

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

С.Г. Смолин

ФИЗИОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

Методические указания

Красноярск 2014

Рецензент

В.А. Колесников, д-р биол. наук, профессор КрасГАУ

Смолин, С.Г.

Физиология системы крови: метод. указания / С.Г. Смолин, Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2014. – 50 с.

Представлены методические указания к лабораторным исследованиям крови животных на морфологические и биохимические показатели. Даны контрольные вопросы и задания к 24 лабораторным занятиям.

Предназначено для студентов 2-го курса очной и заочной форм обучения специальности 111801.65 «Ветеринария» и направлений 111900.62 «Ветеринарно-санитарная экспертиза», 111100.62 «Зоотехния», 110900.62 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», а также для студентов 3-го курса очной и заочной форм обучения направления 020400.62 «Биология», могут быть использованы ветеринарными врачами и другими специалистами в практической работе при анализе крови на различные морфологические и биохимические показатели.

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Красноярского государственного аграрного университета

© Смолин С.Г., 2014

© ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет», 2014

ВВЕДЕНИЕ

Исследование крови является одним из важнейших диагностических методов.

Кроветворные органы чрезвычайно чувствительны к различным физиологическим и особенно патологическим воздействиям на организм, поэтому картина крови является тонким отражением этих воздействий.

Изменения, происходящие в организме при заболеваниях, нередко не проявляются клинически. Анализ крови помогает выявить скрыто протекающие процессы и возникающие осложнения, дифференцировать сходные заболевания инфекционного и неинфекционного характера, судить о состоянии организма и функциональной деятельности отдельных органов, следить за эффективностью лечения и делать соответствующую коррекцию.

По количественным и качественным показателям крови можно в сочетании с клиническими данными ставить дифференциальный диагноз на анемии различного происхождения, лейкозы, кровопаразитарные заболевания.

В клинической практике чаще сочетают физико-биохимический и морфологический анализы крови, которые сравнивают с гематологическими показателями для всех видов животных с учетом физиологических колебаний (порода, пол, возраст, физическая нагрузка, прием корма, продуктивные показатели, условия содержания и место обитания).

Для сравнения используют разработанные учеными показатели по общему количеству крови, рН, резервной щелочности, количеству форменных элементов и др.

В настоящее время правильный выбор объема лабораторных диагностических тестов и углубленное научное их толкование во многом определяют успех и своевременность постановки диагноза, выбор терапии, контроль за ее эффективностью.

Полное исследование крови включает определение ее физико-химических свойств – цвета, скорости свертывания, ретракции кровяного сгустка, вязкости, удельного веса, СОЭ, рН, щелочного резерва, гемоглобина, билирубина, общего белка и его фракций, остаточного азота, количества форменных элементов, лейкоцитарной формулы, лейкоцитарного профиля и др.

Настоящие методические указания являются переработанными и дополненными некоторыми новыми методами анализа крови.

Методические указания имеют целью познакомить студентов Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины: специальности 111801.65 «Ветеринария» и направлений 111900.62 «Ветеринарно-санитарная экспертиза», 111100.62 «Зоотехния», 110900.62 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», 020400.62 «Биология» с задачами и возможностями лабораторной ветеринарной службы в практическом животноводстве, а также освоить некоторые методики анализа крови, наиболее часто используемые в практической деятельности ветеринарного врача, ветсанэксперта, зооинженера и других специалистов биологических специальностей.

Методические указания соответствуют программе по курсу «Физиологии и этологии животных», утвержденной на заседании методической комиссии Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины.

Работа 1. ПОЛУЧЕНИЕ КРОВИ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Общие правила техники взятия крови

При взятии крови у животных соблюдают общепринятые правила для всех способов получения крови:

1) *Фиксация животных.* Для каждого вида животного используют соответствующий ему способ фиксации. Необходимо учитывать, что насильственный способ фиксации у животных вызывает стрессовые реакции и сужение сосудов, что приводит к прекращению кровотока.

2) *Выбор места взятия крови.* Учитывая необходимое количество для анализов крови, ее можно получить или из крупных сосудов, или из мелких. Для каждого вида животного имеются особенности расположения доступных сосудов.

3) *Обработка поля (места взятия крови).* Если кожа грязная, ее заранее моют теплой водой с мылом, а затем хорошо просушивают и обезжиривают эфиром. Волосистой покров на месте взятия крови выстригают или выбривают. Затем протирают смесью спирта с эфиром

(1:1). Эфир высушивает кожу и вызывает расширение сосудов после их первоначального сужения, спирт обезвреживает поле взятия крови.

4) *Выбор иглы и правила прокола.* Из крупных сосудов кровь получают инъекционной иглой разного диаметра, мелкие сосуды прокалывают или тонкой инъекционной иглой, или плоскими специальными иглами (скарификаторами) с острым концом. При уколе в кровеносный сосуд ушной раковины с противоположной стороны ее поддерживают пальцем с ватным тампоном с целью создания твердой опоры и предотвращения ранения пальца. Кровеносный сосуд прокалывают поперек, при продольном направлении стенки сосуда быстро соединяются и кровь не выступает в ранку. Укол делают умеренной глубины, с расчетом не проколоть противоположную (вторую) стенку сосуда.

Если ранка небольшая, кровь выделяется самопроизвольно небольшими каплями. Большие капли или вытекание крови струйкой нежелательны, особенно при приготовлении мазков. Первые капли, кроме случаев исследования крови на гемоспориозы, удаляют ватным тампоном, затем готовят мазки, набирают в гемометр и другие смесители.

При взятии крови из крупных сосудов вены перед проколом ее или сдавливают большим пальцем левой руки, или накладывают резиновый жгут ниже места укола. Инструментарий для взятия крови и цилиндры предварительно стерилизуют.

Иглу ставят против тока крови под углом 45°. Если кровь из сосудов ушной раковины получают многократно, необходимо поочередно менять место укола; сначала делают укол у кончика уха, а затем каждый раз ближе к основанию. Этим устраняется влияние местной реакции на показатели крови и нежелательное травмирование сосуда.

После укола и забора крови иглу убирают, место укола обрабатывают спиртом или 5 %-й настойкой йода.

Способы получения крови у животных

Лошади. Небольшое количество крови у лошадей получают из ушной вены внутренней поверхности ушной раковины путем ее надреза или прокола инъекционной иглой.

Для получения больших количеств крови, а также для внутренних вливаний производят пункцию яремной вены на границе верхней и средней трети шеи.

Крупный рогатый скот. Небольшое количество крови получают из ушной вены на наружной поверхности ушной раковины путем надреза или прокола тонкой инъекционной иглой. Для получения большого объема крови удобнее брать из левой яремной вены на границе верхней и средней трети шеи. Для этого ниже подготовленного места взятия крови вокруг шеи накладывают резиновый или обычный жгут. При отсутствии жгута вену сдавливают большим пальцем левой руки ниже места вкола иглы. Это способствует наполнению вены кровью, и она хорошо просматривается. Берут кровяную иглу в правую руку и быстрым ее движением с удара вводят в сосуд под углом 45° против тока крови. Вытекающую из иглы кровь собирают, направляя ее по стенке в пробирку. Перед извлечением иглы из сосуда снимают жгут или прекращают сдавливание вены пальцем. Место вкола придерживают ватой, смоченной спиртом, иглу вытаскивают, а кожу протирают спиртом. У овец и коз можно взять кровь из левой яремной вены на границе верхней и средней трети шеи или из передненаружной плюсневой вены, расположенной на наружной поверхности голени. Животное кладут на бок или фиксируют в станке. Конечность сдавливают рукой или накладывают резиновый жгут ниже коленного сустава. Иглой прокалывают сначала кожу, а затем стенку вены. Кровь насаживают в шприц.

В последнее время для взятия крови у крупных животных широко применяют приборы-автоматы разной конструкции. В каждом из таких автоматов имеются металлический корпус, держатель для пробирки, ударный механизм с пружиной и иглодержатель.

Свиньи. У свиней малые количества крови получают путем надреза скальпелем большой ушной вены. Центральный конец сосуда у корня уха зажимают при этом пальцем.

Для получения больших количеств крови отсекают ножницами или скальпелем отрезок хвоста длиной 1–1,5 см. По окончании кровопускания рану обрабатывают 5 %-й настойкой йода, а кончик хвоста сдавливают резиновым кольцом или перетягивают бинтом на 1–2 суток, до прекращения кровотечения. У поросят рекомендуют получать кровь путем прокола иглой или микропипеткой орбитального венозного синуса.

Животное при этом фиксируют в спинном положении. За один раз берут 5–30 мл крови.

Собаки и пушные звери. У собак, песцов, лис, кошек небольшое количество крови получают путем надреза края уха или прокола мягкой части ступни. У норок, соболей, мелких собак, кошек ножницами срезают кожу на подушечке одного из пальцев тазовой конечности.

Для получения больших порций крови у крупных собак, песцов и лис производят пункцию локтевой или лучевой вены, расположенной на передней конечности. Для этого предварительно выстригают шерсть, накладывают резиновый жгут и после протирания спиртом вводят в вену инъекционную иглу. После взятия нужного количества крови жгут снимают, место введения иглы придерживают ватой и извлекают иглу из сосуда. Место пункции протирают спиртом или 5 %-м раствором йода. Кровь у песцов и лис можно также взять из передне-наружной плюсневой вены. Кровь песцов и лисиц характеризуется низкой резистентностью эритроцитов, поэтому во избежание гемолиза свободно вытекающую из иглы кровь собирают в пробирку, не используя для этой цели шприц.

Из лапки кровь собирают в стеклянный капилляр (дрот). После заполнения дрота нижний конец его заклеивают расплавленным воском или пластилином и помещают в ячейки специальных устройств, используют по назначению. Можно брать кровь у пушных зверей из кончика хвоста. Брать кровь у зверей необходимо до кормления.

Кролики. Малые количества крови у кроликов получают путем надреза или прокола вены, расположенной снаружи по тонкому краю уха. Местом кровопускания может служить и грудная вена, расположенная на грудной клетке сбоку.

После обработки операционного поля (от локтевого бугра до третьего ребра) вену зажимают пальцем около локтя. Иглу вводят против тока крови. В некоторых случаях берут кровь из сердца. Иглу вкалывают в третий межреберный промежуток слева, на расстоянии 3–4 см от наружного края грудины. Крови можно взять одновременно 15–20 мл.

Морские свинки. Небольшое количество крови у морских свинок получают путем надреза края уха или прокола иглой. Для получения больших количеств делают пункцию яремной вены (после разреза кожи и препаровки кожи) или пункцию сердца.

Иглу вкалывают у левого края грудины, в точке, где хорошо ощущается сердечный толчок. Направление укола – внутрь к средней линии, глубина 1,5–2 см. Можно взять 5–10 мл крови.

У мышей и крыс кровь берут из сосудов хвоста путем срезания его кончика ножницами.

Птицы. Небольшое количество крови у кур и индеек получают надрезом или путем скарификации гребня, сережек. У гусей и уток делают прокол мякоти ступни. В большом количестве кровь у птиц получают из подкожной подкрыльцовой вены, расположенной на внутренней поверхности крыла. Перья выщипывают, вену сдавливают пальцем в области локтевого сустава, прокол делают под углом на уровне локтевого сустава. Можно предварительно обнажить сосуд коротким разрезом кожи. Ввиду высокой свертываемости крови у птицы место прокола протирают противосвертывающим веществом.

