**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Кафедра фізіології, імунології і біохімії

з курсом цивільного захисту та медицини

**Кваліфікаційна робота**

магістра

(рівень вищої освіти)

на тему:*Модифікації люмінесцентного аналізу при визначенні активності*

*лімфоцитів з використанням акридинового оранжевого*

Виконала: студентка ІІ курсу, групи8.0918-б

спеціальності 091 Біологія

(код і назва спеціальності)

освітньої програми Біологія

(код і назва освітньої програми)

Сухенко В. С.

(ініціали та прізвище)

Керівник професор, професор, д.мед.н Фролов О. К.

(посада, вчене звання, науковий ступінь, підпис, ініціали та прізвище)

Рецензентдоцент, доцент, к.б.н. Копійка В. В.

(посада, вчене звання, науковий ступінь, підпис, ініціали та прізвище)

Запоріжжя

2020

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Біологічний факультет | | | | | | |
| Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини | | | | | | |
| Рівень вищої освіти   магістр | | | | | | |
| Освітня програма Біологія | | | | | | |
| Спеціальність 091 Біологія | | | | | | |
| **ЗАТВЕРДЖУЮ** | | |  | |
| Завідувач кафедри | | | В. Д. Бовт | |
| \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | | | | |
| «\_\_\_» |  | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | | 2020 року |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ЗАВДАННЯ**  НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ | | | | | | | | | | |
| Сухенко Валентині Сергіївні | | | | | | | | |
| 1. Тема роботи Модифікації люмінесцентного аналізу при визначенні активності лімфоцитів з використанням акридинового оранжевого | | | | | | | | | |
| керівник роботи | | Фролов ОлександрКирилович, д.мед.н., професор | | | | | | | |
| затверджені наказом ЗНУ від | | | « | 12 | » | червня | 2019 року | № | 940-с |
| 2. Строк подання студентом роботи | | | | | 27груденя   2019 року | | | | |
| 3. Вихідні дані до роботи: кваліфікаційна робота бакалаврана тему «Визначення активності лімфоцитів за допомогою люмінесцентного аналізу з використанням люмінофору акридинового оранжевого» | | | | | | | | | |
| 4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно | | | | | | | | | | | |
| розробити): 1) порівняти інформативність показників люмінесценції лімфоцитів крові, пофарбованих акридиновим оранжевим (АО): інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 530 нм (І530), 640 нм (І640), α-параметр (І640/І530) у хірургічних хворих оперованих із пухлинами мозку різної локалізації.; 2) проаналізувати показники люмінесценції лімфоцитів крові, пофарбованих АО, у хворих із злоякісними пухлинами; 3) оцінити показники лейкоцитарної формули у хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи у динамиці хірургічного лікування;4)дослідити показники люмінесценції у хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи за етапами хірургічного лікування;5)проаналізувати різні підходи до кількісної оцінки активності лімфоцитів крові людини, пофарбованих АО люмінесцентним методом та підвищити об'єктивність інформативності показників за рахунок модифікації приготування мазків периферичної крові в клінічних дослідженнях | | | | | | | | | | | |
| 5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень):  Таблиця 3.1-3.6. Рисунок 1.1-1.4, 2.1-2.3, 3.1. | | | | | | | | | |

6. Консультанти розділів роботи

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Розділ | Консультант | Підпис, дата | |
| завдання  видав | завдання прийняв |
| 4 | Клімова О.О., к.б.н., ст. викладач |  |  |

7. Дата видачі завдання

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № з/п | Назва етапів кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
| 1. | Поповнення джерел літератури за темою кваліфікаційної роботи | Вересень-жовтень 2018 року | Виконано |
| 2. | Оформлення розділу з огляду літератури | Листопад-грудень 2018 року | Виконано |
| 3. | Формування розділу «Матеріали та методи дослідження» | Січень 2019 року | Виконано |
| 4. | Фарбування та аналіз мазків периферичної крові, пофарбованих АО | Лютий-травень  2019 року | Виконано |
| 5. | Формування бази даних результатів експериментальних досліджень | Червень-серпень 2019 року | Виконано |
| 6. | Статистичний аналіз експериментальних даних | Вересень 2019 року | Виконано |
| 7. | Формування експериментальної частини, оформлення кваліфікаційної роботи | Жовтень-листопад 2019 року | Виконано |
| 8. | Оформлення матеріалів до захисту, попередній захист кваліфікаційної роботи | Грудень 2019 року | Виконано |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Студент |  |  |  | В. С. Сухенко |
| Керівник роботи |  |  |  | О.К. Фролов |
| **Нормоконтроль пройдено** | | | | |
| Нормоконтролер |  |  |  | О.О. Клімова |

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 73 сторінках друкованого тексту, містить 6 таблиць, 8 рисунків. Список літератури включає 82 джерела, з них 19 іноземною мовою.

