

Н.І. БОЙКО, кандидат ветеринарних наук, доцент,
Ю.В. БОЙКО, аспірант*,
Р.В. КОХАНІЙ, студент ОКР "Магістр",
Р.П. МИКОЛАЙЧУК, студент ОКР "Магістр"
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Дослідження морфології клітин крові у курей

Наведено результати морфологічних досліджень крові у курей. Для успішного проведення морфологічних досліджень крові у птиці рекомендуємо використовувати результати наших досліджень та гематологічні атласи, де мазки клітин крові представлені у вигляді фотознімків [1].

Птиця, морфологія крові, еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, фотознімки мазків крові

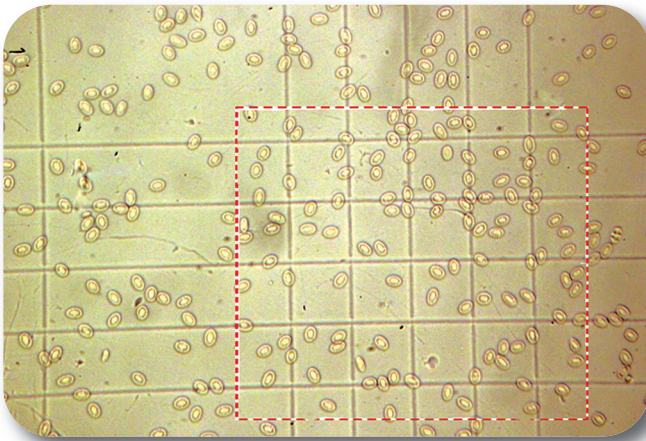


Рис. 1. Підрахунок клітин крові 14-добових курчат у лічильній камері з сіткою Горяєва. На фото зображений один з п'яти великих квадратів, розділений на 16 маленьких. Збільшення – окуляр 10 х об'єктив 100.

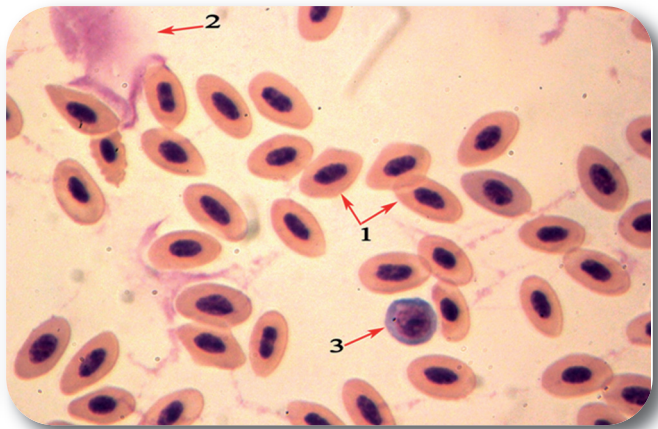


Рис. 3. Мазок крові 14-добового курчати: 1 – еритроцити оксифільні, 2 – "тіні" ядер, 3 – нормоцит (рубрицит). Зафарбування в модифікації Паппенгейма. Збільшення – окуляр 10 х об'єктив 100.

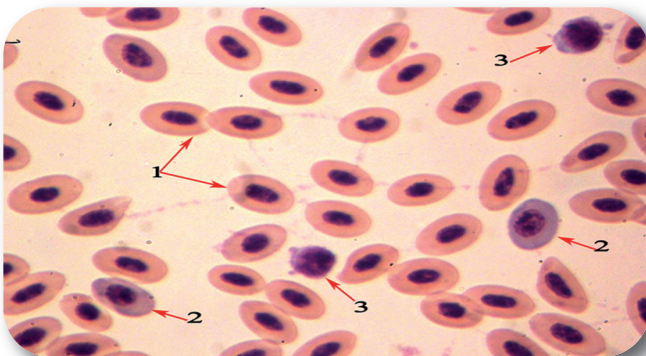


Рис. 2. Мазок крові 14-добового курчати: 1 – еритроцити оксифільні, 2 – еритроцити поліхроматофільні (з голубуватою цитоплазмою), 3 – малі лімфоцити (в них мала кількість цитоплазми з наявністю псевдоподій). Зафарбування в модифікації Паппенгейма. Збільшення – окуляр 10 х об'єктив 100.