После взятия крови место прокола на несколько минут зажимают тампоном. У гусей, индеек и уток кровь можно получить из внутренней плюсневой вены, расположенной под кожей на медиальной поверхности плюсны. Можно взять одновременно 10–15 мл, а у голубей – 1,0–1,5 мл крови. При необходимости получить артериальную кровь – делают пункцию сонной артерии или сердца.

Получение плазмы, сыворотки и дефибринированной крови

Получение плазмы. Для получения плазмы кровь необходимо предохранить от свертывания добавлением антикоагулянтов. Такая кровь после отстаивания или центрифугирования разделяется на плазму (верхний слой) и форменные элементы.

В качестве антикоагулянтов используют порошок лимоннокислого или щавелевокислого натрия – 20–30 мг. На 10 мл крови – раствор щавелевокислого калия и щавелевокислого аммония (7,0 г оксалата калия; 4,5 г оксалата аммония; 100 мл воды) в дозе 0,2 мл, гепарин в количестве 100 ед. на 1 мл крови (примерно 2 капли неразведенного гепарина на 10 мл крови) или 1 %-го раствора гепарина – 1 капля на 5 мл крови. Для стабилизации крови можно использовать 20 %-й раствор лимоннокислого натрия или калия – 0,3–0,5 мл на 10 мл крови.

Для одновременной стабилизации и консервирования крови используется смесь: 10 частей фтористого натрия; 1 часть тимола; 3 части оксалата калия – эта смесь тщательно растирается в фарфоровой ступке. Для консервирования необходимо 50 мг смеси на 15 мл

крови. Для подсчета форменных элементов стабилизированную кровь используют в течение 48–72 ч, для приготовления мазков – до 24 ч.

Ход работы. В пробирку и стеклянный цилиндр с антикоагулянтом выпустить по 10 мл крови из яремной вены животного. Закрывать сосуд пальцем или пробкой, несколько раз перевернуть его для перемешивания крови. Цилиндр поставить в термостат (кровь лошади на 1 ч, крупного рогатого скота на 24–48 ч), пробирку – в центрифугу. Центрифугировать при 3 000 об/мин в течение 20–30 мин.

Работа 2. ПОЛУЧЕНИЕ СЫВОРОТКИ

В пробирку или цилиндр выпустить 10 мл крови животного и поставить в термостат при 38°, на 10–18 ч – кровь крупного рогатого скота, на 1–3 ч – лошади, других животных – на 10–15 ч. За это время кровь свертывается, происходит ретракция сгустка и отделение сыворотки. Если сыворотка отделилась плохо, необходимо сгусток обвесить тонкой провололочкой и снова поставить в термостат на 7–8 ч, сыворотка от плазмы отличается тем, что в ней нет фибрина, она имеет желтовато-соломенный цвет и более прозрачна, чем плазма.

Сыворотку можно получить другим способом. Дефибринированную кровь разлить в центрифужные пробирки и центрифугировать при 3 000 об/мин в течение 10–15 мин.

Работа 3. ПОЛУЧЕНИЕ ДЕФИБРИНИРОВАННОЙ КРОВИ

В банку со стеклянными бусами медленно приливают при постоянном помешивании кровь, потом ее встряхивают в течение 15–20 мин, затем фильтруют через двойной слой марли для освобождения от фибрина. Фибрин промывают, высушивают, используют по назначению. Фибрин можно получить, если кровь перемешивать волосистой метелкой, на которую наматываются нити фибрина.

Контрольные вопросы к работам № 1–3

1. Общие правила при взятии крови.
2. Техника получения крови у разных видов животных.
3. Что такое плазма, сыворотка, дефибринированная кровь и методы их получения?

Работа 4. ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА (МЕТОД ЕМЕШИНОЙ)

В мерную центрифужную пробирку отмеряют 0,25 мл разводящего раствора, состоящего из 3 ч. нейтрального цитрата натрия, 3 г сахарозы, 100 мл 2,5 %-го раствора желатина, 0,2 г альбицида, и набирают в нее 0,5 мл крови. Для предупреждения образования сгустка стекающую по стенке пробирки кровь перемешивают с разводящим раствором. Затем пробирку ставят в штатив на 35 мин при комнатной температуре до образования в ней двух четко разграниченных слоев. Надосадочную жидкость со взвешенными в ней лейкоцитами, тромбоцитами и небольшой примесью эритроцитов осторожно отсасывают пастеровской пипеткой и переносят в пробирку микроцентрифуги Шкляра. Центрифугируют 3–4 мин со скоростью ручки 7–8 об/мин, что соответствует 700–800 об/мин центрифуги. После чего надосадочную жидкость отсасывают, а из осадка делают мазки и исследуют.

Работа 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТРАКЦИИ КРОВИ

Ретракция – это самопроизвольное отделение сыворотки крови от ее сгустка при отстаивании. Показателем ретракции являются две величины: время ретракции и индекс ретракции. Время ретракции – это время (в часах) от момента взятия крови до отстаивания сыворотки (образование кровяного сгустка). У лошадей полное отделение сгустка – через 12–18 ч, образование сгустка 1–3 ч. У крупного рогатого скота полное образование сгустка за 20–25 ч. Индекс ретракции – это отношение количества сыворотки, отделившейся за сутки, к объему взятой крови. У здоровой лошади равняется 0,5. Ретракция кровяного сгустка может быть пониженной или совершенно отсутствовать при полуглобулиях и других заболеваниях.

Работа 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Для определения скорости свертывания крови можно пользоваться несколькими методами:

1. Определение по способу Милькни

Ход работы. Шесть сухих обезжиренных предметных стекол положить на марлю, смоченную водой. Проколоть кровеносный сосуд животного и нанести на каждое стекло по одинаковой капле кро-

ви. Отметить время взятия крови. Покрывать стекла чашками Петри. В зависимости от вида животного и времени свертывания его крови через каждые 1–2 мин открывать последовательно стекла и проверять форму капли. Если капля не растекается – кровь свернулась.

2. Способ Маса и Марго

Ход работы. На парафинированное часовое стекло помещают большую каплю вазелинового масла. Для взятия крови используют пипетку от гемометра Сали, капиллярное отверстие которого также парафинируют. Делают прокол сосуда животного. Первую каплю стирают сухой ваткой, вторую насасывают в пипетку приблизительно до метки 20 мкл. Быстро выдувают кровь в толщу капли вазелинового масла.

Этот момент является началом исследования. Через каждые 1–2 мин (в зависимости от вида животного) погружают конец пипетки в каплю крови и производят насасывание в капилляр с последующим быстрым выдуванием ее обратно.

После каждой пробы вытирают конец пипетки фильтровальной бумагой и выдувают задержавшиеся в капилляре остатки крови.

Отмечают время, когда кровь перестает насасываться в капилляр, что свидетельствует о произошедшем свертывании.

Время свертывания выражается в минутах.

3. Определение в капиллярах Панченкова

Ход работы. В капилляр Панченкова до метки 50 набирают кровь и каждые 30 с капилляр наклоняют на 50° до тех пор, пока кровь не перестанет растекаться по стенкам капилляра.

4. Метод Дюка – определение продолжительности кровотечения (у человека)

Ход работы. Прокалывают кожу пальца на глубину 3 мм. Замечают время. Каждые 30 с прикладывают фильтровальную бумагу к капле крови (не касаясь ранки). Отмечают время, через которое фильтровальная бумага перестанет впитывать кровь.

Задание: определить время свертывания крови у кролика или другого животного разными методиками. Дать оценку методу.

Работа 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМАТОКРИТНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ

Гематокритный показатель – это соотношение плазмы и форменных элементов крови. Плазма составляет 60–65 % общего объема крови, а форменные элементы – 35–40 %.

Это соотношение изменяется в зависимости от вида, возраста, породы животных, функционального состояния, а также при некоторых заболеваниях.

Показатель гематокрита определяют или с помощью прибора гематокрита, или в микроцентрифуге Шкляра.

Ход опыта:

1. Набрать через узкий конец в капиллярные трубки гематокрита стабилизированную кровь животного. Две капиллярные трубки с кровью поместить в рамку гематокрита – узкими концами друг к другу. Укрепить гематокрит в центрифуге и центрифугировать при 3 000–4 000 об/мин 8–10 мин.

Форменные элементы располагаются в периферической части капилляра, а плазма – в центре. Капилляр имеет деления от 0 до 100. По показателям капилляра (берут средние из двух) определяют относительный объем форменных элементов и плазмы, %.

2. При использовании микроцентрифуги Шкляра заполняют один капилляр.

Центрифугируют кровь в течение одной минуты при скорости оборотов 7 000 в мин (ручку центрифуги вращают со скоростью 60–70 об/мин). Расчет производят с учетом оседания столбика форменных элементов в обоих концах капилляра.

3. При отсутствии гематокрита и центрифуги Шкляра можно использовать градуированные пробирки (2 пробирки), в которые наливают по 1,0 мл крови и центрифугируют в 2–3 приема до постоянных показателей объема плазмы и форменных элементов.

Задание. Определить гематокритный показатель стабилизированной крови кролика, коровы, овцы, козы, по результатам сделать вывод.

Работа 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОГО ВЕСА КРОВИ (ПЛОТНОСТИ КРОВИ)

Удельный вес крови больше единицы, что свидетельствует о богатстве ее плотными составными частями, в частности форменными элементами. Удельный вес отражает колебания количества воды в крови и потому может служить показателем диффузионного обмена между кровью и тканями. При нарушении водно-солевого обмена удельный вес или увеличивается, или уменьшается. Изменяется удельный вес при некоторых заболеваниях: анемии, гемолитической

желтухи, кахексии, гидремическом состоянии. У сельскохозяйственных животных удельный вес в среднем составляет: крупнорогатого скота – 1,047–1,055 г/см³; лошади – 1,045–1,055; свиньи – 1,042–1,060 и у кролика – 1,048–1,060 г/см³. Определить удельный вес крови можно тремя методами:

1. Метод Гаммершильга

Ход работы. Приготавливают смесь хлороформа (уд. вес 1,485) и бензола (уд. вес 0,88) в соотношении: 20 частей хлороформа и 55 – бензола (или толуола). Смесь наливают в широкую пробирку и опускают в нее каплю крови.

Капля крови не должна иметь пузырьков и разбиваться на части. Если капля опускается на дно, то ее удельный вес выше удельного веса жидкости.

Тогда прибавляют несколько капель хлороформа и перемешивают жидкость несколько раз, медленно опрокидывают пробирку, наблюдая за положением капли в смеси. Хлороформ добавляют до тех пор, пока капля не будет оставаться в равновесии на любой глубине смеси, не падая вниз и не всплывая на поверхность. Это произойдет тогда, когда удельный вес капли станет равным удельному весу жидкости. После этого измеряют ареометром удельный вес жидкости. По окончании измерений смесь можно профильтровать и хранить для дальнейших исследований.

2. Метод Косякова

Ход работы. Необходимо приготовить основной раствор меди сернокислой. Для этого навеску химически чистого $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в количестве 340 г растворяют в 1,6 л дистиллированной воды и общий объем доводят до 2 л в мерной колбе. В приготовленный раствор опускают ареометр и добавляют воду до получения плотности данного раствора 1,10.

Из этого раствора готовят раствор медного купороса с удельным весом 1,040; 1,045; 1,050; 1,055; 1,060. Чтобы приготовить раствор меди сернокислой с плотностью 1,050, нужно в мерный цилиндр на 100 мл влить 49 мл исходного раствора и добавить в него 51 мл дистиллированной воды. Для раствора с плотностью 1,051 берут 50 мл исходного раствора и смешивают с ним 50 мл воды. В таком же порядке готовят все остальные растворы, каждый раз увеличивая на 1 мл исходный раствор и внося в него на 1 мл меньше дистиллированной воды.