Об’єкт дослідження ‒ периферична кров онкохворих.

Мета роботи – оцінити можливості люмінесцентного методу щодо визначення активності периферична кров онкологічних хворих лімфоцитів в організмі людини з застосуванням акридинового оранжевого для розробки підходів для оцінки стану імунної системи при різних патологіях.

Методи дослідження – люмінесцентний, лабораторний, статистичний.

Новизна роботи полягає в тому, що вперше продемонстровано можливості застосування показників люмінесценції лімфоцитів крові із застосуванням акридинового оранжевого, за якими можна оцінювати стан їх білок-синтетичної системи і на основі цього характеризувати стан імунної реактивності організму.

Практичне значення ‒застосування методів оцінки функціонального стану лімфоцитів крові дозволить більш об´єктивно оцінювати стан імунної системи людини.

Отримані результати можуть бути використані в клініко-біологічних дослідженнях для формування наукових концепцій про механізми розвитку імунної відповіді, в якості теоретичного обґрунтування стану білок-синтетичної системи лімфоцитів в нормі та при різних патологіях, а також в медико-біологічній практиці для характеристики стану імунної реактивності людини.

ЛІМФОЦИТИ, ЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ, АКРИДИНОВИЙ ОРАНЖЕВИЙ, БІЛОК-СИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ, ПОКАЗНИКИ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ.

ABSTRACT

Work is present out on 73 pages of printed text, contains 6 tables, 8 figures. The list of references includes 82 sources, 19 of them in a foreign language.

The object of study is the peripheral blood of cancer patients.

The aim of the work is to evaluate the possibility of a luminescent method for determining the activity of peripheral blood of cancer patients with lymphocytes in human body with the use of acridine orange for the development of approaches to assess the state of the immune system in various pathologies.

Research methods - fluorescent, laboratory, statistical.

The novelty of the work is that for the first time the possibility of using indicators of luminescence of blood lymphocytes using acridine orange was demonstrated, by which it is possible to evaluate the state of their protein-synthetic system and on this basis to characterize the state of the immune reactivity of the organism.

Practical importance - the use of methods for assessing the functional state of blood lymphocytes will allow a more objective assessment of the state of the human immune system.

The results obtained can be used in clinical and biological studies to form scientific concepts about the mechanisms of development of the immune response, as a theoretical substantiation of the state of the protein-synthetic lymphocyte system in normal and various pathologies, as well as in medical and biological practice to characterize the state of human immune reactivity .

LYMPHOCYTES, LUMINESCENT ANALYSIS, ACRIDINE ORANGE, PROTEIN-SYNTHETIC ACTIVITY, LUMINESCENCE INDICES.

ЗМІСТ

[ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ 8](#_Toc28071435)

[ВСТУП 9](#_Toc28071436)

[1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ 12](#_Toc28071437)

[1.1 Характеристика лімфоцитів та їх значення в імунній системі людини 12](#_Toc28071438)

[1.1.1 Морфологічна характеристика лімфоцитів 12](#_Toc28071439)

[1.1.2 Розвиток та диференціювання лімфоцитів 13](#_Toc28071440)

[1.1.3 Характеристика лімфоцитів за функціональними ознаками 15](#_Toc28071441)

[1.2 Люмінесцентний метод дослідження імунних клітин 20](#_Toc28071442)

[1.3 Використання люмінофору акридин оранжевого для визначення активності лімфоцитів 22](#_Toc28071443)

[1.4 Значення рН при застосуванні акридинового оранжевого в люмінесцентому методі 25](#_Toc28071444)

[1.5. Сучасний стан дослідження білок-синтетичної системи імуннокомпетентних клітин з використанням флуорохромних барвників та міток у спектральних методах аналізу. 27](#_Toc28071445)

