

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**УЧЕРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»**

КАФЕДРА НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ПОДСЧЕТ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ У КУР

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

ВИТЕБСК- 2002

Авторы: Гусаков В.К., доктор биологических наук, профессор;
Кудрявцева Е.Н., ассистент;
Островский А.В., ассистент.

Рецензенты: Карпуть И.М., доктор ветеринарных наук,
профессор, член-корреспондент ААН РБ;
Курдеко А.П., кандидат ветеринарных наук,
доцент.

Учебно-методическое пособие

Рассмотрено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией факультета ветеринарной медицины Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины, протокол № 5 от 30 мая 2001 г.

Разрешено к печати редакционно-издательским Советом Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины, протокол № _11_ от 14 июня 2002 г.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Взятие крови у кур	3
2. Эритроциты	4
2.1. Подсчет количества эритроцитов в камере Горяева	4
2.2. Подсчет количества эритроцитов колориметрическим способом	5
3. Лейкоциты	5
3.1. Подсчет количества лейкоцитов в камере Горяева	6
4. Тромбоциты	6
4.1. Подсчет количества тромбоцитов в камере Горяева	7
5. Приготовление мазков крови	8
6. Выведение лейкограммы	11

Кровь птиц является тканью организма и состоит из жидкой части – плазмы, и взвешенных в ней форменных элементов – эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Кровь различных видов птиц имеет свои особенности, но в данном учебно-методическом пособии рассматривается подсчет форменных элементов крови у кур.

1. Взятие крови у кур

Цель опыта. Ознакомиться с техникой взятия крови у кур.

Для работы необходимо: курица, ватные тампоны, 70 % этиловый спирт, стерильные иглы, пробирки, противосвертывающее средство (р-р гепарина 2,0-2,5 ЕД/мл, 5 % р-р лимоннокислого натрия, трилон Б).

Ход работы. Перед взятием крови курица фиксируется двумя руками за крылья и конечности, или завертывается в полотенце. Если требуется несколько капель крови (подсчет количества форменных элементов, приготовление мазков, определение гемоглобина, СОЭ и др. исследований) у кур кровь берут из гребня, сережек или из подкрыльцовой вены. Подкрыльцовая вена расположена с внутренней стороны крыла и идет вдоль плечевой кости. Она хорошо заметна, так как является самым крупным сосудом в этой области (рис. 1). Место взятия крови, ближе к локтевому суставу, очищают от мелких перьев и пуха. Перед взятием крови вену протирают ватным тампоном, смоченным этиловым спиртом. Ввиду высокой свертываемости крови место прокола протирают противосвертывающей жидкостью и собирают нужное количество крови в пробирку, в которую предварительно вносят любой из выше перечисленных антикоагулянтов. После взятия крови вену зажимают ватным тампоном 1-3 минуты. Если крови требуется несколько миллилитров, то ее у птиц берут из левого желудочка сердца. Прокол делают слева в V – образной вырезке грудной кости с направлением иглы к плечевому суставу противоположной стороны.

Стабилизированная кровь в дальнейшем используется для морфологических исследований.

2. Эритроциты

Функции эритроцитов:

1. Перенос кислорода от легких к тканям.
2. Участие в транспорте углекислого газа от тканей к легким.
3. Транспортировка питательных веществ.

4. Участие в поддержании рН крови на относительно постоянном уровне.
5. Адсорбируют на своей поверхности яды и переносят к клеткам моноклеарной системы фагоцитов.

Эритроциты кур (рис. 3) имеют эллипсоидную форму двояковыпуклого диска с удлиненным, вытянутым по форме клетки ядром. Размеры эритроцитов составляют в среднем 11-12 мкм по длинной оси и 6-8 мкм по короткой. При окраске по Романовскому цитоплазма зрелых эритроцитов кур резко оксифильна (розового цвета), а ядро чрезвычайно богато хроматином, имеет очень плотную структуру и интенсивно окрашивается основными красителями в фиолетовый цвет. Количество эритроцитов у кур колеблется в пределах $3 - 4 \times 10^{12}/л$.