Растворы разливают в стаканчики и глазной пипеткой в каждый капают по капле крови с высоты 1 см. Удельный вес крови будет соответствовать удельному весу раствора медного купороса, если капля будет задерживаться в нем 4–5 с на середине глубины. Если капля быстро опускается на дно сосуда, то плотность данной крови выше, чем раствора, а если капля остается на поверхности, ее плотность меньше.

3. Определение удельного веса крови с помощью пикнометра

Ход работы. Пикнометром называется стеклянный сосуд определенной емкости (1,0–5 мл) с пришлифованной стеклянной пробкой.

Тщательно вымытый и высушенный пикнометр взвешивают на точных аналитических весах вначале пустой, затем наполненный дистиллированной водой и, наконец, наполненный исследуемой кровью. Определив вес крови и дистиллированной воды, делят первую величину на вторую и получают удельный вес исследуемой крови:

$$\text{Удельный вес крови} = \frac{\text{вес крови}}{\text{вес воды}} .$$

Задание. Определить удельный вес крови животного (или нескольких животных) 2–3 методами, по результатам сделать вывод.

Работа 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЯЗКОСТИ КРОВИ

Под вязкостью понимают внутреннее сцепление составных частей жидкости, отражающееся на скорости прохождения ее по капиллярной трубке при определенных температуре и давлении. Плотность и вязкость крови – величины зависимые. Повышение вязкости может быть при уменьшении воды, ухудшении состояния сосудов, при некоторых заболеваниях: перитоните, плеврите, лейкомиях, при слабости сердечной деятельности. Понижение наблюдается при анемиях, нефрите, гидремии крови.

Показатель вязкости – величина относительная и свидетельствует, во сколько раз вязкость крови больше вязкости воды: у крупного рогатого скота – в 4,2–5,2; лошади – 3,3–5,0; свиньи – 4,8–6,2; кролика – 3,5–4,5; определить вязкость можно 3 методами:

1. Определение вязкости цельной крови, плазмы и сыворотки вискозиметром Гесса

Прибор состоит из двух капилляров, из которых один служит для наполнения дистиллированной водой, другой – для наполнения

кровью. Капилляры имеют деления от 0 до 10. С помощью крана один капилляр перекрывается. Оба капилляра соединяются посредством тройника с резиновой трубкой для насасывания воды или крови.

Ход работы. В правый капилляр, предварительно открыв кран, насасывают из стакана дистиллированную воду до метки «0» и закрывают кран. Во второй капилляр (слева) насасывают через резиновую трубку также до нулевого деления цитратную кровь из часового стекла. После этого, открыв кран, втягивают воздух из капилляров, в которых возникает вакуумное пространство, и жидкости начинают движение. Особое внимание обращают на уровень крови: как только он дойдет до деления «1», втягивание воздуха прекращается. Отмечают, какой отрезок капилляра прошла за это время дистиллированная вода «X», и по ней определяют относительную вязкость крови. За единицу вязкости любой биологической жидкости берется дистиллированная вода. После этого капилляры промывают, высушивают и в аналогичном порядке определяют вязкость плазмы и сыворотки крови. Результаты опыта заносят в таблицу, сравнивают их и анализируют.

$$\text{Вязкость крови} = \frac{\text{путь воды}}{\text{путь крови}} .$$

2. Определение вязкости по Бекенской

Ход работы. В чистую сухую микропипетку емкостью 0,1 мл насасывают дистиллированную воду до метки 0,075. Пипетку приводят в вертикальное положение, открывают капилляр и по секундомеру определяют время истечения воды от метки 0,075 до метки 0,005.

Затем в пипетку, после промывания ее раствором лимоннокислого натрия, насасывают кровь до метки 0,075 и по секундомеру определяют время истечения крови.

$$\text{Вязкость крови} = \frac{\text{время истечения крови}}{\text{время истечения воды}} .$$

3. Определение вязкости крови по Ротанскому

Метод имеет сходство с методом Бекенской, с разницей в том, что используют воронку с оттянутым концом с двумя метками.

Ход работы. До первой метки опускают воду или кровь из воронки, а до второй метки по секундомеру.

Задание. Определить вязкость крови, плазмы и сыворотки коровы, козы и кролика, по результатам сделать вывод.

Контрольные вопросы к работам № 4–9

1. Что включает лейкоконцентрат? Метод его получения.
2. Определение ретракции крови и его механизм.
3. Механизм свертывания крови. Методы определения, время свертывания крови у различных сельскохозяйственных животных.
4. Что понимают под гематокритным числом? Методики его определения.
5. Плотность (удельный вес) крови, методы определения.
6. Вязкость крови, методы ее получения.

Работа 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БУФЕРНЫХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Кровь имеет слабощелочную реакцию, $pH = 7,35-7,50$. Постоянство среды поддерживается буферными системами: гемоглобиновой, карбонатной, фосфатной и белковой (белки плазмы крови). Точной мерой буферной емкости крови является количество грамм-эквивалентов сильной щелочи или сильной кислоты, которое необходимо прилить к 10 мл крови, чтобы сдвинуть ее pH на единицу (Ван-Слайк).

Относительные показатели буферных свойств (щелочного и кислотного) по отношению воды можно определить упрощенным методом.

Определение кислого буфера

Номер стаканчика	Содержимое стаканчика	Результат
1	15 мл дист. воды + 2 капли фенолфталеина + 2 капли 0,1 н р-ра едкого натра	Слабо-фиолетовое окрашивание
2	15 мл дист. воды + 1 мл сыворотки + 2 капли фенолфталеина, титровать 0,1 н р-ром едкого натра	Слабо-фиолетовое окрашивание

Расчеты: на 15 мл дист. воды – 2 капли 0,1 н р-ра едкого натрия, на 1 мл сыворотки – 6 капель, на 15 мл сыворотки: $6 \times 15 = 90$ капель. Следовательно, к сыворотке нужно прибавить в 45 раз ($90 : 2$) больше щелочи, чем к воде, чтобы вызвать одинаковое изменение реакции. Обычно эта величина составляет 40–70.

Определение щелочного буфера

Номер стаканчика	Содержимое стаканчика	Результат
1	5 мл дист. воды + 3 капли метилоранжа + 1 капля 0,1 н р-ра соляной кислоты	Слабо-красное окрашивание
2	5 мл дист. воды + 1 мл сыворотки + 3 капли метилоранжа, титровать 0,1 н р-ром соляной кислоты	Слабо-красное окрашивание

Расчеты: на 5 мл дист. воды пошла 1 капля 0,1 р-ра соляной кислоты. На 1 мл сыворотки – 60 капель, а на 5 мл сыворотки – $60 \times 5 = 300$. Следовательно, к сыворотке нужно добавить в 300 раз ($300 : 1$) больше кислоты, чтобы вызвать одинаковое смещение реакции. Обычно величина колеблется: 280–350.

Работа 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО РЕЗЕРВА (ЩР) ПО НЕВОДОВУ

Щелочной резерв – это запас щелочных солей слабых кислот, который способен нейтрализовать поступающие в кровь кислые продукты. Величину щелочного резерва определяют двумя методами: газометрическим по Ван-Слайку с помощью прибора ЩР-3 и титрометрическим по Неводову.

В первом случае определяют истинный щелочной резерв – по объему выделившейся углекислоты, связанной плазмой в виде бикарбоната. Эти показатели у сельскохозяйственных животных равны 50–68 об% CO_2 .

Во втором – общую кислотную емкость крови у сельскохозяйственных животных показатели составляют 500–700 мг%.

Номер стаканчика	Содержимое стаканчика	Результат
1 (контр.)	10 мл 0,01 н р-р HCl + 2 капли фенолфталеина, титровать до бледно-розового окрашивания (титруем 0,01 н р-р едкого натра)	Бледно-розовое окрашивание
2 (опыт)	10 мл 0,01 н р-р HCl + 2 капли фенолфталеина + 0,2 мл крови (свежеполученной), титровать (титруем 0,01 н р-р едкого натра)	Выпадение белых хлопьев

Расчеты: $KE = (X - Y) \times 200$,

где X – количество щелочи, пошедшей на титрование контрольной пробы;

Y – количество щелочи, пошедшей на титрование опытной.

Задание:

1. Определить буферные свойства сыворотки крови коровы, козы, овцы, кролика.

2. Определить щелочной резерв крови и сыворотки кролика или козы. Дать сравнительный анализ в соответствии с физиологическими нормами.

Работа 12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Рефрактометрический метод определения общего белка в сыворотке крови

Метод основан на способности сред различно преломлять проходящие через них лучи света.

Реактивы: смесь этилового спирта с серным эфиром 1:1; дистиллированная вода.

Специальное оборудование и аппаратура. Рефрактометр типа ПНР, РДУ, ИРФ-454, УРЛ и др.; холодильник бытовой, поддерживающий температуру 4–6 °С; термометр на 50 °С; термостат поддерживающий температуру 38 °С; стеклянная палочка; марлевые салфетки; вата; стаканчики; пробирки биологические; пробирки центрифужные; центрифуга.

Ход определения. Стеклопалочкой на нижнюю призму рефрактометра наносят каплю дистиллированной воды и закрывают камеру. Проводят подготовку прибора к работе: регулировочным винтом устанавливают шкалу рефрактометра на отметку 1,3330. Добиваются резкой границы светотени, проходящей через отметку 1,3330. Удаляют воду с призмы марлевой салфеткой и протирают ватой, смоченной смесью этилового спирта с серным эфиром. Наносят каплю сыворотки крови, полученную от крупного или мелкого рогатого скота, на призму стеклопалочкой, закрывают камеру и 2 раза производят отсчет. Вычисляют среднее показание.

Марлевой салфеткой удаляют с призмы рефрактометра сыворотку, протирают ватой, смоченной спиртово-эфирной смесью, и исследуют следующую пробу. Стеклопалочку промывают в дистиллированной воде и обсушивают марлей.

Расчет результатов. Содержание белка в исследуемых пробах, %, определяют по таблице.

Пересчет показаний рефрактометра на показатель преломления в процент белка

Показатель преломления	Процент белка	Показатель преломления	Процент белка	Показатель преломления	Процент белка	Показатель преломления	Процент белка
1,34480	5,03	1,3459	5,80	1,34713	6,42	1,34851	7,3
1,34498	5,19	1,34610	5,90	1,3474	6,64	1,34880	7,5
1,34527	5,39	1,34630	6,01	1,34770	6,83	1,34918	7,81
1,34547	5,24	1,3465	6,2	1,34820	7,17	1,34961	7,92

Если температура в камере во время отсчета не соответствует 20 °С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус: в случае низкой температуры поправку вычитают, при более высокой – прибавляют.

Ошибка метода. При хранении сыворотки в холодильнике в течение 3–4 дней ошибка метода не превышает ±1 %.

Время, необходимое для проведения исследования. На одно исследование затрачивается 1–2 мин. Среднее количество исследований в день составляет 150 проб.

Содержание белка в сыворотке крови здоровых животных стабильно. Отклонения уровня белка от нормы свидетельствуют о глубоких нарушениях обмена веществ в организме животных. Снижение содержания белка в сыворотке крови (гипопротеинемия) характери-

зует длительный недокорм, белковое голодание, плохое усвоение протеина из кормов вследствие хронических расстройств желудочно-кишечного тракта, заболеваний печени, дефицита углеводов, макро- и микроэлементов и витаминов в рационе. Повышение уровня белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) наблюдают при высококонцентратном типе кормления, заболеваниях печени (гепатиты, дистрофия), желудочно-кишечного тракта.