[2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 33](#_Toc28071446)

[2.1 Характеристика клінічного матеріалу 33](#_Toc28071447)

[2.2. Виділення лімфоцитів за градієнтом щільності у фіколл-урографіні 33](#_Toc28071448)

[2.3 Фіксація. Підготовка матеріалу для дослідження 34](#_Toc28071449)

[2.4 Методи фарбування та оцінювання матеріалу дослідження 35](#_Toc28071450)

[2.5 Методи виділення, фіксації, фарбування клітин периферичної крові для підрахунку лейкоцитарної формули крові. Оцінка результатів 37](#_Toc28071451)

[2.6 Статистична обробка експериментальних даних 39](#_Toc28071452)

[3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА 42](#_Toc28071453)

[3.1 Інформативність показників лімфоцитів у периферичній крові хірургічних хворих люмінесцентної мікроскопії з застосуванням акридинового оранжевого 42](#_Toc28071454)

[3.2 Дані люмінесцентного аналізу лімфоцитів крові, пофарбованих акридиновим оранжевим у хворих з злоякісними новоутвореннями. 46](#_Toc28071455)

[3.3 Дослідження активності лімфоцитів крові хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи 48](#_Toc28071456)

[3.4 Кількісний метод оцінки люмінесценції лімфоцитів крові за допомогою оптичної фотокамери 54](#_Toc28071457)

[4 ОХОРОНА ПРАЦІ 56](#_Toc28071458)

[ВИСНОВКИ 63](#_Toc28071459)

[ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 65](#_Toc28071460)

[ПЕРЕЛІК ПОСИЛАННЬ 66](#_Toc28071461)

# ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГ – антиген

АО – акридиновий оранжевий

АТ – антитіло

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕТС – ембріональна теляча виворотка

МСФ – мікроспектрофлуориметри

НК – нуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

УФ – ультрафіолет

ЦФБ – цитратно-фосфатний буфер

Ig‒ імуноглобулін

MZB – B-клітини маргінальної зони

NK‒ клітини – нульові лімфоцити

БСС – білок-синтетична система

БЕ – бромистий етидій

ІКК – імуннокомпетентні клітини

МЕ – метиловий зелений

ПЯН – паличкоядерні нейтрофіли

# ВСТУП

Імунна система сформувалася в процесі еволюції хребетних для захисту від інфекцій, забезпечення індивідуальності та цілісності організму, елімінації чужорідних агентів як екзогенної, так і ендогенної природи,які можуть розвиватися як в клітині так і в позаклітинній рідині, тканинах, порожнинах тіла. Ці функції здійснюються лімфоцитами, макрофагами і їх продуктами, численними додатковими клітинами, широко поширеними по організму з переважною локалізацією в лімфоїдних органах, включаючи кістковий мозок, тимус, лімфатичні вузли, селезінку. Саме лімфоцити здатні специфічно розпізнавати антиген (АГ) і відповідати на нього імунною реакцією, а зокрема Т-і В-лімфоцити відповідають в організмі за імунну відповідь та імунну пам`ять. Тому актуальність вивчення лімфоцитів є важливою, оскільки це дає можливість дослідити окремо взяті клітини, на основі яких встановлюють поведінку клітинних популяцій для виявлення активності імунної системи організму. Рівень новоутворення клонів сенсибілізованих лімфоцитів і активність їх наступної міграції в органи, а також об'єм загальної рециркуляції популяцій лімфоцитів у внутрішньому середовищі організму відбивають функціональний стан імунної системи організму. Тому вони повинні стати об'єктом вивчення імунологів ‒ клініцистів, експериментаторів, що приступають до аналізу стану імунітету у конкретної особи [1].

Дослідження стану білок-синтетичної системи (БСС) імуннокомпетентних клітин (ІКК) як показника стану напруги імунної системи організму на сьогодні залишається актуальним питанням для багатьох науковців. Сучасні органічні флуорохроми повинні володіти досить ефективною інтеркаляцією з нуклеїновими кислотами та протеїнами, низькою токсичністю та здатністю до поєднання декількох люмінофорів одночасно у одній системі.