2.1. Подсчет количества эритроцитов в камере Горяева

Цель опыта. Отработать технику подсчета эритроцитов.

Для работы необходимо: курица или ее кровь, микроскопы, счетные камеры Горяева, покровные стекла, пробирки, пипетки на 5 мл и на 0,02 мл, 70 % этиловый спирт, вата, 0,9 % р-р натрия хлорида.

Ход работы. Для подсчета эритроцитов пипеткой отмеряют в пробирку 4,0 мл 0,9 % р-р натрия хлорида. В капилляр от гемометра Сали набирают кровь до отметки (0,02 мл). Обтирают кончик капилляра ваткой и опускают его в пробирку с 0,9 % р-ром хлорида натрия и медленно выдувают кровь. Этим же раствором промывают дважды капилляр. Пробирку закрывают пробкой и осторожно перемешивают и ставят в штатив на несколько минут. Камеру Горяева протирают спиртовым раствором и притирают к ней покровное стекло до появления радужных колец. В капилляр Сали набирают содержимое пробирки и заряжают камеру Горяева. Для этого первые 2-3 капли из капилляра удаляют на фильтровальную бумагу и заполняют счетную камеру, приложив капилляр с выступающей каплей к краю покровного стекла. Подсчет эритроцитов производят через 2-3 минуты, когда прекратится движение форменных элементов в камере. Под увеличением 10 x 40 находят сетку и подсчитывают число эритроцитов в 5 больших квадратах, расположенных по диагонали, каждый из которых разделен на 16 маленьких. Считают клетки, находящиеся внутри квадрата, а также на верхней и левой пограничных линиях.

Подсчет количества эритроцитов в 1 мкл крови ведут по формуле:

$$X = \frac{A \times 4000 \times p}{80}, \text{ где}$$

A – количество эритроцитов в 5 больших квадратах;

p – степень разведения крови (200);

$1/4000 \text{ мм}^3$ – объем одного маленького квадрата;

80 – количество маленьких квадратов.

Можно воспользоваться более простой формулой -

$$X = A \times 10000$$

Для того, чтобы найти количество эритроцитов в 1 л крови, необходимо полученный результат умножить на 10^6 .

Записать результаты подсчета.

2.2. Подсчет количества эритроцитов колориметрическим способом

Цель занятия. Овладеть методикой подсчета эритроцитов у кур.

Для работы необходимо: стабилизированная кровь, пробирки, ФЭК (КФК), 3 % р-р хлорида натрия (NaCl)

Ход работы. Стабилизированную кровь набраут в капилляр Сали (0,02 мл) и вносят в пробирку с 4 мл 3 % р-ра NaCl. Капилляр промывают этим же раствором дважды. Пробирки с содержимым встряхивают и оставляют в штативе на 30-40 минут. Определение количества эритроцитов производят на ФЭКе при красном светофилтре (длина волны 625-700 нм). В кювету на 3 мм^3 наливают исследуемый раствор и определяют его экстинкцию против 3 % р-ра NaCl. Результаты определяются по калибровочной таблице 1.

Записать выводы.

3. Лейкоциты

Лейкоциты, или белые кровяные тельца, играют большую роль в защитных и восстановительных процессах. Их главные функции:

1. Фагоцитоз.
2. Продукция антител.
3. Разрушение и удаление токсинов белкового происхождения.
4. Участие в иммунологических и аллергических реакциях.

Лейкоциты могут самостоятельно двигаться, проходить сквозь стенки капилляров, проникать в межклеточное пространство и возвращаться в кровь.

В крови лейкоцитов в 600-800 раз меньше, чем эритроцитов. У кур лейкоцитов содержится 20-40 тыс. в 1 мм³ или 20-40 x 10⁹/л. Продолжительность нахождения в кровяном русле разных видов лейкоцитов от нескольких минут до нескольких десятков лет (клетки иммунной памяти).

3.1. Подсчет количества лейкоцитов в камере Горяева

Цель опыта. Отработать технику подсчета лейкоцитов.