Проба Хартмана на макроглобулины

Принцип. В дистиллированной воде патологические белки – макроглобулины – образуют молочно-белый преципитат.

Ход анализа. В пробирку налить 3 мл дистиллированной воды, предварительно прокипяченной, для удаления CO_2 . В пробирку внести 0,09 мл исследуемой сыворотки. Помутнение раствора свидетельствует о наличии в крови макроглобулинов.

Задание:

1. Определить процент белка в сыворотке крови коровы, кролика, овцы, козы, сделать вывод.
2. Определить наличие макроглобулинов в сыворотке крови разных животных, по результатам сделать вывод.

Работа 13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЭ (РЕАКЦИИ СКОРОСТИ ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ)

В крови, предохраненной от свертывания, при стоянии в сосуде происходит оседание эритроцитов, которые опускаются на дно сосуда, а над ними отстаивается слой плазмы. Скорость оседания эритроцитов можно определить микрометодом Панченкова и по методу Неводова.

1. Метод Панченкова

Прибор Панченкова состоит из нескольких стеклянных капилляров, диаметром 1 мм, и деревянного штатива. Капиллярные пипетки градуированы от 0 до 100 мм по 1 мм. На них имеется на уровне 100 метка «К» и на уровне 50 – метка «Р».

Ход анализа. Капилляр промывают 5 %-м раствором лимоннокислого натрия, наполняют его этим раствором до метки «Р» и выпускают раствор на часовое стекло.

Затем дважды до метки «К» набирают кровь, каждый раз смешивая, отношение лимоннокислого натрия к крови на часовом стекле

составляет 1:4. Кровь из часового стекла набирают в пипетку до метки «К» (100) и ставят в штатив. Проверяют СОЭ через 15, 30, 45, 60 мин. Результаты учитывают через ч/мм.

По Паченкову СОЭ составляет в норме за ч (мм): у лошади – 64; коровы – 0,70; овцы – 0,6; свиньи – 8,0; собак – 2,5; кошки – 7–9; кролика – 1,5; курицы – 4,0; человека – 4–12.

2. Метод Неводова

Эритроседиометр Неводова представляет собой градуированную пробирку (диаметр 9 мм, объем 10 мл, высота 17 см) с делением от 0 (верхняя метка) до 100.

Ход опыта. В эритроседиометр наливают 2 мл 4 %-го раствора лимоннокислого натрия. Из яремной вены животного (лошадь) набирают кровь до метки «0». Закрывают пробирку резиновой пробкой, осторожно перемешивают, ставят в штатив.

Отмечают уровень оседания эритроцитов каждые 15 мин в течение 1 ч.

Примечание: для занятий можно кровь взять у животных заблаговременно, разбавив ее 4 %-м раствором цитрата натрия. Кровь можно хранить при комнатной температуре 5–6 ч.

Ряд исследователей установили, что скорость СОЭ можно ускорить, если капиллярные трубки устанавливать не вертикально, а под углом 45–60°, СОЭ ускоряется в 5–6 раз.

Данный способ удобен для исследования крови животных, свиней и птицы.

Задание. Определить СОЭ у кролика, коровы, козы, овцы и птиц, по результатам сделать вывод.

Контрольные вопросы к работам № 10–13

1. Реакция крови, буферные системы.
2. Определение кислого буфера крови.
3. Определение щелочного буфера крови.
4. Щелочной резерв крови и метод его определения.
5. Общий белок и его фракции.
6. Знание макроглобулинов и метод определения.
7. СОЭ – механизму этой реакции, величины СОЭ для сельскохозяйственных животных.
8. Методы определения СОЭ.

Работа 14. ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ ГЕМОЛИЗА И РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Гемолиз – это выход гемоглобина в плазму (раствор), вызванный повреждением (разрывом или растворением) оболочки эритроцитов. Гемолиз может быть вызван воздействием различных факторов: механических, термических, химических, осмотических, биологических (гемолизинов).

Резистентность (устойчивость) эритроцитов – это их способность противостоять различным разрушительным воздействиям. Обычно исследуют резистентность эритроцитов по отношению к гипотоническому раствору хлористого натрия, т. е. их осмотическую устойчивость. В нормальных условиях эритроциты выдерживают снижение концентрации NaCl в пределах 0,60–0,40 % не гемолизуясь. Эти пределы получили название – широта резистентности.

Она зависит от вида животных и времени года. Наименьшая резистентность у овец, коз и свиней, наибольшая – у птиц и рыб. В летний период резистентность повышается.

Наблюдение гемолиза

Материал и оборудование: кровь с добавлением любого антикоагулянта; дистиллированная вода; спирт; эфир; хлороформ; 0,04 %-й нашатырный спирт; 0,1, 0,9, 1,5 %-е растворы натрия хлорида; 1 и 10 %-й раствор хлорида кальция; пробирки; пипетки.

Цель работы: изучить влияние различных веществ на проницаемость оболочки эритроцитов и гемолиз.

Ход работы. Нумеруют 10 пробирок, ставят в штатив и заполняют протокол опыта.

Во все пробирки добавляют по 0,25 мл стабилизированной крови или взвеси эритроцитов, тщательно перемешивают содержимое и ставят в штатив на 10–15 мин. В пробирках, где произошел гемолиз, будет маленький осадок из разрушенных эритроцитов, а над осадком жидкость приобретет розовый цвет. Если гемолиз не произойдет, надосадочная жидкость останется бесцветной.

В протоколе отмечают, в каких пробирках произошел гемолиз и объясняют его причину (осмотический, химический).

*Гемолиз эритроцитов под воздействием различных факторов
(схема опыта)*

№ п\п	Растворы, по 5 мл в каждую пробирку	Кровь	Учет реакции	
			наличие (+) или отсутствие (-) гемолиза	Причины гемолиза
1	Дистиллированная вода	0,25 мл		
2	Спирт	0,25 мл		
3	Эфир	0,25 мл		
4	Хлороформ	0,25 мл		
5	0,04 %-й нашатырный спирт	0,25 мл		
6	0,1 %-й раствор натрия хлорида	0,25 мл		
7	0,9 %-й раствор натрия хлорида	0,25 мл		
8	1,5 %-й раствор натрия хлорида	0,25 мл		
9	1 %-й раствор кальция хлорида	0,25 мл		
10	10 %-й раствор кальция хлорида	0,25 мл		

Осмотическая резистентность эритроцитов

Материал и оборудование: кровь с добавлением любого антикоагулянта; 1 %-й раствор натрия хлорида; дистиллированная вода; штатив с пробирками; пипетки.

Цель работы: определить, при каких концентрациях натрия хлорида начинается и заканчивается разрушение эритроцитов (гемолиз), т. е. установить ширину их резистентности.

Ход работы. Приготавливают растворы натрия хлорида различной концентрации из 1 %-го раствора по схеме.

*Определение широты резистентности эритроцитов
(схема опыта)*

Содержимое пробирки	Номер пробирки						
	9	7	5	4	3	2	1
NaCl 1 %-й р-р	9	7	5	4	3	2	1
Дистиллированная вода, мл	1	3	5	6	7	8	9
Всего, мл	10	10	10	10	10	10	10
Концент. NaCl %	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Результат	Нет гемолиза			Частичный гемолиз	Полный гемолиз	Полный гемолиз	Полный гемолиз

В каждую пробирку вносят по 5 капель дефибринированной крови (0,25 мл) или взвеси эритроцитов, перемешивают и ставят на 10 мин. Проверяют результат.

Минимальная резистентность эритроцитов соответствует концентрации NaCl, в которой происходит частичный гемолиз. Та концентрация хлорида натрия, при которой разрушились все эритроциты, обозначается как максимальная резистентность эритроцитов.

Ширину резистентности эритроцитов записывают в протоколе опыта.

Задание:

1. Определить гемолиз под влиянием различных факторов.
2. Определить резистентность эритроцитов коровы и птицы, по результатам сделать вывод.

Работа 15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ГЕМОГЛОБИНА

Количество гемоглобина в крови определяют колориметрическим методом, гемометрами Сали и Флейшли, спектральным методом, электрофотоколориметрическим.

1. Определение количества гемоглобина гемометром Сали

Гемометр Сали состоит из трех пробирок, помещенных в штативе, задняя стенка которого сделана из стекла молочного цвета. Одна из пробирок (средняя) пустая, градуированная, предназначена для исследования крови.

Две другие (боковые) запаяны и наполнены стандартным раствором солянокислого гематина (1 %-й раствор нормальной крови,

обработанной соляной кислотой). К гемометру приложена капиллярная пипетка емкостью (до метки) в 20 мм^3 . В гемометрах новой модификации вместо стандартного раствора в пробирках используют стандарты из невыцветающего стекла. В гемометре Влейшля для сравнения раствора крови применяется стеклянный клин рубинового цвета.

Ход анализа. В градуированную пробирку гемометра наливают пипеткой 0,1 н. раствор HCl (0,2 мл) до нижней метки. В капиллярную пипетку, прилагаемую к прибору, насасывают кровь до метки 0,02 мл, опускают ее на дно пробирки в раствор соляной кислоты и выдувают кровь. Не вынимая пипетки из пробирки, несколько раз промывают ее верхней частью раствора. После этого содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин в штативе для полного гемолиза эритроцитов. Гемоглобин, вступая в реакцию с соляной кислотой, образует солянокислый гематин, который имеет коричневую окраску. Через 5 мин в пробирку по каплям, при постоянном помешивании стеклянной палочкой, добавляют дистиллированную воду до тех пор, пока цвет жидкости не совпадет с цветом стандартного раствора в пробирках. По нижнему мениску жидкости в градуированной пробирке определяют количество гемоглобина в г% (ед. Сали), т. е. количество граммов гемоглобина в 100 мл крови. Чтобы перевести эту единицу измерения в Международную систему (СИ), надо найденное количество гемоглобина умножить на 10, тогда получится количество гемоглобина в 1 л крови (г/л).

За идеальную норму принимают концентрацию гемоглобина в крови, равную 16,67 г%, или 166,7 г/л.

2. В последнее время для определения содержания гемоглобина используется *гемиглобинцианидный метод*. Для этого предварительно готовят рабочий и стандартный растворы. Для рабочего раствора берут натрия гидрокарбоната – 1 г, ацетонциангидрина – 0,5 мл, калия железосинеродистого – 0,2 г и растворяют в 1 л дистиллированной воды. Стандартный раствор готовят из набора реактивов завода «Реагент» или фирмы «Реанал». Согласно международному эталону, в растворе из этих реактивов содержится 59,75 мг% гемоглобинцианида, что соответствует 15 г% гемоглобина при разведении исследуемой крови в 251 раз.

Пипеткой отмеривают 5 мл рабочего раствора и вносят его в чистую пробирку. После этого у животного берут 0,02 мл крови в капилляр, кончик его вытирают ватой, опускают в пробирку с раство-

ром и осторожно выдувают кровь на дно. Не вынимая капилляра из пробирки, несколько раз промывают его верхним слоем раствора. Содержимое смешивают и получают разведение крови в 251 раз. Пробирку с жидкостью оставляют на 15 мин в штативе для полного перехода гемоглобина в гемиглобинцианид. После этого содержимое из пробирки выливают в кювету с толщиной слоя 10 мм, ставят ее в гнездо прибора ФЭК-М и фотометрируют при длине волны 540–560 нм с зеленым светофильтром. Измерение пробы надо проводить против контроля, т. е. рабочего раствора без крови, налитого в такую же кювету, что и исследуемая проба. Затем фотометрируют стандартный раствор при тех же условиях, что и пробу. Расчет количества гемоглобина проводят по формуле

$$Нб = (Еп/Ес) 15,$$

где Нб – количество гемоглобина, г%;

Еп – показатель экстинкции пробы крови;

Ес – показатель экстинкции стандартного раствора.