Для виявлення активності лімфоцитів застосовують люмінесцентний аналіз. Переваги його полягають у: простоті та швидкості використання, високої чутливості та відносній селективністі аналізу. Використання акридинового оранжевого (АО) дозволяє виявити нуклеїнові кислоти (НК), тобто встановити співвідношення ДНК та РНК у білок-синтезуючій системі клітини. Люмінофор адсорбується нуклеїновими кислотами і нуклеопротеїдами, надаючи їм відповідного світіння. Ядерна ДНК дає при цьому яскраво-зеленулюмінесценцію (І530), протоплазматична РНК світиться червоним світлом (І640), що дозволяє певною мірою ідентифікувати НК в досліджуваних клітинах. При деполімеризації ядерних НК, а також зниженні життєздатності клітин колір світіння ядер змінюється від зеленого до червоного [2].

Застосування даного методу виявлення активності лімфоцитів дає змогу встановити стан імунної системи організму, відповідь імунокомпетентних клітин на дію певного як клітинного так і позаклітинного подразника (бактерії, віруса), стан протікання захворювання, тяжкість ураження для надання змоги встановлення більш ефективного лікування.

Мета даної роботи –оцінити можливості люмінесцентного методу щодо визначення активності лімфоцитів в організмі людини з застосуванням люмінофора акридинового оранжевого длярозробки підходівоцінки стану імунної системи при різних патологіях.

Для досягнення поставленої мети поставлено наступні завдання:

1. порівняти інформативність показників люмінесценції лімфоцитів крові, пофарбованих АО: інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 530 нм (І530), 640 нм (І640), α-параметр (І640/І530) у хірургічних хворих оперованих із пухлинами мозку різної локалізації;
2. проаналізувати показники люмінесценції лімфоцитів крові, пофарбованих АО, у хворих із злоякісними пухлинами;
3. оцінити показники лейкоцитарної формулиу хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи у динаміці хірургічного лікування;
4. дослідити показникилюмінесценціїу хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системиза етапами хірургічного лікування;
5. проаналізувати різні підходи до кількісної оцінки активності лімфоцитів крові людини, пофарбованих АОлюмінесцентним методом та підвищити об'єктивність інформативності показниківза рахунок модифікації приготування мазків периферичної крові в клінічних дослідженнях;

Об'єкт дослідження ‒ периферична кров онкохворих.

Предмет дослідження ‒ показники люмінесценції з використанням АО при імунологічних дослідженнях.

Методи дослідження.Дослідження виконано з використанням люмінесцентного, лабораторного та статистичного методу.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що вперше було продемонстровано можливості застосування показників люмінесценції лімфоцитів крові із застосуванням АО, за якими можна оцінювати стан їх білок-синтетичної активності і на основі цього характеризувати стан імунної реактивності організму.

Практичне значення ‒застосування методів оцінки функціонального стану лімфоцитів крові дозволить більш об´єктивно оцінювати стан імунної системи людини.

Матеріали роботи були представлені на таких конференціях: ІІ Міжнародна наукова конференція «Сьогодення біологічної науки» (м. Суми, 09-10 листопада 2018), Міжнародна науково-практична конференція «Наукові відкриття та фундаментальні наукові дослідження: світовий досвід» (м. Полтава, 20 травня 2019),ХІІ університетська науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Молода наука‒2019» (м. Запоріжжя, 2019).

# 1ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

# 1.1 Характеристика лімфоцитів та їх значення в імунній системі людини

# 1.1.1 Морфологічна характеристика лімфоцитів

**Лімфоцити**‒ клітини імунної системи, що представляють собою різновид лейкоцитів групи агранулоцити, білих кров'яних клітин. Це головні клітини імунної системи, які забезпечують гуморальний імунітет (вироблення антитіл), клітинний імунітет (контактна взаємодія з клітинами-мішенями), а також регулюютьдіяльність клітин інших типів. В крові дорослої людини в нормі міститься 20-35% лімфоцитів. У той же час кров містить тільки близько 2% лімфоцитів, що знаходяться в організмі, інші 98% знаходяться в тканинах[3].

Величина лімфоцитів в мазку крові становить ‒ від 4,5 до 10 мкм.

За морфологічним розміром розрізняють:

‒ малі лімфоцити (діаметром 4,5-6 мкм);

‒ середні (діаметром 7-10 мкм);

‒ великі (діаметром 10 мкм і більше), рис. 1.1 [4].