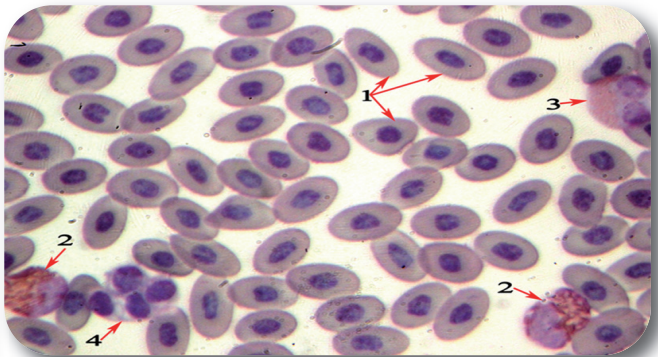


Рис. 4. Мазок крові курчати-бройлера. На мазку видно, що всі клітини крові птиці мають ядра: 1 – еритроцити, 2 – гетерофіли (добре видно червоно-коричневі гранули), 3 – еозинофіл, 4 – тромбоцити. Зафарбування в модифікації Паппенгейма. Збільшення – окуляр 10 х об'єктив 100.

Картина крові птиці різко відрізняється від картини крові ссавців. На відміну від ссавців кров у них містить три види справжніх клітин: еритроцити, лейкоцити і тромбоцити. Ядра в них зберігаються протягом життя клітини. Така велика кількість ядерних клітин призводить до утруднення морфологічного дослідження крові навіть у досвідчених гематологів. Дослідники, які щойно починають працювати з таким матеріалом, часто отримують помилкові результати. У вітчизняних літературних джерелах ми знайшли дуже мало якісного ілюстративного матеріалу, який можна використати при вивченні крові у птиці.

Тому **метою** нашої роботи було провести дослідження морфології клітин крові у курей.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили в умовах проблемної лабораторії кафедри терапії і клінічної діагностики “Внутрішні незаразні хвороби тварин” НУБіП України.

Матеріалом для досліджень була кров, відібрана від 10-и клінічно здорових курчат-бройлерів 14-добового віку, яких утримували в умовах віварію НУБіП України.

Методи досліджень: клінічні, морфологічні.

З клінічних методів було відпрацьовано методику відбору крові з плечової вени.

Відпрацьовали методику отримання стабілізованої крові, сироватки і плазми. Загальну кількість клітин (еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів) підраховували в лічильній камері з сіткою Горяєва. Кількість окремих видів клітин вираховували в мазку крові шляхом підрахунку 1000 клітин і поділом їх на еритроцити, лейкоцити і тромбоцити.

Під час підрахунку клітин крові та виведення лейкограми користувались мікроскопом ULAB. Для виведення зображень на екран монітора і фото фіксації використовували дзеркальний фотоапарат CANON EOS 550 D, перехідну камеру NDPL-1(2X) та спеціальну комп'ютерну програму Canon EOS Digital.

Результати досліджень. Підрахунок кількості клітин крові (еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів) у курей. У крові спочатку підраховують загальну кількість клітин (еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів) в одному мікролітрі, використовуючи методику підрахунку еритроцитів у ссавців [2, 3, 5]. Ми використовували пробірочний метод. У пробірку автоматичними дозаторами вносили 4 мл 3% розчину натрію хлориду, додавали 20 мікролітрів крові, обережно перемішували і заправляли камеру Горяєва. Клітини рахували в п'яти великих квадратах (розділених на 16 маленьких) по діагоналі (рис. 1).

Наприклад: при підрахунку у лічильній камері в першому квадраті було 72 клітини, другому – 74, третьому – 71, четвертому – 78, п'ятому – 74. Вираховуємо, що сума всіх клітин у 5 великих

квадратах (80 маленьких) становить 369 клітин.