Если необходимо содержание гемоглобина в г% перевести в единицы СИ – г/л, то полученный результат в г% умножить на коэффициент 10,0.

Гемоглобин определяют также с помощью автоматического прибора «Культер», который показывает количество его в граммах на 100 мл на специальном табло или записывает результат на бланке.

В настоящее время в ветеринарных и медицинских лабораториях для определения гемоглобина используют прибор «Гемоанализатор».

Задание: определить количество гемоглобина в крови кролика, коровы, козы, овцы, птицы и других животных, провести пересчет на абсолютные цифры, дать сравнительный анализ с физиологическими нормами содержания гемоглобина у сельскохозяйственных животных. В норме содержание гемоглобина, г/л, составляет: у лошади – 80–140; коровы – 90–120; овцы – 70–110; свиньи – 90–110; кролика – 100–125; курицы – 80–120; козы – 90–115; собаки – 110–170.

Работа 16. ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛОВ ГЕМИНА

При обработке крови раствором соляной кислоты гемоглобин крови расщепляется на белок – глобин и небелковую группу – гем.

Гем вступает в соединение с соляной кислотой и образует солянокислый гемин, который в присутствии поваренной соли легко кристаллизуется. Кристаллы гемина имеют характерную форму – ромбических табличек и палочек темно-коричневого цвета. Получение кристаллов гемина является реакцией на гемоглобин.

Проба Тейхмана используется для установления наличия крови.

Ход анализа. На предметное стекло наносят каплю крови, прибавляют ничтожное количество поваренной соли, растолченной в порошок, слегка подсушивают стекло и прибавляют 1–2 капли ледяной уксусной кислоты.

Затем предметное стекло накрывают покровным и нагревают на пламени, избегая закипания. После охлаждения и рассматривают под микроскопом. Кристаллы гемина в форме вытянутых ромбических пластинок могут располагаться поодиночке или попарно, или звездобразно.

Исследование кровяных пятен. Сухую кровь соскабливают скальпелем (со стекла, материи, дерева и т. д.) и тщательно растирают с поваренной солью. Порошок переносят на предметное стекло, смачивают ледяной уксусной кислотой, накрывают покровным стеклом.

Далее поступают так же, как со свежей кровью.

Работа 17. ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛОВ ГЕМОГЛОБИНА

Гемоглобин крови различных животных образует кристаллы различной формы. Получить их можно несколькими способами.

1. 1 мл дефибринированной крови наливают в пробирку и охлаждают до 0°, затем прибавляют 0,1 мл эфира и 0,1 мл дистиллированной воды и оставляют на льду до следующего дня.

2. Помещают каплю крови на предметное стекло, покрывают его канадским бальзамом и прикрывают покровным стеклом, через некоторое время образуются кристаллы гемоглобина.

Гемоглобин различных животных кристаллизуется с различной скоростью. Быстрее всего из крови морской свинки, белых мышей, труднее всего из крови сельскохозяйственных животных. Кристаллы у большинства животных ромбической формы.

Задание. Определить кристаллы гемоглобина у сельскохозяйственных животных и получить кристаллы гемина кролика, коровы, козы, птицы, по результатам сделать вывод.

Контрольные вопросы к работам № 13–16

1. Гемолиз и его причины.
2. Резистентность эритроцитов.
3. Гемоглобин, его строение и механизм образования.
4. Методы определения гемоглобина.
5. Значение определения кристаллов гемина и гемоглобина.
6. Методы получения кристаллов гемина и гемоглобина.

Работа 18. ПОДСЧЕТ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ

Общие правила техники подсчета форменных элементов крови в камере Горяева

Для подсчета форменных элементов крови используют несколько методов: фотометрический, с помощью электронных кондуктометрических счетчиков частиц. Наиболее удобным методом в лабораторных условиях является метод подсчета в камере Горяева. Для подсчета форменных элементов соблюдают и выполняют такие правила:

1. Получение крови (см. работу 1).
2. Разбавление крови.

Для подсчета количества эритроцитов кровь можно разбавить двумя способами.

Первый способ – в специальных смесителях (меланжер). Кровь набирают до метки «0,5», а разбавитель (0,9–2,0 %-й раствор NaCl) до метки «101» – степень разбавления будет 1:200, т. е. в 200 раз. Меланжер зажимают и, встряхивая 1–2 минуты, смешивают кровь с жидкостью в его ампулообразном расширении.

Второй способ разбавления – в пробирках. Наливают 4,0 мл разбавителя и добавляют 20 мм³ крови, которые отмеряют капилляром от гемометра. Осторожно, закрыв пробирку, смешивают.

Разбавление крови для подсчета лейкоцитов проводится также двумя методами.

В меланжер для лейкоцитов набирают кровь до метки или 0,5, или 1, разбавитель (жидкость Тюрка: 1–2 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл 1 %-го водного раствора генцианвиолета или краски Романовского-Гимза на 100 мл дистиллированной воды), до метки «11». В первом случае степень разбавления будет 20, во втором – 10.

Пробирочный метод: наливают 0,4 мл разбавителя и добавляют 20 мм³ крови.

При подсчете тромбоцитов в камере Горяева в смеситель (меланжер) для эритроцитов набирают кровь до метки 0,5, разбавитель до метки «101», степень разбавления 1:200, разбавитель: 3,8 г лимоннокислого натра, 0,57 г HCl и 0,15 г метиленовой сини, растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Если пользоваться пробирочным методом, он соответствует определению эритроцитов.

3. Подготовка камеры Горяева.

Камера Горяева представлена отшлифованным стеклом, на котором нанесены четыре поперечных борозды, в результате на поверхности выделяются три поперечные полосы, на средней полосе нанесены две сетки. Между ними продольная бороздка. Сетка имеет 225 квадратов разной рассеченности: на 16 маленьких, продольную, поперечную и нерассеченные.

Общая площадь сетки равна 9 мм². Сторона маленького квадрата – 120 мм, площадь квадрата 1/400 мм², объем – 1/400 мм³.

Перед работой камеру тщательно промывают водой, обрабатывают спиртом, эфиром, просушивают и притирают к поверхности боковых поперечных полос отшлифованное покровное стекло до появления радужных колец. Чтобы стекло притереть, его прижимают к поверхности камеры двумя большими пальцами так, чтобы не касаться поверхности против сетки, и передвигают покровное стекло вверх, вниз.

4. Заполнение камеры.

Разбавленную кровь перемешивают и насасывают в пипетку от гемометра, затем осторожно каплю подводят к краю покровного стекла между сеткой. В силу капиллярности кровь заполняет сетку, лишняя – стекает в бороздки. Камеру можно заполнять одновременно для подсчета эритроцитов и лейкоцитов, так как есть две сетки.

После подсчета камеру и покровное стекло тщательно промывают, высушивают (хорошо протирая).

Подсчет количества эритроцитов

Материал и оборудование: стабилизированная кровь (кровь взятая от животного с антикоагулянтом); 1–2 %-й раствор натрия хлорида; микроскоп; камера Горяева; покровные стекла; пробирки; спирт; эфир.

Цель работы: освоить методику и произвести подсчет эритроцитов в крови.

Ход работы. Вначале готовят счетную камеру, пробирки и растворы. Счетную камеру Горяева кладут на столик микроскопа и под малым увеличением с затемненным полем зрения находят сетку и внимательно ее изучают. Сетка камеры имеет 225 (15 x 15) больших квадратов, причем 25 из них разделены поперечными и продольными линиями на 16 маленьких квадратов в каждом. Сторона маленького квадрата равна 1/20 мм, площадь его составляет 1/400 мм², а объем камеры над квадратом равен 1/4000 мм³ (1/400·1/10°). После просмотра камеру снимают со столика микроскопа, моют, протирают спиртом, затем эфиром. Сверху в участке нанесенной сетки к камере притирают стекло до появления радужных колец.

С помощью пипетки точно насасывают 4 мл 1–2 %-го раствора натрия хлорида и вносят его в чистую сухую пробирку. Затем берут капиллярную пипетку, входящую в комплект гемометра, насасывают в нее 0,02 мл исследуемой крови, вытирают кончик пипетки, осторожно выдувают кровь в раствор на дно пробирки. Хорошо промывают пипетку, насасывая и выдувая верхнюю часть раствора в пробирке 2–3 раза. Жидкость равномерно смешивают, при этом кровь будет разведена 1:200. Из этой пробирки с помощью стеклянной палочки или пипетки берут 1–2 капли жидкости, вносят ее в счетную камеру Горяева под притертое покровное стекло и приступают к подсчету.

Эритроциты подсчитывают при увеличении x15–x40 в 5 больших квадратах (80 маленьких), рассеченных на 16 маленьких. Эти квадраты выбирают по диагонали или по углам сетки и один посередине.

Считают эритроциты, находящиеся внутри квадратика, а также на верхней и левой пограничных линиях. Эритроциты подсчитываются в каждом маленьком квадратике по схеме слева направо (1 ряд), справа налево (2) и т. д.

Вычисление количества эритроцитов, млн/мкл, производится по формуле

$$X = \frac{A \cdot 4\,000 \cdot 200}{80} = A \cdot 10\,000,$$

где X – количество эритроцитов в мм³ (или мкл) крови;

A – количество эритроцитов в 5 больших квадратах;

200 – степень разбавления;

80 – количество маленьких квадратиков в 5 больших;

4 000 – принимается во внимание, что объем над одним малым квадратом составляет $1/4\ 000\ \text{мм}^3$.

Для упрощения пересчета можно воспользоваться более упрощенной формулой – $A \times 10\ 000$.

Задание. Определить количество эритроцитов у кролика, коровы, козы, птицы, по результатам сделать вывод.

Подсчет количества лейкоцитов

Материал и оборудование. Стабилизированная кровь, жидкость Тюрка (3 %-й раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиленовым синим), камера Горяева, микроскоп.

Цель работы: освоить методику и произвести подсчет количества лейкоцитов в крови.

Ход работы. Набирают в пробирку 0,4 мл жидкости Тюрка. Микропипеткой набирают 0,02 мл крови, вытирают ее кончик ватой и вносят кровь в пробирку с разбавителем. Не вынимая микропипетки из пробирки, промывают ее несколько раз верхней частью раствора. Содержимое пробирки хорошо смешивают и получают разбавление крови в 20 раз. Пробирку закрывают пробкой и оставляют на 4 мин, при этом встряхивают.

Из этой пробирки с помощью пипетки берут 1–2 капли жидкости и вносят в счетную камеру Горяева.

Лейкоциты считают в камере Горяева под малым увеличением микроскопа в 100 больших нерасчерченных квадратах, которые в сетке можно выбирать по двум схемам: 6 рядов подряд (90 квадратиков) и 10 квадратов выборочно по сетке или 25 расположенных по 4 нерасчерченных. Расчет общего количества лейкоцитов, тыс/мкл, проводят по формуле

$$X = \frac{A \cdot 4000 \cdot 20}{1600},$$

где X – количество лейкоцитов в 1 мкл крови;

A – количество лейкоцитов в 100 больших квадратах;

4 000 – множитель перевода к объему в 1 мкл крови;

20 – степень разведения крови;

1 600 – количество маленьких квадратов в 100 больших нерасчерченных квадратах.