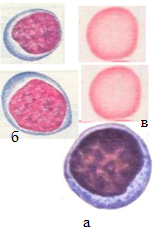


Рисунок 1.1‒ Морфологічні ознаки лімфоцитів:а – великі лімфоцити; б – середні лімфоцити; в – малі лімфоцити[4]

Великі лімфоцити зустрічаються в крові новонароджених і дітей, у дорослих вони відсутні. Виключно для всіх видів лімфоцитів характерна наявність інтенсивно забарвленого ядра округлої та бобовидної форми, що містить компактний гетерохроматин і вузьку оболонку базофільної цитоплазми. У цитоплазмі деяких лімфоцитів міститься невелика кількість азурофільних гранул[1, 3].

Малі лімфоцити складають більшу частину (85-90%) всіх лімфоцитів крові людини. При електронній мікроскопії в їх ядрах виявляються невеликі вп`ячування, гетерохроматин розташований переважно по периферії ядра. В цитоплазмі розсташовані везикули, лізосоми, рибосоми, полісоми, мітохондрії, апарат Гольджі, невелика кількість елементів гранулярної ендоплазматичної сітки[5].

Середні лімфоцити складають близько 10-12% лімфоцитів крові людини. Ядро округлої форми, іноді з вп`ячуванням ядерної оболонки. Хроматин більш пухкий, ядерце чітко виражено. У цитоплазмі розташовані подовжені канальці гранулярної ендоплазматичної сітки, елементи,рибосоми і полісоми, лізосоми.

# 1.1.2 Розвиток та диференціювання лімфоцитів

Родоначальницею усіх клітин імунної системи є кровотворна стовбурова клітина. Вона генерує лімфоїдну стовбурову клітину, що дає початок 2 типам імуннокомпетентних клітин – Т- і В-лімфоцитам.

За місцем походження лімфоцити поділяють на:

1. Т-лімфоцити.

Утворення та диференціація відбувається у тимусі (вилочковій залозі). Тут клітини попередники Т-лімфоцитів потрапляють в тимус, де пре- Т- клітини (тімоцити) дозрівають, проліферують і проходять диференціювання на окремі субпопуляції в результаті взаємодії з епітеліальними і дендритними клітинами строми і впливу гормоноподібних поліпептидних факторів,які секретуються епітеліальними клітинами тимуса (тимопоетин, тімулін і ін.)[6].

1. В-лімфоцити.

Утворення В-клітин у плода відбувається в печінці, а надалі у кістковому мозку. Процес дозрівання В- клітин здійснюється в дві стадії: АГ-незалежну і АГ-залежну.

АГ-незалежна стадія дозрівання В-лімфоцитів контролюється локальними клітиннами і гуморальними сигналами від мікрооточення пре-В-лімфоцитів і не визначається контактом з АГ. На цій стадії формуються окремі пули генів, що кодують синтез імуноглобулінів (Ig), а також експресію цих генів. Однак, на цитолеммі пре-В-клітин ще немає поверхневих рецепторів ‒ Ig, компоненти останніх знаходяться в цитоплазмі. Утворення В-лімфоцитів із пре-В-лімфоцитів супроводжується появою на їх поверхні первинних Ig, здатних взаємодіяти з АГ. Тільки на цьому етапі В-лімфоцити потрапляють в кровотік і мігрують до периферичних лімфоїдних органів. Сформовані молоді В-клітини накопичуються в основному в селезінці, а більш зрілі в лімфатичних вузлах [1, 6].

АГ-залежна стадія дозрівання В-лімфоцитів починається з моменту контакту цих клітин з АГ (в тому числі - алергеном). В результаті відбувається активація В-лімфоцитів, що протікає в два етапи: проліферації і диференціювання. Під час проліферації кількість В-лімфоцитів значно збільшується, які потім диференціюються та продукують Ig В-клітини (плазматичні клітини). Кожна плазматична клітина здатна секретувати велику кількість Ig. Процеси поділу і диференціації В-клітини здійснюються не тільки під впливом АГ, але і за обов'язкової участі Т-лімфоцитів-хелперів, а також виділяються ними і фагоцитами цитокінів - факторів росту і диференціювання. Імунокомпетентним клітинам властиво специфічно розпізнавати АГ і відповідати на нього імунної реакцією. Це Т-і В-лімфоцити. Вони під впливом чужорідних агентів диференціюються в сенсибілізований лімфоцит і плазматичну клітину [1, 3].

