

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

С.И. Гуляева,
М.Ю. Мещерякова,
К.В. Демеш

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ

Учебно-методическое пособие

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета
2009

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел 1. Физиология крови.....	5
Часть 1. Эритроциты.....	5
Работа № 1. Определение количества эритроцитов (RBC)	5
Работа № 2. Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ)	8
Работа № 3. Определение гематокрита	10
Работа № 4. Определение среднего объема эритроцита (MCV)	11
Работа № 5. Осмотическая устойчивость (резистентность) эритроцитов	12
Работа № 6. Различные виды гемолиза.....	13
Часть 2. Гемоглобин	14
Работа № 7. Определение содержания гемоглобина.....	15
Работа № 8. Определение среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH).....	16
Работа № 9. Определение средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC)	17
Работа № 10. Цветовой показатель	18
Работа № 11. Приготовление кристаллов гемина	19
Работа № 12. Спектральный анализ гемоглобина	19
Часть 3. Ретикулоциты	20
Работа № 13. Определение количества ретикулоцитов в крови	20
Часть 4. Лейкоциты.....	21
Работа № 14. Определение количества лейкоцитов (WBC).....	22
Работа № 15. Определение лейкоцитарной формулы.....	24
Часть 5. Исследование системы гемостаза	29
Работа № 16. Подсчет тромбоцитов.....	33
Работа № 17. Ретракция сгустка крови.....	35
Работа № 18. Определение времени свертывания крови.....	36
Работа № 19. Определение активированного времени рекальцификации плазмы	36
Работа № 20. Определение протромбинового времени (протромбинового индекса)	37
Работа № 21. Определение тромбинового времени	38
Работа № 22. Определение продолжительности кровотечения	38
Работа № 23. Предотвращение свертывания крови.....	39
Часть 6. Механизмы поддержания кислотно-основного состояния	39
Работа № 24. Буферные свойства крови	41
Раздел 2. Физиология сенсорных систем	42
Часть 1. Зрительная сенсорная система	42
Работа № 25. Исследование реакции зрачка	43
Работа № 26. Расчет диаметра зрительного нерва.....	43

Ход работы

В пробирку налить 4 мл 3%-ного или 4 мл изотонического раствора натрия хлорида. Набрать в пипетку 0,02 мл крови и вылить ее в раствор хлорида натрия. Тщательно перемешать раствор и оставить на 5–10 мин.

Счетная камера представляет собой толстую стеклянную пластину (предметное стекло) с углублением в центре, равным 0,1 мм. На дне камеры нанесены 2 сетки Горяева, разграниченные поперечной канавкой. Сбоку от сеток расположены стеклянные прямоугольные пластины, к которым притирается шлифованное покровное стекло.

Каждая сетка Горяева состоит из 225 больших квадратов, 25 из которых разделены еще на 16 малых квадратов. Сторона большого квадрата равна 0,2 мм, сторона малого квадрата – в 4 раза меньше (0,05 мм). Соответственно, площадь большого квадрата составляет $0,04 \text{ мм}^2$ ($4 \cdot 10^{-2} \text{ мм}^2$), малого квадрата – $0,0025 \text{ мм}^2$ ($25 \cdot 10^{-4} \text{ мм}^2$). Если учитывать глубину камеры, равную 0,1 мм, то объем одного малого квадрата сетки Горяева составит $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ мкл}$.

Перед заполнением камеры взвесью крови в изотоническом растворе содержимое пробирки несколько раз встряхивают. Пипеткой набирают небольшой объем взвеси крови и выпускают 1–2 капли на фильтровальную бумагу. После этого подносят каплю разведенной крови к краю покровного стекла, следя за тем, чтобы кровь равномерно заполняла всю поверхность камеры с сеткой, не затекая в боковые бороздки. Если это случится, взвесь крови удаляют фильтровальной бумагой.

После заполнения камеры оставляют на 1–2 мин в горизонтальном положении для оседания эритроцитов.

Подсчет эритроцитов проводят при малом увеличении микроскопа (например объектив $\times 8$, окуляр $\times 10$) в несколько затемненном поле зрения (при закрытой диафрагме и опущенном конденсоре).

Эритроциты подсчитывают в 5 расположенных по диагонали сетки квадратах, разделенных на малые, т. е. в 80 малых квадратах. Для этого под микроскопом находят верхний левый квадрат сетки (разделенный на 16 малых) и подсчитывают число эритроцитов в нем. При этом целесообразно придерживаться определенной последовательности подсчета эритроцитов: передвигаться из одного малого квадрата в другой по горизонтали, например, один ряд справа налево, другой ряд слева направо и т. д. (рис. 1, а).

В каждом малом квадрате подсчитывают эритроциты, находящиеся внутри него, а также расположенные, например, на левой и верхней границе квадрата, пропуская эритроциты, лежащие на нижней и правой границе (рис. 1, б). Это позволяет добиться того, чтобы форменные элементы, расположенные на границе квадратов, не попали в счет дважды.