Задание: определить количество лейкоцитов у кролика, коровы, козы, птицы, по результатам сделать вывод.

Подсчет количества тромбоцитов

Материал и оборудование: стабилизированная кровь, разбавитель для крови (к 100 мл дистиллированной воды добавляют 3,8 г натрия цитрата; 0,57 г натрия хлорида; 0,15 г метиленовой сини. Раствор кипятят, охлаждают и фильтруют. Затем в него вносят 2–3 капли крепкого формалина, и раствор готов к употреблению), камера Горяева, микроскоп.

Цель работы: ознакомиться с методикой и подсчитать количество тромбоцитов.

Ход работы. В пробирку налить 4 мл разбавителя тромбоцитов и внести туда 0,02 мл крови микропипеткой из гемометра, т. е. разбавить кровь в 200 раз. Жидкость в пробирке хорошо смешивают и оставляют на 10–15 мин в покое для окрашивания тромбоцитов метиленовой синью, входящей в состав раствора. После этого содержимое пробирки смешивают повторно, первые 2–3 капли удаляют на вату, а следующую вносят в счетную камеру Горяева под притертое покровное стекло. Камеру помещают на столик микроскопа и под большим (малым) увеличением считают кровяные пластинки в 25 больших квадратах, каждый из которых расчерчен на 16 маленьких квадратов. После подсчета определяют их количество в тысячах в 1 мкл крови, тр/мм³ (или тр/л), пользуясь следующей формулой:

$$X = \frac{H \cdot 200 \cdot 400}{25 \cdot 16},$$

или при среднем увеличении (х 15–х 40) определяют по формуле, тыс/мкл (или тыс/мм³),

$$X = \frac{H \cdot 4\,000 \cdot 200}{400},$$

или количество тромбоцитов в 25 больших квадратах умножают на 2 000,

где H – количество тромбоцитов, подсчитанных во всех 25 больших квадратах или (25 · 16 = 400) маленьких квадратах. Другие цифры формулы имеют аналогичное значение, как и при определении количества эритроцитов и лейкоцитов.

Подсчет тромбоцитов в мазке крови

Подсчет тромбоцитов в мазке производят на 1 000 эритроцитов. Для этого выбирают вначале мазка поле зрения при увеличении $\times 15$ – $\times 90$, подсчитывают общее количество эритроцитов (например 90) и определяют в среднем, сколько нужно взять таких полей зрений ($1000 : 90 = 11$). В каждом поле зрения подсчитывают тромбоциты, рассчитывают на количество эритроцитов в мкл (мм^3), например, на 100 эрит – 60 тромбоцитов, на 4 000 000 – X.

$$X = \frac{4\,000\,000 \cdot 60}{1000} = 240000 \text{ мкл.}$$

Задание: определить количество тромбоцитов у кролика, коровы, козы, птицы, по результатам сделать вывод.

Работа 19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦВЕТНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ КРОВИ

В эритроцитах содержится не всегда одинаковое количество гемоглобина, что отражается на дыхательной функции крови. Для оценки степени насыщения эритроцитов гемоглобином используется цветной показатель, т. е. соотношение между количеством гемоглобина и числом эритроцитов. При определении этого показателя можно брать содержание гемоглобина в единицах гемометра (по Сали) или в грамм-процентах ($\text{г}^0\%$), в единицах СИ, коэффициент перевода – 10 (г/л).

Под индексами красной крови понимают среднее содержание гемоглобина в одном эритроците или цветной показатель. В норме цветной показатель равен 1. Если он меньше 1, содержание гемоглобина в эритроцитах понижено (гипохромия), если больше 1 – повышено (гиперхромия)

Цель работы: определить цветной показатель крови при разных условиях у разных видов животных (корова, лошадь, овца, коза, кролик).

Ход работы. Для определения цветного показателя необходимо знать содержание гемоглобина и эритроцитов в крови опытного животного и их количество в среднем (норма) по данному виду животных. При наличии этих сведений цветной показатель (ЦП) вычисляют по формуле

$$\text{ЦП} = \frac{\text{Hb}_1 \cdot \text{Э}_2}{\text{Э}_1 \cdot \text{Hb}_2},$$

где Hb_1 – найденное количество гемоглобина у опытного животного;
 Э_1 – найденное количество эритроцитов у опытного животного;
 Hb_2 – количество гемоглобина в среднем у данного вида животных (норма);
 Э_2 – количество эритроцитов в среднем у данного вида животных (норма).

При таком подсчете цветной показатель в норме близок к единице.

Для определения цветного показателя у животных предлагается простой расчет:

$$\text{ЦП} = \frac{\text{Hb}}{\text{Э}} .$$

В этом случае делят количество гемоглобина в единицах Сали на число эритроцитов.

Задание: определить цветной показатель (ЦП) крови у кролика, коровы, козы, птицы, по результатам сделать вывод.

Контрольные вопросы к работам № 17–19

1. Общие правила подсчета форменных элементов в камере Горяева.
2. Подсчет эритроцитов и их функции.
3. Подсчет лейкоцитов, их виды и функции.
4. Подсчет тромбоцитов и их функции.
5. Определение цветного показателя.

Работа 20. ВЫВЕДЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ (ЛЕЙКОГРАММЫ)

Лейкоцитарная формула – это процентное соотношение различных форм лейкоцитов: зернистые (базофилы, эозинофилы, нейтрофилы: юные, палочкоядерные и сегментоядерные) незернистые (моноциты, лимфоциты и для пушных зверей – тельца Тюрка), определенных в мазке крови под микроскопом с иммерсионной системой.

При описании лейкоцитарной формулы пользуются буквенными обозначениями: Б – базофилы, Э – эозинофилы, Ю – юные нейтрофилы, П – палочкоядерные нейтрофилы, С – сегментоядерные нейтрофилы, М – миелоциты, Л – лимфоциты, Мон – моноциты.

Для выведения лейкоцитарной формулы готовят тонкий мазок крови на предметном стекле, обрабатывают его фиксатором и окрашивают смесью щелочной и кислой красок.

Приготовление мазка. Тщательно вымытым и обезжиренным предметным стеклом недалеко от края прикасаются к капле крови (или наносят небольшую каплю пипеткой). Мазок делают шлифованным стеклом, поставив его к капле крови под углом 45° перед каплей крови.

Подведя стекло к капле, ждут, пока кровь расплывается вдоль его ребра, затем быстрым легким движением проводят шлифованное стекло вперед, не отрывая от предметного стекла раньше, чем иссякнет вся капля.

Правильно приготовленный мазок имеет желтоватый цвет (тонкий), не достигает краев стекла на 1,5–2 мм и заканчивается в виде следа (усов). Мазок высушивают, желательно на открытом воздухе. В начале мазка тонкой иголочкой (по мазку) отмечают: вид животного, кличку, дату приготовления мазка.

Фиксация мазка: 3–5 мин в метиловом спирте или 20–15 мин в смеси спирта с эфиром 1:1. Зафиксированный, слегка подсушенный мазок помещают на стеклянные палочки, положенные над кюветом и наливают краситель по Романовскому-Гимза или по Пеппенгейму. Продолжительность окрашивания 30 мин. После окрашивания тщательно в течение 1–2 мин промывают дистиллированной или водопроводной водой, после чего высушивают.

Материал и оборудование: окрашенные мазки крови; микроскоп с осветителем; 11 – клавишный счетчик для выведения лейкограммы; иммерсионное масло.

Цель работы: ознакомиться с морфологическими особенностями лейкоцитов и вывести лейкоцитарную формулу.

Ход работы. При работе с мазками крови крупного или мелкого рогатого скота лейкоцитарную формулу выводят двупольным методом. Для этого наносят 2 капли иммерсионного масла на края мазка, отступая на 1–1,5 см от его начала и конца. Опускают иммерсионный объектив (90-кратный) в каплю масла, затем последовательно с помощью микровинта и макровинта устанавливают резкость. Перемещают мазок по столику микроскопа до противоположного края мазка и отмечают все лейкоциты, которые окажутся в поле зрения. Капля иммерсионного масла будет тянуться полосой за объективом.

Затем просмотреть 3–4 поля зрения вправо, вдоль края мазка и вести препарат к первоначальному краю, параллельно 1-й линии просмотра. Дойдя до края, снова просматривают вправо 3–4 поля зрения и ведут мазок к противоположному краю или по всему мазку слева направо. Определяют вид каждого лейкоцита и отмечают каждую клетку на 11-клавишном счетчике, нажимая соответствующий клавиш или заносят в таблицу. Подсчитав в сумме 50 клеток, переводят объектив в другую каплю масла и продолжают просматривать мазок таким же образом, но уже на другой его части. Когда будет найдено 100 лейкоцитов, на счетчике раздастся сигнал (звонок). В окошечках счетчика против каждого вида лейкоцитов будет видно их количество в 100 лейкоцитах, т. е. процентное содержание (лейкограмма). Если вы насчитаете (для большей точности) не 100, а 200 лейкоцитов (в сумме), то, чтобы вычислить лейкограмму, надо количество каждого вида лейкоцитов разделить на 2, тогда получится их содержание в процентах.

Если мазки приготовлены из крови лошади, свиньи или собаки, лейкоцитарную формулу выводят четырехпольным методом. Для этого наносят 4 капли иммерсионного масла на разные стороны мазка, и из каждой капли считают по 25 лейкоцитов, причем в глубину просматривают не дальше, чем на 3–4 поля зрения.

При дифференцировке лейкоцитов обращают внимание на размер и форму клеток, ядер, структуру и форму ядер, окраску и наличие зернистости в цитоплазме.

*Морфологические особенности лейкоцитов
крупного рогатого скота*

Вид лейкоцита	Размер клетки, мкм	Форма ядра	Цитоплазма	
			окраска	зернистость
Базофилы	11–17	Неопределенная полиморфная	Розовая или бледно-фиолетовая	Круглые, темно-фиолетовые или вымытые, в виде вакуолей. Матовые
Эозинофилы	9–22	Округлая или вытянутая или сегментированная	Голубая	Круглые, ярко-красные, блестящие
Миелоциты	9–14	Круглая, неравномерно окрашена	Бледная (голубая или розовая)	Точечные, розовая
Юные нейтрофилы	9–14	Бобовидная или колбасовидная, неравномерно окрашена	Розовая	Мелкая, розовая
Палочкоядерные нейтрофилы	9–14	Вытянутая в виде изогнутой палочки	Розовая	Мелкая, розовая, плохо видна
Сегментоядерные нейтрофилы	9–14	2–5 сегментов	Розовая	Мелкая, розовая, пылевидная, плохо видна
Лимфоциты	6–19	Круглая или с бухтообразным углублением	Голубая, есть просветленная перинуклеарная зона	Встречается редко, ярко-красного цвета
Моноциты	12–24	Полиморфное (в форме подковы, бабочки с лопастями)	Голубовато-серая, дымчатая. Нет просветленной перинуклеарной зоны	Встречается редко, пылевидная, вблизи ядра

Лейкоцитарную формулу выражают не только в процентах, но и в форме абсолютного содержания каждого вида лейкоцитов в 1 мкл крови. Для этого надо знать общее количество лейкоцитов в крови и процентное содержание каждого вида. Например, в 1 мкл крови жи-

вотного имеется 5 500 лейкоцитов. В мазке крови этого же животного выведена следующая лейкоцитарная формула: базофилы – 1 %, эозинофилы – 5, палочкоядерные нейтрофилы – 5, сегментоядерные нейтрофилы – 30, лимфоциты – 57, моноциты – 2 %. Следовательно, в 1 мкл крови содержится: базофилов – $5500 \cdot 1 \% = 55$; эозинофилов; $550 \cdot 5 \% = 275$, палочкоядерных нейтрофилов: $5500 \cdot 30 \% = 1650$ и т. д.