Для работы необходимо: курица или ее кровь, микроскопы, счетные камеры Горяева, покровные стекла, разбавитель (краска Романовского-Гимзы 10 мл, нейтральный формалин 5 мл, 0,85 % р-р хлорида натрия 85 мл), пробирки, пипетки на 5 мл и на 0,02 мл, 70 % этиловый спирт, вата.

Ход работы. Для подсчета лейкоцитов пипеткой отмеряют в пробирку 4,0 мл разбавителя (Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980). В капилляр от гемометра Сали набирают кровь до отметки (0,02 мл), обтерев кончик капилляра ваткой и, опустив его в разбавитель, кровь медленно выдувают и этим же раствором дважды промывают капилляр. Пробирку закрывают резиновой пробкой, и содержимое тщательно перемешивают. В капилляр Сали набирают содержимое пробирки и заряжают камеру. Подсчет лейкоцитов производится при увеличении в 280 раз во всех больших разграфленных на 16 маленьких квадратах. Лейкоциты определяют по форме и окраске.

Подсчет количества лейкоцитов в 1 мкл крови ведут по формуле:

$$X = \frac{A \times 4000 \times 200}{400}, \text{ где}$$

A- количество лейкоцитов, сосчитанных в 400 маленьких квадратах;

1/4000мм³ - объем одного маленького квадрата;

200- разведение крови;

400- количество маленьких квадратиков.

Можно воспользоваться более простой формулой -

$$X = A \times 2000$$

Записать результаты подсчета.

4. Тромбоциты

Функции тромбоцитов:

1. Участвуют в процессе свертывания крови, выделяя тромбоцитарные факторы.
2. Служат строительным материалом для первичного тромба.
3. Выделяют ретрактозимы, которые необходимы для уплотнения кровяного сгустка.
4. Выделяют тромбоцитарный фактор роста, который стимулирует деление клеток.
5. Укрепляют стенки кровеносных сосудов.
6. Переносят различные вещества (серотонин, АТФ, ферменты, гормоны и др.).
7. Обладают способностью к фагоцитозу.

Тромбоциты кур обычно немного меньше эритроцитов. Размеры их варьируют от 5,5 x 5,5 до 4,6 x 12,9 мкм. В отличие от эритроцитов форма клеток напоминает неправильный эллипс с небольшими выпячиваниями протоплазмы. Протоплазма окрашивается в нежный серовато-голубой цвет. В ней встречаются отдельно лежащие гранулы. Ядро тромбоцита может быть круглым, но чаще оно имеет форму неправильного овала. Располагается в центре клетки или несколько эксцентрично, окрашивается в розовато-фиолетовый цвет (рис. 3). Количество тромбоцитов у кур достигает $30-100 \times 10^9/\text{л}$.

4.1. Подсчет количества тромбоцитов в камере Горяева

Цель опыта. Отработать технику подсчета тромбоцитов.

Для работы необходимо: курица или ее кровь, микроскопы, счетные камеры Горяева, покровные стекла, разбавитель (краска Романовского-Гимзы 10 мл, нейтральный формалин 5 мл, 0,85 % р-р хлорида натрия 85 мл), пробирки, пипетки на 5 мл и на 0,02 мл, 70 % этиловый спирт, вата.

Ход работы: Количество тромбоцитов подсчитывают в камере Горяева. Для этого пипеткой отмеряют в пробирку 4,0 мл разбавителя. В капилляр от гемометра Сали набирают кровь до отметки (0,02 мл), обтерев кончик капилляра ваткой и, опустив его в разбавитель, кровь медленно выдувают и этим же раствором дважды промывают капилляр. Пробирку закрывают резиновой пробкой, и содержимое тщательно перемешивают. В капилляр Сали набирают содержимое пробирки и заряжают камеру. Подсчет тромбоцитов

производится при увеличении в 280 раз во всех больших разграфленных на 16 маленьких квадратах. Тромбоциты встречаются в виде скоплений по 5-10 клеток.