Підставляємо результат в формулу

$$X = a \times 4000 \times 200 / 80,$$

де X – кількість клітин 1 мкл крові, а – сума підрахованих еритроцитів у 80 малих квадратах, 4000 – множник, що приводить результат до об'єму 1 мкл, так як об'єм малого квадрата дорівнює 1/4000 мкл; 200 – розведення крові. Після проведення арифметичних дій формула спрощується $X = a \times 10000$

Підставляємо дані у спрощену формулу $X = 369 \times 10000$ і встановлюємо, що в 1 мкл крові було 3690000 клітин (якщо в літрах – то буде 3,69 x 10¹² або 3,69 Т/л).

У зафарбованих мазках крові при великому збільшенні мікроскопа підраховують тисячу клітин з поділом їх на еритроцити, тромбоцити і лейкоцити; потім – кількість клітин окремих видів в 1 мкл крові.

У зафарбованому мазку нарахували: еритроцитів – 978 шт. (97,8%), лейкоцитів – 10 шт. (1,0%), тромбоцитів – 12 шт. (1,2%).

Після цього вираховували:

кількість еритроцитів: $3690000 : 100 \times 97,8 = 3608820$ у 1 мкл крові або 3,61 Т/л;

кількість лейкоцитів: $3690000 : 100 \times 1,0 = 36900$ у 1 мкл крові або 0,036 Т/л або 36,0 Г/л;

кількість тромбоцитів: $3690000 : 100 \times 1,2 = 44280$ у 1 мкл крові або 0,044 Т/л або 44,23 Г/л.

Для вивчення морфології клітин крові у курчат готували мазки та фарбували їх за методом Папенгейма та експрес-методом Diff Quik (Набір реактивів Лейкокодиф-200) [2,6].

Морфологічна характеристика клітин крові курей.

Еритроцити. При дослідженні забарвлених мазків крові за допомогою світлового мікроскопа нами було виявлено велику кількість ядерних клітин. Основну масу клітин в полі зору становлять зрілі еритроцити.

Це найбільші за розміром еліпсоїдні клітини з розташованим в центрі овальним ядром та рівномірно забарвленою оксифільною (рожевою) цитоплазмою.

У різних видів птахів форма цих клітин помітно відрізняється, одні із них мають округлі клітини, в той час як інші – більш вузькі чи витягнуті клітини. Ядра зрілих еритроцитів завдяки наявності гетерохроматину фарбуються базифільно (синій колір). Вони мають овальну форму. Поряд із зрілими еритроцитами в мазку крові більшості птахів знаходять невелику кількість поліхроматофільних еритроцитів (рис. 8). У поліхроматофільних еритроцитів цитоплазма має блакитне забарвлення, а ядро зазвичай має менш щільний гетерохроматин, ніж у зрілих еритроцитів. Поліхроматофільні еритроцити у здорових птахів зазвичай становлять 1-5% всіх еритроцитів (Campbell & Дейн, 1984; Campbell, 1995) [1]. Збільшення їх кількості може

* – науковий керівник – д.вет.н., професор В.Б.Духницький.

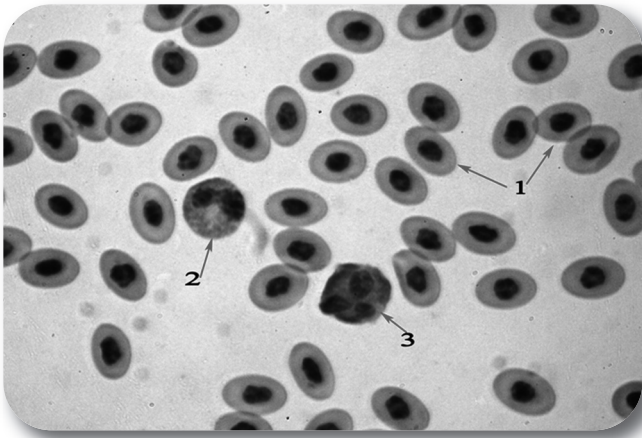


Рис. 5. Мазок крові 14-добового курчати:
1 – еритроцити, 2 – еозинофіл, 3 – гетерофіл.
Зафарбування Diff-Quik
(набір реактивів Лейкодиф 200).
Збільшення – окуляр 10 х об’єктив 100.

