горяєва. Мал. 9. Лічильна камера Горяєва. А – лічильна камера (вид зверху); Б – сітка Горяєва (1 – малий квадрат; 2 – великий квадрат); В – змішувач для еритроцитів; Г - змішувач для лейкоцитів Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів (15×15). Частину з них розділено вертикально і горизонтально на 16 маленьких квадратиків. Таких великих квадратів, які містять по 16 маленьких, в камері 25. Глибина камери дорівнює 1/10 мм, бік малого квадрата – 1/20 мм, отже, об’єм одного малого квадрата становить 1/4000 мм3 (1/20 × 1/20 × 1/10 = 1/4000) Одиницею відліку є маленький квадрат. 53 Завдання 2 Підрахунок кількості еритроцитів. Камеру Горяєва накривають покривним скельцем і притирають його до появи райдужних кілець. Камеру розташовують під мікроскопом і розглядають при малому збільшенні, а потім при великому (до отримання чіткого зображення сітки Горєва). Кров набирають в меланжер до мітки 0,5, протирають його кінчик фільтрувальним папером, потім до заповнюють розчином (3% NaCl) до мітки 101 (при цьому досягається розбавлення – в 200 разів). Обережно протягом хвилини змішують кров, затиснувши капіляр першим і третім пальцями. Видувають із змішувача на ватку 3 краплі, а 4-ту наносять на середню частину камери біля краю покривного скельця. Капілярними силами крапля втягується під покривне скельце і заповнює камеру. Після заповнення камери вичікують 1- 2хв (доки осядуть формені елементи) і починають підрахунок при малому збільшенні мікроскопа. Підрахунок еритроцитів зручно вести при об'єктиві 8 і окулярі 15. Підраховують кількість еритроцитів в 5 великих квадратах камери Горяєва (кожний з яких розділений на 16 маленьких, що складає в цілому 80 маленьких квадратів), які розташовані в різних місцях сітки (наприклад, по діагоналі). При цьому доцільно користуватись правилом: "до даного квадрата відносяться всі еритроцити, які розташовані в середині та на верхній і лівій його межі". Розраховують вміст еритроцитів у 1 мкл крові за формулою: х = (n × 4000 × 200)/80 = n × 10000, де х - число еритроцитів в 1 мкл цільної крові, n - сума еритроцитів в 80 маленьких квадратах. В нормі кількість еритроцитів в крові становить 4,5-5 млн./ мкл (1 мкл = 1 мм3 ). Завдання 3. Підрахунок кількості лейкоцитів крові. Камеру Горяєва накривають покривним скельцем і притирають його до появи райдужних кілець. Камеру розташовують під мікроскопом і розглядають при малому збільшенні (до отримання чіткого зображення сітки Горяєва). Заповнюють змішувач кров'ю до мітки 0,5 (0,02 мл), протирають його кінчик фільтрувальним папером і до заповнюють 4% розчином оцтової кислоти, підфарбованим метиленовим синім до мітки 11 (0,4 мл). Обережно змішують кров, затиснувши капіляр першим і третім пальцями, протягом хвилини. Видувають зі змішувача на ватку 1/3 його об'єму, а наступну краплю наносять на середню площадку камери біля краю покривного скельця. Підраховують кількість лейкоцитів в 25 великих квадратах (що відповідає 400 малим) камери Горєва, які розташовані в різних місцях сітки (наприклад, по діагоналі). При цьому доцільно користуватись правилом: "до даного квадрата відносяться всі лейкоцити, які розташовані в середині та на верхній і лівій його межі". Розраховують вміст лейкоцитів в 1 мкл крові за формулою: х = (n × 4ООО × 2О)/4ОО = n × 200, де х – кількість лейкоцитів в 1 мкл крові 54 n - сума лейкоцитів в 400 маленьких квадратах. В нормі кількість лейкоцитів в крові становить 5-8 тис/мкл. Зарисувати фрагмент сітки камери Горєва з великими та малими квадратами. Записати результат і зробити висновки про відповідність підрахованих формених елементів крові. Завдання 4. Визначення кількості гемоглобіну в крові. Вміст гемоглобіну в крові встановлюють за допомогою гемометра Салі. Він складається зі штативу (задня стінка виготовлена з матового скла), в який поміщені три пробірки однакового діаметру. Дві крайні пробірки запаяні і містять розчин солянокислого гематину, середня градуйована і відкрита. До приладу додається капіляр з міткою 20 мкл (капіляр Салі), скляна паличка та піпетка. В середню пробірку гемометра наливають 0,1N розчин НС1 до нижньої кільцевої мітки. В капіляр Салі до мітки набирають кров, видаляючи надлишок з кінчика капіляра фільтрувальним папером. Видувають кров в середню пробірку так, щоб верхній шар розчину кислоти залишався не зафарбованим. Не виймаючи піпетки з розчину, ополіскують її у верхньому шарі. Після цього вміст пробірки перемішують, вдаряючи пальцем по дну пробірки, і залишають на 5-10 хв (для перетворення гемоглобіну в солянокислий гематин). Перемішуючи скляною паличкою, краплями додають дистильовану воду до того часу, коли його колір співпаде з кольором стандартного розчину. Цифра, яка стоїть на рівні нижнього меніску отриманого розчину, показує вміст гемоглобіну в крові, що досліджується в грам-процентах. Розрахуйте відносний відсотковий вміст гемоглобіну в одиницях Салі за формулою: Х = (100 × Gem)/ 16,7 , де Gem – вміст гемоглобіну в г% Порівняйте кількість гемоглобіну у жінок та чоловіків і зробіть висновки. Зниження концентрації гемоглобіну в крові спостерігається при різних анеміях (через кровотечу, нестаток заліза, ціанокобаламіну (віт. В12), фолієвої кислоти, при підвищеному гемолізі еритроцитів). Підвищення концентрації гемоглобіну в крові спостерігається при збільшенні кількості еритроцитів, легенево-серцевій недостатності, пороках серця. Завдання 5. Вивчити процеси фагоцитозу та імунітету. Розглядання таблиць та замальовка у зошит послідовних стадій фагоцитозу і розвиток імунітету.

Контрольні питання 1. Яка існує техніка підрахунку еритроцитів і лейкоцитів? 2. В яких одиницях вимірюють кількість еритроцитів та лейкоцитів крові? 3. Характеристика і функції лейкоцитів. 4. Які функції виконують еритроцити? 55 5. Значення гемоглобіну для газообміну. 6. Які чинники впливають на вміст гемоглобіну у крові? 7. Яку рН має кров і як здійснюється регуляція рН крові? 8. Що таке лейкоцитарна формула та яка роль її у постановці діагнозу захворювання? 9. Які захисні фактори організму? Механізм утворення та види іму