Подсчет количества тромбоцитов в 1 мкл крови ведут по формуле:

$$X = \frac{A \times 4000 \times 200}{400}, \text{ где}$$

A- количество тромбоцитов, сосчитанных в 400 маленьких квадратах;

$1/4000 \text{ мм}^3$ - объем одного маленького квадрата;

200- разведение крови;

400- количество маленьких квадратиков.

Можно воспользоваться более простой формулой -

$$X = A \times 2000$$

Записать результаты подсчета.

5. Приготовление мазков крови

Цель опыта. Знакомство с техникой приготовления мазков крови.

Для работы необходимо: кровь курицы, обезжиренные предметные и шлифовальные стекла, краска Лейшмана, 70 % этиловый спирт, вата, пинцет, пипетка на 10 мл, глазные пипетки, ванночки почкообразные, карандаш.

Ход работы. Мазки крови можно получить на чистых обезжиренных предметных стеклах. Для этого их моют в мыльной воде или с содой, складывают в стеклянные банки и заливают на 2-3 дня концентрированной серной кислотой (обезжиривают). Потом моют в водопроводной воде, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и помещают в банку, в которой находится смесь эфира и спирта (1:1).

В этом растворе приготовленные стекла могут храниться длительное время.

Перед использованием стекла извлекают из банки пинцетом, высушивают на воздухе или протирают чистым полотенцем.

Мазки легче готовить из свежей крови, но можно использовать стабилизированную кровь (кровь предохраненную от свертывания).

Предметное стекло обычно фиксируют в левой руке между большим и указательным пальцами, или кладут на ровную поверхность и наносят небольшую каплю крови глазной пипеткой на край стекла. Берут шлифовальное стекло и устанавливают его под углом $35-45^\circ$ по отношению к предметному и осторожно подводят к

капле крови. Когда капля крови равномерно распределится около нижнего ребра шлифовального стекла, его плавно и относительно быстро передвигают справа налево по предметному стеклу (рис. 2).

Хорошо приготовленный мазок должен быть ровным и тонким.

Мазок высушивают на воздухе (можно на подогретых предметах). На высушенном мазке (в его начале) пишут номер птицы и дату. Наиболее распространенным методом окраски мазков крови птицы является окраска по Лейшману. При этом нет необходимости фиксировать мазки. В 100 г химически чистого метилового спирта растворяют 0,5 – 1,0 г краски Лейшмана и склянку с ней ставят на сутки в термостат при $T\ 37^{\circ}\text{C}$. Через 24 часа краску охлаждают при комнатной температуре и осторожно сливают с осадка (фильтровать нельзя). Хранят краску в склянке из темного стекла. При окрашивании мазков крови краску наносят на нефиксированный мазок и распределяют по всей поверхности. Через 1-2 минуты к краске добавляют равное количество капель воды и докрашивают еще 2-7 минуты. Не сливая краски, мазок обильно промывают водой и высушивают.

Мазки крови птиц можно окрашивать так же по Май-Грюнвальду, по Романовскому и по Папенгейму.

Различные формы лейкоцитов и их функции.

В период постнатального развития в лейкограмме у кур происходят возрастные изменения. У новорожденных цыплят в крови преобладают зернистые лейкоциты, в основном псевдоэозинофилы - около 60%. У 1-3-дневных цыплят псевдоэозинофилы составляют 50-55%, но в это время появляется большое количество молодых клеток - миелоцитов. К 3-месячному возрасту кровь у цыплят принимает состав, характерный для крови взрослых кур.

Процентное соотношение различных форм лейкоцитов называется лейкограммой. По ней можно судить о состоянии организма.

Лейкоциты - белые кровяные клетки, имеют цитоплазму и ядро. Их подразделяют на две большие группы: зернистые (гранулоциты) и незернистые (агранулоциты).

Зернистые лейкоциты содержат в цитоплазме зернышки (гранулы). К ним относятся базофилы, эозинофилы и псевдоэозинофилы.

Незернистые (агранулоциты) лейкоциты делятся на лимфоциты и моноциты.

Базофилы - сравнительно крупные, округлые клетки, размером 12-14 мкм в диаметре. Их в крови содержится 1,0-3,0 %. Ядро округлое, овальное, палочковидное или сегментированное, просматривается плохо. Цитоплазма и гранулы окрашиваются в фиолетово-синий цвет.