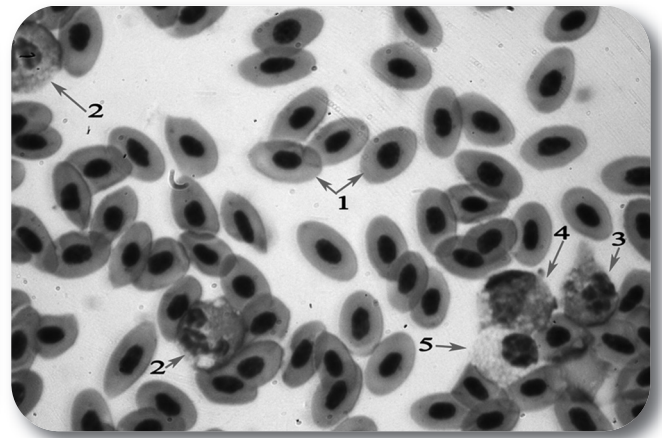


Рис. 6. Мазок крові 14-добового курчати:
1 – еритроцити, 2 і 3 – гетерофіли, 4 – моно-
цит, 5 – атипівний базофіл. **Зафарбування**
Diff-Quik (набір реактивів Лейкодиф 200).

спостерігатися при посиленні еритропоезу. Частіше це відбувається у відповідь на анемічний стан (регенераторна відповідь).

Ретикулоцити – це недозрілі еритроцити, що фарбуються шляхом інкубації живих клітин з суправітальними фарбами, такими як нова метиленова синька, проявляються гранульованими скупченнями РНК (ретикулум) у цитоплазмі. Як наслідок, термін “ретикулоцити” використовується до клітин з агрегованим ретикулумом, який формує різне (але неповне) кільце навколо ядра. Кількість цих клітин звичайно має позитивну кореляцію з кількістю поліхроматофільних еритроцитів [1].

Нормоцити (рубріцити) – це ще менш зріла стадія розвитку еритроцитів, яких поодинокі знаходять в мазку крові птахів. Нормоцити, як правило, менші і більш округлі, ніж зрілі еритроцити. Їх ядра округлі і складаються із менш щільного гетерохроматину, ніж у зрілих еритроцитів. Ці клітини дуже схожі на малі і середні лімфоцити (рис. 3).

Іноді в мазках крові здорових птахів трапляються клітини еритроїдного ряду, що піддаються поділу (мітозу) в периферійній крові, тобто мітотичні клітини.

Еритропластиди – це еритроцити без ядер. В крові здорових птахів їх може міститися до 1% з усіх еритроцитів.

Пойкілоцити у крові здорових птахів складають дуже невеликий відсоток. Пойкілоцити у птахів часто виявляють краплеподібні, веретеноподібні і круглі. (Hawkey & Samour, 1988, 1995, Кемпбелл, Fudge 2000, Campbell & Ellis, 2007) [1].

В еритроцитах птахів часто виявляють гемато-паразитів, які можуть спотворювати форму клітини, збільшувати їх розмір або зміщувати у них ядра. Найчастіше виявляють *Haemoproteus SPP* і *Plasmodium* [1].

Лейкоцити. У крові птахів розрізняють п’ять типів лейкоцитів, а саме: гетерофіли, еозинофіли,

базофіли, лімфоцити і моноцити. З них три види клітин – гетерофіли, еозинофіли і базофіли – мають в своїй цитоплазмі гранули і відносяться до гранулоцитів. Гранули гетерофілів і еозинофілів мають спорідненість до кислих барвників, гранули базофілів – до основних. Лімфоцити і моноцити у птахів, як і у ссавців, відносяться до агранулоцитів.