Вид лейкоцитов	Содержание лейкоцитов	
	Количество	%
Базофилы	2	2
Эозинофилы	5	5
Нейтрофилы	–	–
Юные	2	2
Палочкоядерные	11	11
Сегментоядерные	29	29
Лимфоциты	44	44
Моноциты	7	7
Всего	100	100

Общее количество лейкоцитов должно быть минимальным в количестве 100 или 200. Для более точного определения иногда определяют 400 лейкоцитов. Для каждого вида животных в возрастном аспекте установлены нормы лейкоцитарной формулы.

Лейкоформула различных видов животных, %

Вид животного	Б	Э	Нейтрофилы			Л	Мон
			Ю	П	С		
Слон	0–2 ₁₀	6–15	–	22–50	–	40–60	0–6
Лошадь	0–1	2–6	0–0,5	3–6	45–62	25–44	2–4
Верблюд	0–1	6–16	–	21–56	–	25–65	0–12
КРС	0–2	5–6	0–1	2–5	20–35	40–65	2–7
Буйвол	1,0	5,0	–	36	–	51	8
Осел	0–11	2–4	–	2–6	–	18–33	0–6
Свиньи	0–1	1–4	0–2	4–6	40–48	40–80	2–6
Овцы	0–3	4–13	0–2	3–6	35–45	40–60	2–5
Козы	1	5,3	–	4,3	37–50	32–68	2–6
Собаки	0–1	2–9	–	1–6	45–71	21–40	1–6
Кошки	0–1	2–8	0,1–1	3–8	40–49	36–61	1–8
Кролик	0–4	1–6	–	5–8	35–39	40–62	1–3
Куры	1–3	6–10	–	24–30	–	52–60	4–10
Обезьяны	0–2	1–6	–	1–4	40–60	37–68	1–6

Задание: вывести лейкоцитарную формулу у одного из видов животных, сравнить с табличными данными и сделать вывод.

Работа 21. ФАГОЦИТОЗ

Фагоцитоз – это способность клеток белой крови захватывать различные вещества. Фагоцитарную активность можно проследить как внутри организма (*in vivo*), так и вне его (*in vitro*).

In vivo определяют на лягушках, которым за сутки до исследования вводят тушь в спинной лимфатический мешок.

В ответ на это появляется реакция, сопровождающаяся накоплением в лимфе лейкоцитов с фагоцитированными частицами краски. Перед опытом лягушку умерщвляют. Берут каплю лимфы из лимфатического мешка, наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, и наблюдают лейкоциты, заполненные краской.

В практике широко применяют метод Н.В. Пучкова. В пробирку помещают 0,1 мл 2 %-го раствора лимоннокислого натрия, 0,4 мл крови и 0,1 мл суспензии однородных зернышек кармина или взвеси микробных тел. Смесь в пробирке взбалтывают 5 минут и ставят в термостат на 30 мин при 37 °С. После этого делают мазки крови, фиксируют и красят по Романовскому.

Фагоцитарную активность оценивают по количеству фагоцитированных нейтрофильных лейкоцитов из 100 подсчитанных (экстенсивность фагоцитоза) к среднему количеству зерен краски или микробов, находящихся в каждом нейтрофиле (фагоцитарный показатель). Кроме этого учитывают фагоцитарное число – количество микробов в 100 нейтрофилах.

Определение уровня естественной резистентности

Способность вырабатывать естественные адаптивные реакции определяет жизнеспособность в окружающей среде.

Характеризуется эта способность совокупной деятельностью ряда неспецифических клеточных и гуморальных факторов.

Клеточное звено естественного иммунитета обеспечивается фагоцитозом.

Гуморальный фактор – комплемент, лизоцим и бета-лизин сыворотки крови – основан не на реакции антиген-антитело. Явление

неспецифического иммунитета связано с более общими физиологическими категориями гомеостаза и резистентности.

Неспецифические клеточные и гуморальные факторы очень чувствительны к изменению внутренней среды под воздействием внешних факторов. Клеточное звено, фагоцитоз и его стадии:

1) стадия сближения фагоцитов с объектом: начало, конец (аттракция);

2) стадия захвата объекта и образования в фагоцитах – это стадия погашения вакуолей;

3) заключительная стадия – фагоцитоз, или стадия переваривания.

Характеризуется тремя показателями:

1. Фагоцитарная активность.

2. Фагоцитарное число

3. Показатель завершенности.

1. Фагоцитарная активность (ФА) – это процент клеток (нейтрофилов), участвующих в поглощении через 30 мин после инкубации.

2. Фагоцитарное число (ФЧ) – это среднее число фагоцитированных клеток микробов, приходящихся на 1 нейтрофил.

3. Завершенность – показатель завершенного фагоцитоза (ПЗФ). Характеризуется процентом фагоцитов, содержащих частично или полностью разрушенные микробные клетки через 1 ч инкубации. Определяют все эти показатели по мазкам.

Гуморальное звено

1. Комплемент – сложный белковый комплекс глобулиновой природы. Вырабатывается в печени и ретикулогистоцитарной системе: усиливает фагоцитоз, реакции агглютинации, преципитации, лизис микробов.

Комплементарная активность характеризуется способностью лизировать эритроциты барана, выражается в процентах к плотности полного гемолиза эритроцитов. Определяют на ФЭК, чем больше процент, тем выше активность: норки – 39–25; песец 9–10 %.

2. Лизоцим – белковой природы. Относится к числу гидролитических ферментов, растворяет полисахариды микробных клеток.

Лизоцим содержится во всех жидкостях, тканях, кроме пота, мочи и спинномозговой жидкости.

Активность лизоцима определяют по разности плотности (оптической) культуры и плотности пробы, после добавления сыворотки. Микробная взвесь лизируется под действием лизоцима сыворотки и величина светопропускаемости увеличивается, например: $28-20 = 8\%$. Эту величину выражают в процентах. Норма составляет колебания: от 5 до 6 % или от 8 до 9 %, у норок выше – 8–10 %, песцов 5–6 %.

Бета-лизины – сложные белки. Они образуются в гипоталамусе и концентрируются в основном в тромбоцитах. Активность бета-лизинов выражается в процентах оптической плотности: культуры и культура + сыворотка (как и лизоцим).

Работа 22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

С целью определения группы крови кровь смешивают со стандартной сывороткой. На чистое предметное стекло наносят двумя разными пипетками стандартные сыворотки 2-й и 3-й групп, (предварительно на оборотной стороне стекла отмечают восковым карандашом номер группы сыворотки).

Прокалывают палец и выступившую кровь (небольшое количество, в 10 раз меньше капли сыворотки) переносят палочкой в сыворотку 2-й группы, другой палочкой переносят в сыворотку 3-й группы. Смешивают кровь с сывороткой легким покачиванием стекла. Спустя 3–4 минуты после смешивания определяют результаты.

Отсутствие агглютинации в обеих пробах означает, что исследуемая кровь относится к 1-й группе; при агглютинации с сывороткой 3-й группы – исследуемая кровь 2-й группы; при агглютинации с сывороткой 2-й группы – кровь 3-й группы, кровь 4-й группы агглютинирует с сыворотками 2-й и 3-й групп.

В основе учения о группах крови лежат внутривидовые биологические различия крови человека и животных, в наличии у разных индивидуумов специфических белков агглютиногенов (на поверхности эритроцитов) и агглютининов (в плазме).

Имеются два вида агглютиногенов (А и В) и соответственно два вида агглютининов (α и β). В зависимости от их наличия или отсутствия кровь человека относится к одной из четырех групп:

Агглютинирующие белки	Группы крови			
	1 (0)	2 (А)	3 (В)	4 (АВ)
Агглютиногены в эритроцитах	Нет	А	В	АВ
Агглютинины в плазме	α, β	β	α	Нет

В пределах каждой группы одноименные агглютиногены и агглютинины не встречаются, поэтому эритроциты не агглютинируются. При определении групп крови на предметном стекле проявляется картина агглютинации (склеивание эритроцитов в виде зерновых).

Задание: определить группу крови у нескольких студентов с помощью стандартной сыворотки (цоликлонов), по результатам сделать вывод.

Применение цоликлонов анти-А, анти-В и анти-АВ диагностических жидких для определения групп крови человека системы АВО (антитела моноклональные анти-А, анти-В, анти-АВ)

1. Цоликлоны анти-А, анти-В и анти-АВ предназначены для определения групп крови человека системы АВО в прямых реакциях гемагглютинации и применяются взамен или параллельно с поликлональными иммунными сыворотками.

2. Характеристика и основные свойства цоликлонов анти-А, анти-В и анти-АВ.

Моноклональные анти-А и анти-В антитела продуцируются двумя мышинными гибридами и принадлежат к иммуноглобулинам класса М. Цоликлоны изготавливаются из асцитной жидкости мышей-носителей анти-А и анти-В гибридом. Цоликлон анти-АВ представляет собой смесь моноклональных анти-А и анти-В антител. Технология изготовления реагента исключает возможность его контаминации патогенными для человека вирусами.

3. Техника определения групп крови человека системы АВО с помощью цоликлонов.

Определение производится в нативной крови взятой в консервант: в крови, взятой без консерванта, в том числе взятой из пальца. Используется метод прямой гемагглютинации на плоскости: и на пластине или планшете. Определение группы крови производится в помещении с хорошим освещением при температуре 15–20 °С.

3.1. Наносят на планшет или пластину индивидуальными пипетками цоликлоны анти-А, анти-В и анти-АВ по одной большой капле (0,1 мл) под соответствующими надписями.

3.2. Рядом с каплями антител наносят по одной маленькой капле исследуемой крови (0,01–0,03 мл).

3.3. Смешивают кровь с реагентом.

3.4. Наблюдение за ходом реакции с цоликлонами производится визуально при легком покачивании пластины или планшета в течение трех минут.

Агглютинация эритроцитов с цоликлонами обычно наступает в первые 3–6 с, но наблюдение следует вести три минуты ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов А или В.

3.5. Результат реакции в каждой капле может быть положительным или отрицательным. Положительный результат выражается в агглютинации (склеивании) эритроцитов. Агглютинины видны невооруженным глазом в виде мелких красных агрегатов, быстро сливающихся в крупные хлопья. При отрицательной реакции капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинаты в ней не обнаруживаются.

3.6. Интерпретация результатов реакции агглютинации исследуемой крови с цоликлонами представлена в таблице.

Результат реакции с цоликлоном			Исследуемая кровь, принадлежит к группе
анти-А	анти-В	анти-АВ	
-	-	-	О (I)
+	-	+	А (II)
-	+	+	В (III)
+	+	+	АВ(IV)

Примечание: знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (-) – отсутствие агглютинации.

Окончательно АВО принадлежность устанавливается только по результатам перекрестного определения: антигенов А и В на эритроцитах и изогемагглютининов в сыворотке.

Задание: определить группу крови у нескольких студентов с помощью цоликлона анти-А и анти-В, по результатам сделать вывод.