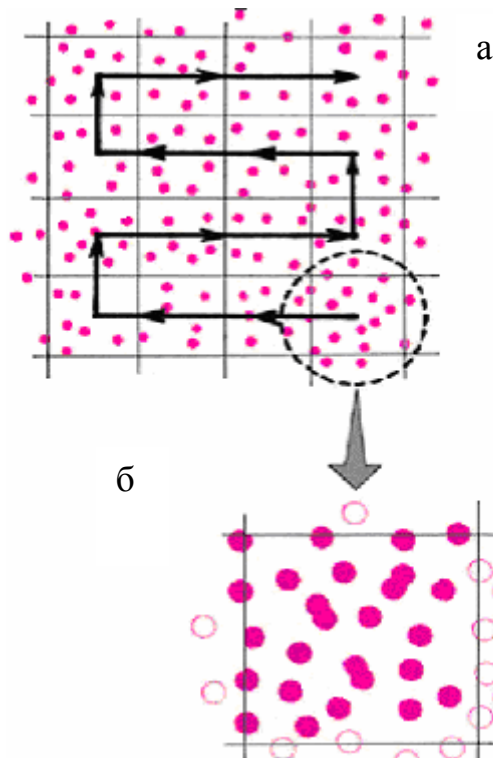


Рис. 1. Методика подсчета эритроцитов в больших (а) и малых (б) квадратах сетки Горяева

Определить количество эритроцитов в 1 мм^3 (мкл), пользуясь следующей формулой:

$$X = \frac{A \cdot 4000 \cdot 200}{80},$$

где X – искомое число эритроцитов в 1 мкл крови, A – сумма эритроцитов в 80 маленьких квадратах сетки Горяева, 4000 – число малых квадратов в 1 мм^3 , 200 – кратность разведения.

Подсчитать количество эритроцитов в 1 л крови. (1 л – 1000000 мкл). Допустим, в 1 мкл содержится 4000000 эритроцитов, в 1 л – X эритроцитов.

$$X = \frac{4000000 \cdot 1000000}{1} = 4 \cdot 10^{12} / \text{л}.$$

Интерпретация результатов

В норме количество эритроцитов у мужчин составляет $4,0 \cdot 10^{12} / \text{л}$ – $5,5 \cdot 10^{12} / \text{л}$, а у женщин – $3,5 \cdot 10^{12} / \text{л}$ – $5,0 \cdot 10^{12} / \text{л}$.

Снижение количества эритроцитов наиболее часто встречается в клинической практике и является одним из характерных признаков *анемий и острой кровопотери*. Следует помнить, однако, о возможности относительной эритроцитопении, связанной с увеличением объема плазмы (гидремия), за счет усиленного притока тканевой жидкости в период схождения сердечных или почечных отеков или при введении в кровяное русло боль-

ших количеств жидкости (внутривенные инфузии) и т. п. Дифференцирование этих двух состояний обычно не представляет больших трудностей для клинициста, если проводится тщательный анализ клинической картины заболевания.

Повышение количества эритроцитов (эритроцитоз) может быть обусловлено двумя причинами.

1. *Эритремия* (полицитемией, болезнью Вакеза) – заболевание, в основе которого лежит миелопролиферативный процесс в костном мозге. Заболевание относится к числу гемобластозов и обычно сопровождается пролиферацией других ростков кроветворения. В этих случаях выраженный эритроцитоз обычно сочетается с лейкоцитозом и тромбоцитозом.

2. *Вторичные симптоматические реактивные эритроцитозы*, которые могут быть абсолютными и относительными.

Вторичные абсолютные эритроцитозы обусловлены усилением нормального гемопоэза в костном мозге.

Вторичный относительный эритроцитоз возникает в связи с уменьшением объема плазмы при неизменном объеме циркулирующих эритроцитов. При этом уменьшается также общий объем циркулирующей крови.

РАБОТА № 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ОСЕДАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ (СОЭ)

Наиболее распространенным в нашей стране методом определения СОЭ является *микрометод Т.П. Панченкова*, основанный на свойстве эритроцитов оседать на дне сосуда под воздействием силы тяжести.

При стоянии стабилизированной крови эритроциты в силу тяжести оседают. При этом кровь делится на два слоя: верхний (бесцветный, прозрачный) – плазму и нижний (красный, непрозрачный) – эритроциты. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) сильно колеблется в зависимости от состояния организма.

Цель работы: ознакомиться с методикой определения скорости оседания эритроцитов.

Материалы и оборудование: прибор Панченкова, 5%-ный раствор лимоннокислого натрия, часовое стекло, кровь, вата.

Ход работы

Промыть пипетку аппарата Панченкова 5%-ным раствором лимоннокислого натрия, затем набрать в нее тот же раствор до метки «Р» и выпустить его на часовое стекло. Набрать кровь в пипетку до верхней метки «К», сразу же выдуть ее в лимоннокислый натрий и тщательно перемешать.

Набрать в пипетку смесь до метки «0», наклоня капилляр и закрывая пальцем противоположный его конец, установить капилляр строго вертикально в штатив. Смесь крови и цитрата при стоянии разделяется на два слоя: верхний – плазма и нижний – эритроциты.