Гетерофіли (нейтрофіли, псевдоеозинофіли), як правило, їх є найбільша кількість серед гранулоцитів птахів. У забарвлених мазках крові за допомогою світлового мікроскопа їх диференціюють як нерівномірно округлі клітини з лопатеподібними (2-3 лопаті) базофільними ядрами і ацидофільними (оксифільними) цитоплазматичними гранулами. У багатьох клітинах може бути значна кількість гранул, які повністю вкривають ядро. Базофільність ядра дуже часто краще виражена на його периферії, ніж у центрі. Характерним є те, що ядра гетерофілів менші, ніж ядра еозинофілів (Maxwell & Robertson, 1998) [1]. Цитоплазма гетерофілів містить у собі складні гранули, які мають веретеноподібну форму і цегляно-червоний або слабо коричневий колір. Відносні довжина і ширина гранул залежить від виду птахів (Lucas & Jamroz, 1961) [1]. Краще видно зображення гранул на рис.6, де використовували фарбування за Папенгеймом.

Еозинофіли – це наступний вид гранулоцитів, яких виявляють у пташиній крові. Вони трапляються рідше, ніж гетерофіли і в багатьох видів птиці характеризуються яскравими еозинофільними цитоплазматичними гранулами.

Дуже рідко можуть траплятися еозинофіли з “неправильними гранулами” коричневого, сірого, блідо-блакитного кольору та кольору морської хвилі. Еозинофіли, як правило, нерівномірно округлі клітини з лопатеподібним базофільним ядром. Зазвичай ядро має дві лопаті (рис.4,5). Характерно, що гетерохроматин ядра еозинофілів

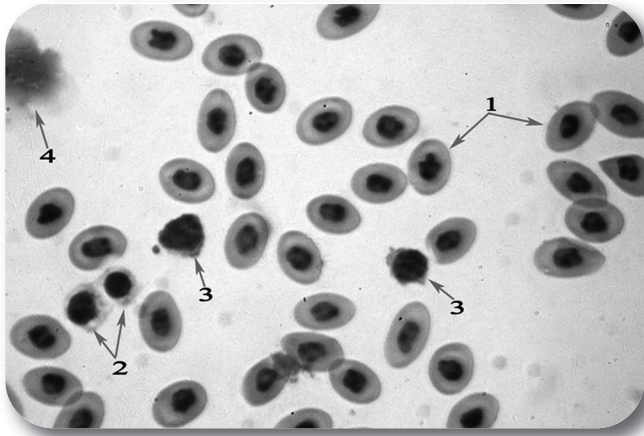


Рис. 7. Мазок крові 14-добового курчати:
1 – еритроцити, 2 – тромбоцити, які мають щільне ядро і світлішу цитоплазму, 3 – малі лімфоцити. Зафарбування Diff-Quik (Набір реактивів Лейкодиф 200).
Збільшення – окуляр 10 х об'єktiv 100.

на мазку виглядає темніше, ніж у гетерофілів і, на відміну від гетерофілів, інтенсивність забарвлення його однакова у всьому ядрі. Гематологи без досвіду роботи можуть мати труднощі в диференціюванні еозинофілів від гетерофілів, особливо, коли гранули еозинофілів мають червоно-помаранчевий колір, а гранули гетерофілів – червоно-коричневий. Ускладнюється диференціація цих клітин при щільному розташуванні гранул у цитоплазмі та маскуванні ними ядер, що не дає можливості визначити його інтенсивність і рівномірність забарвлення.

Базофіли птахів диференціюють за базофільними цитоплазматичними гранулами. Базофіли, як правило, нерівномірно округлі клітини, які найчастіше мають однолопатеве ядро (Lucas & Jamroz, 1961) [1]. Класично, гранули базофілів в цитоплазмі мають темне забарвлення і розміщені дуже щільно, що не дає змоги серед них виділити окремі. Зазвичай ядро виглядає блідішим порівняно з загальним кольором гранул або частково може бути вкрите ними, так що буває важко розрізнити його від гранул. Між видами птахів є деякі відмінності в розмірі, кольорі, відтінках і щільності гранул базофілів.