# 1.1.3 Характеристика лімфоцитів за функціональними ознаками

За функціональними властивостями всі імунокомпетентні клітини поділяють на :

- ефекторні ( В- лімфоцити)

- регуляторні ( Т- лімоцити)

Взаємодія клітин в імунній відповіді здійснюється за допомогою гуморальних медіаторів - цитокінів.

В організмі людини лімфоцити постійно рециркулюють між зонами скупчення лімфоїдної тканини. Лімфоцити розташовані в лімфоїдних органах і тому їх міграція по кровоносному і лімфатичному руслу строго впорядкована і пов'язана з функціонуванням різних субпопуляцій [1, 6].

За наявністю поверхневих CD-маркерів лімфоцити поділяють на функціонально різні популяції і субпопуляції:

1. Т- лімфоцити;
2. В - лімфоцити;
3. NK- лімфоцити( нульові лімфоцити).

Т- лімфоцити локалізовані в Т-залежних зонах периферичних лімфоїдних органів (в білій пульпі селезінки і паракортикальній зоні лімфовузлів).

Т-лімфоцити здатні розпізнавати розсташований на поверхні клітини АГ. Саме ці клітини відповідають за клітинний імунітет, імунні реакції клітинного типу. Окремі субпопуляції цих імунокомпетентних клітин допомагають В- лімфоцитам реагувати на Т- залежні антигени за допомогою вироблення АТ [3].

Т-лімфоцити розпізнають АГ за допомогою двох типів мембранних глікопротеїнових ‒ Т-клітинних рецепторів і CD-3, з’єднаних між собою не ковалентними зв`язками. Їх рецептори, на відміну від АТ і рецепторів В-лімфоцитів, які не здатні розпізнавати вільно циркулюючі АГ. Вони розпізнають пептидні фрагменти, які подаються клітинами через комплекс чужорідних речовин з відповідним білком головної системи гістосумісності І і ІІ класу[1,3].

При диференціюванні Т-лімфоцити набувають певний набір мембранних CD-маркерів. Т-клітини поділяють на субпопуляції залежно від їх функцій і профілем CD-маркерів:

1. кілери;
2. хелпери;
3. супресори.

Перша група – помічники (активатори), до складу яких входять Т-хелпери-1, Т-хелпери-2, індуктори Т-хелперів, індуктори Т-супресорів[7].

1. Т-хелпери-1 несуть рецептори CD-4 (як і Т-хелпери-2) і CD44, відповідають за дозрівання Т-цитотоксичних лімфоцитів (Т-кілерів), активують Т-хелпери-2 і цитотоксичну функцію макрофагів, секретують інтерлейкін-2 (ІЛ), ІЛ-3 та інші цитокіни[3, 7].

2. Т-хелпери-2 мають загальний для хелперів CD-4 і специфічний CD-28 рецептори, забезпечують проліферацію і диференціювання В-лімфоцитів в плазматичні клітини, синтез АТ, гальмують функцію Т хелперів-1, секретують ІЛ-4, ІЛ-5 і ІЛ-6[3, 7].

3. Індуктори Т-хелперів несуть CD29 та відповідають за експресію АГ HLA класу 2 на макрофагах і інших клітинах.

4. Індуктори Т-супресорів несуть CD45 специфічний рецептор, відповідають за секрецію ІЛ-1 макрофагами, активацію диференціювання попередників Т-супресорів[7].

Друга група-Т-ефектори. У неї входить тільки одна субпопуляція.

1. Т-цитотоксичні лімфоцити (Т-кілери). Мають специфічний рецептор CD8, лізують клітини-мішені, що несуть чужорідні АГ або змінені аутоАГ (трансплантат, пухлина, вірус і ін.). Т-кілери розпізнають чужорідний епітоп вірусного або пухлинного АГ в комплексі з молекулою класу 1 HLA в плазматичній мембрані клітини-мішені[3, 8].

Третя група Т-клітини-регулятори. Представлена двома основними субпопуляціями.

1. Т-супресори мають важливе значення в регуляції імунітету та забезпечують пригнічення функцій Т-хелперів 1 і 2, В-лімфоцитів. Мають рецептори CD11, CD8. Група функціонально різнорідна. Їх активація відбувається в результаті безпосередньої стимуляції АГ без істотної участі головної системи гістосумісності[3, 7, 8].