Эти клетки выделяют вещества, угнетающие рост вирусов, содержат гепарин, активируют обмен веществ в соединительной ткани, участвуют в реакциях иммунитета.

Эозинофилы относятся к клеткам крупных размеров (10-14 мкм в диаметре), их в крови содержится от 6,0 до 10,0 %.

В зрелых клетках ядро лежит эксцентрично, состоит чаще всего из двух сегментов, соединенных тонкой перемычкой, бывают и палочкоядерные эозинофилы. Ядро окрашивается в красно-фиолетовый цвет. Цитоплазма клеток нежно голубого цвета, равномерно заполнена круглыми крупными гранулами красного цвета. Эозинофилы обезвреживают чужеродные белки и токсины, и поэтому часто встречаются в сосудах и тканях желудочно-кишечного тракта, а так же принимают участие в аллергических реакциях.

Псевдоэозинофилы - форма клеток наиболее часто встречающаяся среди зернистых лейкоцитов. Размер их небольшой - 4-9 мкм в диаметре. Ядро у псевдоэозинофилов окрашивается в фиолетово-красный цвет. Различают палочкоядерные и сегментоядерные псевдоэозинофилы. Зерна этих клеток представляют собой продолговатые веретенообразные с заостренными концами гранулами. Цитоплазма у птиц обычно бесцветная.

Псевдоэозинофилы - активные бактериальные фагоциты, как в кровяном русле, так и в тканях, могут нейтрализовать ядовитые вещества, попавшие в кровь, фагоцитировать мертвые ткани и разлагать чужеродные белки. У самцов их фагоцитарная активность в 2-4 раза выше, чем у самок (рис. 4).

Лимфоциты - самая распространенная форма лейкоцитов в крови птиц. У кур их количество колеблется от 52,0 до 60,0%. Известно три формы лимфоцитов: большие, средние и малые. Диаметр их колеблется от 5 до 13 мкм. Ядро округлое или овальное, расположено эксцентрично или в центре клетки.

Большой лимфоцит - юная форма, редко встречается в кровеносном русле. Это округлая клетка диаметром 11-13 мкм, с крупным, бледно окрашенным округлым или овальным, центрально-расположенным ядром, узким слоем базофильной цитоплазмы, в котором просматриваются хорошо развитые органеллы общего

значения. Ядро окрашивается в фиолетово-розовый цвет, цитоплазма голубого цвета.

Средний лимфоцит меньше юной формы 6-9 мкм в диаметре с более плотным ядром и более узким ободком цитоплазмы.

Малый лимфоцит - зрелая клетка диаметром 5-8 мкм, с еще более плотным хроматином в ядре, чем у среднего лимфоцита. Цитоплазма лишь в виде очень тонкого ободка покрывает ядро, часто на мазках может быть не видна вовсе.

Лимфоциты в кровяном русле находятся до 2-6 часов. Активно выходя в окружающие ткани, участвуют в реакциях специфического иммунитета, являются предшественниками антитело образующих клеток, носителями иммунологической памяти, участвуют в местных аллергических реакциях и реакциях отторжения.

Лимфоциты делятся на тимусзависимые Т-лимфоциты и бурсозависимыми В-лимфоциты. У птиц 60-65% составляют Т - и 30-35% В-клетки.

Моноциты - самые крупные клетки крови. Их у кур 4-10%. Ядро окрашивается в розово-фиолетовый цвет. Клетки диаметром 10-17 мкм, с крупным ядром овальной, почковидной или подковообразной формы. Цитоплазма серо-голубого или серовато-синего цвета, довольно обширная, нередко с псевдоподиями.

Моноциты в крови бывают короткое время. Функцию свою осуществляют в тканях, где их накапливается в 25 раз больше, чем в крови. Выходя в ткани, превращаются в истинные макрофаги, способные к амебоидному движению. Они фагоцитируют и переваривают бактерии, чужеродные белки, отжившие клетки и их обломки. В отличие от других клеток, зрелые моноциты способны делиться, особенно находясь в очаге воспаления (рис. 5).