В окремих випадках по всій цитоплазмі або більшій її частині у базофілів не виявляють гранул, а виявляють круглі вакуолі з поодинокими гранулами (рис. 5). У таких випадках добре видно овальне базофільне ядро.

Лімфоцити у крові птахів складають найбільший відсоток серед лейкоцитів. Як і у ссавців, їх поділяють за розміром на малі, середні та великі.

Типові малі лімфоцити – є найменшими з лейкоцитів і мають округле ядро з щільним гетерохроматином і зовсім невеликий об'єм цитоплазми помірного базофільного забарвлення. Середні лімфоцити за розмірами більші, ніж малі лімфоци-

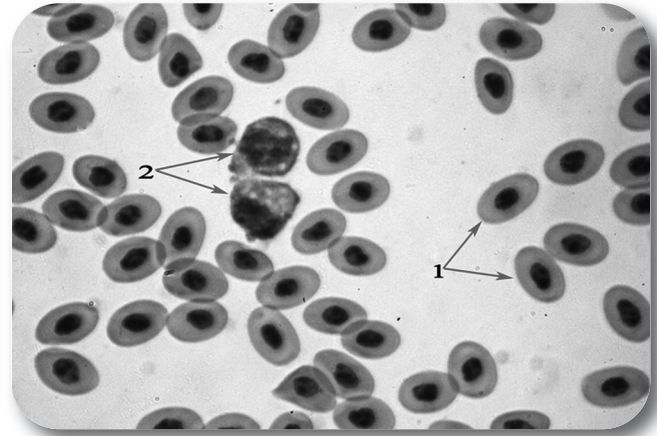


Рис. 8. Мазок крові 14-добового курчати:
1 – еритроцити, 2 – моноцити. Зафарбування Diff-Quik (Набір реактивів Лейкодиф 200).
Збільшення – окуляр 10 х об'єktiv 100.

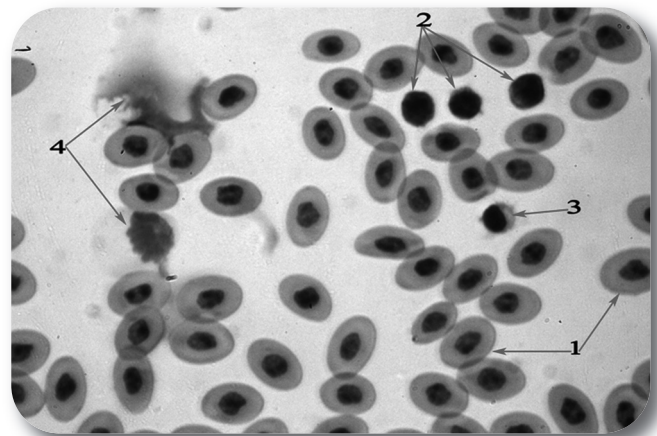


Рис. 9. Мазок крові 14-добового курчати:
1 – еритроцити, 2 – малі лімфоцити, 3 – тромбоцит, 4 – фігури розпаду ядер, "тіні ядер". Зафарбування Diff-Quik (Набір реактивів Лейкодиф 200).
Збільшення – окуляр 10 х об'єktiv 100.

ти і близькі за розмірами до гетерофілів. Середні лімфоцити мають теж округлі ядра, з помірно щільним гетерохроматином та невелику за об'ємом, помірно базофільну цитоплазму без гранул. Великі лімфоцити, як правило, більші, ніж гетерофіли і можуть бути такого ж розміру як моноцити. Великі лімфоцити, зазвичай, мають округле чи овальне ядро з помірно щільним гетерохроматином та невеликий об'єм цитоплазми без гранул. У деяких видів птахів, таких як Gruiformes (Hawkey з співавт., 1983) [1] у лімфоцитах трапляються крапкові гранули азурофільного до базофільного зафарбування.