Виділяють кілька підтипів В-лімфоцитів. Основна функція В-клітин – це ефекторна участь в гуморальних імунних реакціях, диференціація в результаті АГ стимуляції в плазматичні клітини, що продукують АТ.

В-лімфоцит за допомогою своїх Ig-рецепторів розпізнає і пов'язує АГ. Одночасно з В-клітиною антиген за сигналом макрофагів розпізнає Т-хелпер, який активується і починає синтезувати фактори росту і диференціювання. Активований цими факторами В-лімфоцит зазнає ряд поділів і одночасно диференціюється в плазматичні клітини, що продукують АТ.

Шляхи активації В-клітин і кооперації клітин в імунній відповіді на різні АГ за участю популяцій [1].Активація В-лімфоцитів може здійснюватися:

‒ Т-залежним АГ за участю білків HLA класу 2 Т- хелпери;

‒ Т-незалежним АГ, що має в складі мітогеномні компоненти;

‒ поліклональним активатором;

‒ Т-незалежним АГ, які не мають мітогенного компонента.

Разом з тим можна виділити кілька субпопуляцій В-лімфоцитів, що розрізняються за походженням, диференціювання, фенотипу і функціональними властивостями.

Виділяють 3 основні субпопуляції В-клітин. Одна з них – В2-клітини (іноді їх називають звичайними В-клітинами), що локалізуються переважно в селезінці, кістковому мозку, лімфовузлах, окремих фолікулах лімфоїдної тканини кишечника. Гістологічна одиниця, яка є місцем зосередження В2-клітин ‒ лімфоїдний фолікул. Ці клітини складають переважну більшість циркулюючих В-лімфоцитів і відіграють основну роль в гуморальній імунній відповіді[3, 6].

Дві інші субпопуляції – В1- і В-клітини маргінальної зони (MZВ-клітини).

В1-клітини локалізуються переважно в черевних і плевральнихпорожнинах. Ще в ембріональному періоді В1-клітини мігрують в серозні порожнини, де вони існують протягом усього життя організму.В1-клітини здатні до самопідтримки шляхом дуже повільній проліферації, що заповнює спад клітин, що гинуть шляхом апоптозу.

Обидва різновиди В1-клітин можуть диференціюватися в антитілоутворюючі клітини без стимуляції АГ. При цьому вони секретують переважно IgM-АТ (в кишечнику ‒ також IgA). Більшість цих АТ специфічно до власних білків організму (ДНК, гістонів, колагену, компонентам цитоскелета, АГ груп крові і т. Д.); багато з них поліспеціфічні, здатні взаємодіяти з декількома АГ, в тому числі аутологічними. Ці АТ мають низьку спорідненість (афінність) до АГ, включаючи аутоАГ, і не здатні викликати пошкодження тканин. Приблизно половина сироваткового IgM секретується В1-клітинами. Природні антитіла, які продукують В1а-лімфоцитами, часто специфічні до мікробних АГ відіграючи важливу роль в реакціях вродженого імунітету. Відповідь В1-клітин переважно тимусзалежна. В1-клітини постійно циркулюють між селезінкою і черевною порожниною, але не надходять в фолікули, оскільки не експресують CXCR5 – рецептор хемокіни BLC (CXCL13). З цим пов'язана напряму пов’язано те, що процеси гуморальної імунної відповіді у вигляді перемикання ізотипів і підвищенні спорідненості до АГ, не зачіпають або мінімально зачіпають В1-клітини [4, 6].

Ще один різновид В-лімфоцитів ‒ B-клітини маргінальної зони (MZB). Вони локалізовані майже виключно в маргінальній зоні селезінки, яка відділяє білу пульпу від червоної. Фенотипічно ці клітини більш схожі з В2-, ніж з В1-клітинами.Вони походять від тих же кістково-мозкових клітин-попередників. Основний мембранний імуноглобулін MZB-клітин ‒IgM, який експресується сильніше, ніж на В2-клітинах. У той же час IgD присутній на мембрані в дуже малій кількості. Відділення лінії MZB-клітин від загальної лінії В2-клітин відбувається на перехідній стадії транзиторних клітин, коли майбутні MZB-клітини послаблюють експресію не IgM (як В2-клітини), а IgD і втрачають молекулу CD23. На MZB-лімфоцитах не експресується хемокіновий рецептор CXCR5, що дозволяє клітинам мігрувати в фолікули. Термін життя MZB-лімфоцитів можна порівняти з терміном життя організму. MZB-клітини беруть участь в гуморальній імунній відповіді на збудники, що надходять в кровотік. Вони здійснюють тимусзалежну імунну відповідь на інкапсульовані патогени. При відповіді на АГ MZB-клітини диференціюються в короткоживучі клітини, які утворюються АТ. MZB-клітини пам'яті несуть на своїй поверхні IgM, а не IgG [1, 4, 7].