Чтобы ознакомиться с различными формами лейкоцитов необходимо научиться приготавливать мазки крови и выводить лейкограмму.

6. Выведение лейкограммы

Цель опыта. Ознакомление с различными формами лейкоцитов и выведение лейкограммы

Для работы необходимо: микроскопы с препаратоводителями, приготовленные мазки крови, иммерсионное масло, счетчики лейкоцитарные, настольные лампы.

Ход работы. На тонкую часть мазка наносят каплю иммерсионного масла, опускают в нее объектив микроскопа (МИ-90) и находят лейкоциты. Для выведения лейкограммы мазок, с помощью препаратоводителя передвигают по линии Меандра.

Всего нужно определить 200 лейкоцитов. При изучении дифференциации клеток белой крови обращают внимание на величину лейкоцитов, окраску протоплазмы и ее зернистость, на форму и строение ядра клетки.

Полученные данные суммируют, делят на 2 и получают процентное соотношение различных форм лейкоцитов.

Результаты записывают в тетради.

Лейкограмма здоровых кур по И.А. Болотникову
и Ю.В. Соловьеву (1980)

Базо- филы	Эозино- филы	Псевдоэозинофилы		Лимфоциты	Моноциты
		с зернистой грануляцией	с палочковидной грануляцией		
<u>1,5-5,0</u> 3,2	<u>4,0-26,5</u> 15,2	<u>0 - 1,0</u> 0,5	<u>14,0-33,0</u> 23,5	<u>34,0-82,0</u> 58,0	<u>3,0-9,5</u> 6,0

Лейкограмма здоровых кур по А.А. Кудрявцеву.

Базо- филы	Эозино- филы	Псевдоэозинофилы		Лимфоциты	Моноциты
		палочко- ядерные	сегменто- ядерные		
<u>1,0-3,0</u> 2,0	<u>6,0-10,0</u> 8,0	<u>24,0 – 30,0</u> 27,0	-	<u>52,0-60,0</u> 56,0	<u>10,0-14,0</u> 7,0

Таблица 1

Таблица показателей фотоэлектрокалориметра в значении содержания эритроцитов в 1 л крови кур. (Эритроциты $\times 10^{12}/\text{л}$).

Экстинкция	Количество эритроцитов у кур ($\times 10^{12}/\text{л}$)
0,3	1,69
0,31	1,64
0,32	1,69
0,33	1,74
0,34	1,79
0,35	1,85
0,36	1,90
0,37	1,95
0,38	2,0
0,39	2,05
0,4	2,11
0,41	2,16
0,42	2,21
0,43	2,26
0,44	2,31
0,45	2,37
0,46	2,42
0,47	2,47
0,48	2,52
0,49	2,57
0,5	2,63
0,51	2,69
0,52	2,74
0,53	2,8
0,54	2,85
0,55	2,91
0,56	2,97
0,57	3,03
0,58	3,08
0,59	3,12
0,6	3,18
0,61	3,23
0,62	3,29
0,63	3,35
0,64	3,46
0,65	3,51
0,66	3,57
0,67	3,62
0,68	3,67
0,69	3,73
0,7	3,78

Литература

1. Болотников И.А., Соловьев Ю.В. Гематология птиц. - Л:Наука.,1980.
2. Георгиевский В.И. Практическое руководство по физиологии сельскохозяйственных животных. – М: Высшая школа., 1976. – 351 с.
3. Карпуть И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. – Мн: Ураджай., 1986. – 183 с., ил.
4. Практикум по физиологии сельскохозяйственных животных Учебн. пособие/ П.Н. Котуранов, В.К. Гусаков, Ю.И. Никитин и др.; Под ред. П.Н. Котуранова. – Мн.: Ураджай, 2000. – 280 с.

Подписано в печать «___»_____2002 г.

Тираж 100 экз. Заказ №_____

210602, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11

Отпечатано на ризографе Витебской ордена «Знак Почета»

государственной академии ветеринарной медицины

Лицензия ЛП «362 от 11.08.1999 г.