Моноцити великі, поліморфні лейкоцити. У зафарбованих мазках крові можна бачити, що ці клітини (рис. 8) мають ядро різної форми: яйцеподібне, ниркоподібне, підковоподібне або іншої неправильної форми, яке містить дрібний сітчастий гетерохроматин та значний об'єм сіро-голубої



цитоплазми з декількома вакуолями.

Тромбоцити – ядерні клітини птахів. Вони, як правило, менші ніж еритроцити і лейкоцити.

На рисунках 4, 7 і 9 видно, що у них дуже щільне, темно забарвлене овальне ядро і невеликий об'єм безбарвної, світло-сірої, світло-розовуватої або блідо-голубої цитоплазми. У деяких випадках остання утворює виступи – псевдоподії. Іноді тромбоцити мають кілька невеликих, крапкових, еозинофільних або азурофільних гранул у цитоплазмі. У багатьох випадках тромбоцити можуть утворювати скупчення, у яких важко виділити окремі клітини [1]. У мазку крові тромбоцити подібні до малих лімфоцитів. В останніх більш округле та не щільне ядро, а цитоплазма більш базофільна (рис. 7, 9).

Дуже характерно для мазків крові курей, а також інших с.-г. птахів, наявність у них своєрідних фігур розпаду ядер, так званих “тіней ядер”, що свідчить

про велику лабільність (крихкість) клітин крові птиці (рис. 9).

Особливо лабільні клітини крові дуже молодих тварин. Це утруднює підрахунок лейкоцитарної формули і навіть може зіпсувати результати підрахунку.

Виведення лейкограми у курчат-бройлерів. Під час виробничих досліджень підраховують 100 клітин, під час наукових – 200-400, у випадку виявлення патологічних форм клітин – 200 клітин. Виведення лейкограми у птиці не викликає труднощів, якщо лаборант добре орієнтується в морфології клітин [2,3,6].

Оскільки кров птиці відноситься до лімфоцитарного типу, лейкограму мазка краще проводити наскрізним методом. Це пов'язано з тим, що окремі лейкоцити в мазку крові птиці розміщуються в його різних ділянках. Так, гранулоцити переважно знаходяться в периферійній частині мазка, а лімфоцити – у центральній його частині.

Висновки

1. Для успішного проведення морфологічних досліджень крові у птиці використовують гематологічні атласи, де мазки клітин крові представлені у вигляді фотознімків [1].

2. Одержані нами результати досліджень можна використовувати при проведенні морфологічного визначення клітин крові у птиці.

При проведенні морфологічних досліджень крові у птиці рекомендуємо використовувати результати наших досліджень і гематологічні атласи, де мазки кліток крові представлені фотоснимками.

Птиця, морфологія крові, еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, фотоснимки мазков крові

For the success of the morphological studies of blood in poultry recommend hematology atlas, which smears the blood films are represented as images [1] and the results of our research.

Poultry, morphology of blood, erythrocytes, leukocytes, platelets, blood smears photos

Літератури

1. Phillip Clark. Atlas of Clinical Avian Hematology/ Phillip Clark, Wayne S. J. Boardman, Shane R. Raidal. – WILEY-BLACKWELL. 2009. – 138 с.

2. Антонова В.Я. Лабораторные исследования в ветеринарии / В.Я.Антонова, П.Н.Блинов. – М.: Колос, 1971. – 648 с.

3. Никитин В.Н. Атлас клеток крови / Никитин В.Н. – М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1949. – 259 с.

4. Болезни домашних и сельскохозяйственных

птиц / Пер. с англ. И.Григорьева, С.Дорош, Н.Хрущева и др.: под. ред. Кэлнека и др. – М.: Аквариум Бук, 2003. – 1232 с.

5. Левченко В.І. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В.І.Левченко, В.В.Влізло, І.П.Кондрахін та ін.; за ред. В.І. Левченка. – Біла Церква, 2004. – 608 с.

6. Цвіліховський М.І. Фізико-хімічні, морфологічні та біохімічні дослідження крові сільськогосподарських тварин: методичні вказівки / М.І.Цвіліховський, І.Г.Погурський, В.О.Бондар та ін. – К.: НАУ, 2002. – 49 с.