Работа 23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОВМЕСТИМОСТИ КРОВИ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

У сельскохозяйственных животных определение групп крови связано с определенными сложностями, так как не всегда имеются в наличии нужные сыворотки, а для крупного рогатого скота – большое количество сывороток (более 80). Поэтому для переливания крови у сельскохозяйственных животных целесообразно проводить определение совместимости группы крови – реципиента и донора. Получают сыворотку от реципиента и смешивают ее поочередно с кровью нескольких доноров. Где нет агглютинации – кровь совместима.

Задание: определить совместимость крови донора и реципиента кролика и собаки, по результатам сделать вывод.

Работа 24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУС-ФАКТОРА

Резус-фактор (три его разновидности) содержится в эритроцитах у большинства (86 %) людей независимо от агглютиногенов А и В. Такие люди называются резус-положительными. У 14 % людей резус-фактор в эритроцитах отсутствует – резус-отрицательные.

Для определения наличия резус-фактора используют сыворотки, содержащие антирезус-агглютинины.

Они изготавливаются для всех четырех групп крови системы АВО.

Метод определения резус-фактора в пробирках

Кровь в количестве 0,5–1 мл помещают в пробирки с 0,25 мл 4–5 %-го раствора цитрата натрия. Кровь центрифугируют. После удаления плазмы эритроциты отмывают в физиологическом растворе. В специальную маленькую пробирку вводят 2 капли антирезусной сыворотки соответствующей группы АВО и 1 каплю 2%-й взвеси эритроцитов. Содержимое пробирки перемешивают и ставят в штатив на 1 ч при температуре 20–37 °С. Результат определяют по форме осадка. Кровь резус-отрицательная, если осадок равномерный и границы его представляют собой правильный круг. При наличии в эритроцитах резус-фактора края осадка неровны, видны шероховатость, губчатость или зернистость структуры.

Применение цоликлона анти-Д диагностического жидкого для определения Д-антигена системы резус (антитела моноклональные анти-Д)

Цоликлон анти-Д предназначен для выявления Д-антигена системы резус в эритроцитах человека и применяется в серологических тестах взамен или параллельно с изоиммунной анти-Д сывороткой.

Характеристика и основные свойства цоликлона анти-Д

Действующим началом цоликлона анти-Д являются моноклональные анти-Д антитела, продуцируемые лимфобластоидной линией клеток человека, полученной из лимфоцитов донора, гипериммунного против Д-антигена. Антитела, продуцируемые клетками одного клона, являются моноклональными, принадлежат к одному классу иммуноглобулинов, полностью идентичны по структуре и биологической активности.

Техника определения Д-антигена системы резус

Определение Д-антигена производится в нативной крови, стабилизированной с помощью применяемых консервантов; в крови, взятой без консерванта; в крови, взятой из пальца. Наиболее четкая реакция агглютинации наблюдается при использовании высокой концентрации эритроцитов. Заключение о присутствии Д-антигена в исследуемых эритроцитах делают по наличию положительной реакции агглютинации.

Задание: определить резус-фактор крови у нескольких студентов с помощью цоликлона анти-Д, по результатам сделать вывод.

Контрольные вопросы к работам № 20–24

1. Методика выведения лейкоцитарной формулы.
2. Виды лейкоцитов и их характеристика.
3. Фагоцитоз и его фазы.
4. Метод определения фагоцитоза.
5. Общая характеристика групп крови человека и животных.
6. Метод определения групп крови и совместимости крови.
7. Резус-фактор и метод его определения.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Основные физиологические константы крови животных (нормы)

Показатель	Вид животного							
	Лошадь	Корова	Овца	Свинья	Курица	Кролик	Коза	Собака
Количество крови к массе тела, %	8–10	7,5–8,2	7–9	4,5–6,5	6,5	65,5–6,5	7	8,5
Гемоглобин, г%	8–14	9–12	7–11	9–11	8–12	10–12,5	9–11,5	11–17
Единицы СИ, г/л	80–140	90–120	70–110	90–110	80–120	100–125	90–115	110–170
Эритроциты, лн/мм ³	6–9	5–7,5	7–12	6–7,5	3–4	5–7,5	9–12	5,2–8,4
Единицы СИ, эр/л	6– 9·10 ^{12/л}	5–7,5·10 ^{12/л}	7–12·10 ^{12/л}	6–7,5·10 ^{12/л}	3–4·10 ^{12/л}	5–7,5·10 ^{12/л}	9–12·10 ^{12/л}	5,2– 8,4·10 ^{12/л}
Лейкоциты, тыс/мм ³	7–12	4,5–12	6–14	8–16	20–40	5,9–9	11–12	8,5–10,5
Единицы СИ, лейк/л	7– 12·10 ^{9/л}	4,5–12·10 ^{9/л}	6–14·10 ^{9/л}	8–16·10 ^{9/л}	20–40·10 ^{9/л}	5,9–9·10 ^{9/л}	11– 12·10 ^{9/л}	8,5– 10,5·10 ^{9/л}
Тромбоциты, тр/мм ³	200–500	260–700	270–500	180–300	32–100	190	210–360	250–550
Единицы СИ, тр/л	200– 500·10 ^{9/л}	260– 270·10 ^{9/л}	270– 500·10 ^{9/л}	180–300·10 ^{9/л}	32– 100·10 ^{9/л}	190·10 ^{9/л}	210– 360·10 ^{9/л}	250– 550·10 ^{9/л}
pH крови	7,3–7,5	7,2–7,45	7,46–7,52	7,44–7,47	7,40–7,44	7,4	7,45	7,32–7,60
СОЭ, мм, через:								
15 мин	35	0,15	0,2	1,0	0,5	0	0,1	0,2
30 мин	54	0,35	0,4	3,0	2,0	0,3	0,2	0,9
45 мин	58	0,50	0,0	5,0	3,5	0,9	0,3	1,7
60 мин	64	0,70	0,6	8,0	4,0	1,5	0,5	2,5

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Лысов, В.Ф. Основы физиологии и этологии животных / В.Ф. Лысов, В.И. Максимов. – М.: Колос, 2004. – 248 с.
2. Лысов, В.Ф. Этология животных: учеб. пособие для вузов / В.Ф. Лысов, Т.Е. Костина, В.И. Максимов. – М.: КолосС, 2010. – 296 с.
3. Практикум по физиологии и этологии животных / В.Ф. Лысов, Т.В. Ипполитова, В.И. Максимов [и др.]. – М.: КолосС, 2005. – 256 с.
4. Практикум по физиологии и этологии животных / В.Ф. Лысов, Т.В. Ипполитова, В.И. Максимов [и др.]. – М.: КолосС, 2010. – 303 с.
5. Смолин, С.Г. Физиология животных: учеб. пособие / С.Г. Смолин; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2013. – 520 с.
6. Физиология и этология животных: учеб. пособие для вузов / В.Ф. Лысов, Т.В. Ипполитова, В.И. Максимов [и др.]. – М.: КолосС, 2012. – 605 с.
7. Физиология животных и этология: учеб. пособие для вузов / В.Г. Скопичев [и др.]. – М.: Колос, 2004. – 720 с.

Дополнительная

1. Алиев, А.А. Новейшие оперативные методы исследования жвачных животных / А.А. Алиев. – М.: Агропромиздат, 1985. – 147 с.
2. Битюков, И.П. Практикум по физиологии сельскохозяйственных животных / И.П. Битюков, В.Ф. Лысов, Н.А. Сафонов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 256 с.
3. Георгиевский, В.И. Практическое руководство по физиологии сельскохозяйственных животных: учеб. пособие / В.И. Георгиевский. – М.: Высш. шк., 1976. – 352 с.
4. Георгиевский, В.И. Физиология сельскохозяйственных животных / В.И. Георгиевский. – Агропромиздат, 1990. – 511 с.
5. Клиническая диагностика внутренних болезней сельскохозяйственных животных / В.И. Зайцев [и др.]. – М.: Колос, 1971.

6. Козловская, Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования / Л.В. Козловская, А.Ю. Николаев. – М.: Медицина, 1984.
7. Коробков, А.В. Практикум по физиологии сельскохозяйственных животных / А.В. Коробков, С.А. Чесноков. – М.: Высш. шк., 1986.
8. Костин, А.П. Физиология сельскохозяйственных животных / А.П. Костин, Ф.А. Мещеряков, А.А. Сысоев. – М.: Колос, 1983. – 479 с.
9. Кудряшов, Б.А. Практикум по физиологии сельскохозяйственных животных / Б.А. Кудряшов. – М.: Высш. шк., 1984.
10. Смолин, С.Г. Физико-химические показатели и активность ферментов сока поджелудочной железы у кур, свиней и собак / С.Г. Смолин. – Красноярск, 2008. – 154 с.
11. Смолин, С.Г. Физиология животных / С.Г. Смолин. – Красноярск, 2013. – 520 с.
12. Смолин, С.Г. Химический состав панкреатического сока у кур, свиней и собак / С.Г. Смолин. – Красноярск, 2004. – 96 с.
13. Сысоев, А.А. Практикум по физиологии сельскохозяйственных животных / А.А. Сысоев, И.П. Битюков. – М.: Колос, 1981. – 239 с.
14. Сысоев, А.А. Физиология сельскохозяйственных животных / А.А. Сысоев. – М.: Колос, 1980. – 148 с.
15. Физиология сельскохозяйственных животных / под ред. А.Н. Голикова. – 3-е изд. – М.: Агропромиздат, 1991. – 432 с.
16. Физиология сельскохозяйственных животных / под ред. А.Н. Голикова, Г.В. Паршутина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1980. – 480 с.
17. Физиология сельскохозяйственных животных: руководство по физиологии / под ред. Н.А. Шманенкова, А.А. Алиева. – Л.: Наука, 1978. – 744 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Работа 1. Получение крови у сельскохозяйственных животных.....	4
Работа 2. Получение сыворотки.....	9
Работа 3. Получение дефибринированной крови.....	9
Работа 4. Получение лейкоконцентрата (метод Емешинной).....	10
Работа 5. Определение ретракции крови.....	10
Работа 6. Определение скорости свертывания крови.....	10
Работа 7. Определение гематокритного показателя.....	11
Работа 8. Определение удельного веса крови (плотности крови).....	12
Работа 9. Определение вязкости крови.....	14
Работа 10. Определение буферных свойств сыворотки крови.....	16
Работа 11. Определение щелочного резерва (Щ Р) по Неводову....	17
Работа 12. Определение общего белка в сыворотке крови.....	18
Работа 13. Определение СОЭ (реакции скорости оседания эритроцитов).....	20
Работа 14. Изучение явления гемолиза и резистентности эритроцитов.....	22
Работа 15. Определение количества гемоглобина.....	24
Работа 16. Получение кристаллов гемина.....	26
Работа 17. Получение кристаллов гемоглобина.....	27
Работа 18. Подсчет форменных элементов крови.....	28
Работа 19. Определение цветного показателя крови.....	33
Работа 20. Выведение лейкоцитарной формулы (лейкограммы)....	35
Работа 21. Фагоцитоз.....	39
Работа 22. Определение групп крови человека.....	41
Работа 23. Определение совместимости крови у сельскохозяйственных животных.....	44
Работа 24. Определение резус-фактора.....	44
Приложение.....	46
Литература.....	47

ФИЗИОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

Методические указания

Смолин Сергей Григорьевич

Редактор О.Ю. Потапова

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать 24.06.2014. Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. 3,5. Тираж 110 экз. Заказ №

Издательство Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117