Морфологічно NK-клітини це великі лімфоцити з бобовидним зміщеним ядром і азурофільной гранулами, які з вигляду і складу близькі гранулам Т-кілерів. Нульові лімфоцити також називають великі гранулярні лімфоцити.

NK-лімфоцити забезпечують неспецифічний протиінфекційний імунітет, а також є головною ланкою протипухлинного захисту. Основна функція NK-клітин ‒ виявляти і знищувати власні клітини організму, в яких щось порушилося, вони вбивають пухлинні клітини і клітини, заражені вірусами (а також, можливо, і іншими чужорідними агентами).NK-лімфоцити не мають маркерів Т- і В-клітин. Свою цитотоксичну дію на клітини-мішені вони надають без участі антитіл. Активність NK-лімфоцитів контролюється інтерфероном. Показано, що будь-який інтерферон (альфа, бета і гамма) викликає активацію нульових лімоцитів як in vitro, так і in vivo . При цьому є виражена кореляція між рівнем інтерферону і активністю NK[3, 8].

# 1.2Люмінесцентний метод дослідження імунних клітин

На сьогодні існує багато методів дослідження клітин в імунології. Але одним із найпоширених методів – люмінесценція. Люмінесцентний метод заснований на переведенні молекул або атомів речовини в енергетично збуджений стан, а також вимірюванні інтенсивності світіння, що виникає при поверненні молекул в стан рівноваги.

Основним методом кількісного хімічного люмінесцентного аналізу є флюорометрія. Цей метод базується на встановленні кількості люмінесцентної речовини по інтенсивності виникнення люмінесценції [9].При цьому існує певна залежність між інтенсивністю люмінесценції і концентрацією речовини.

Флуориметричні методи принципово нічим не відрізняються від фотометричних і представляють лише різновид оптичних методів, однак мають і свої специфічні особливості [10].

Поглинаючи світло відповідної енергії, атом речовини переходить з нормального стану E0 в збуджений Е1, при цьому спостерігається світіння. Частоти поглиненого і випроміненного світла рівні (резонансне випромінювання). У всіх видах люмінесценції виявляються характерні властивості речовин, що може служити основою для їх розпізнавання і вивчення[10, 11].

Флуориметричні вимірювання виконуються візуально і за допомогою об'єктивних методів реєстрації виникає випромінювання. Основою будь-якої флуориметричної установки є джерело збудливої реакції: первинний монохроматизуючий пристрій і приймач променевої енергії.

Слід відзначити, що поширення застосування люмінесцентного методу дослідження в області імунології пов’язане із рядом переваг у порівнянні з іншими методами, які відіграють важливу роль у проведенні біологічного експерименту [12].Насамперед це наступні переваги:

1. Висока чутливість. За даними Орнстейна та ін. [13] флуоресцентні методи виявлення речовини, принаймні, у 1000 разів чутливіше абсорбційних.

2. Висока специфічність. Вона характерна взагалі для всіх методів флуоресцентного аналізу.

3. Чіткість і контрастність люмінесцентно-мікроскопічних картин.

4. Проведення кількісного та якісного аналізу.

5. Метод можливо застосовувати для вивчення не тільки фіксованих, але в певних умовах і живих клітин та тканин.

6. Зручністьта простота проведення методики.

7. Просте апаратурне оснащення та доступність хімічних реактивів для проведення аналізу.

8. Екологічно безпечний метод.

Люмінесцентна мікроскопія активно розвивається і у зв’язку з цим поділяєтьсяна ряд самостійних і не дуже зв’язаних між собою поділів, що базуються на таких методах [12, 14].

1. Вивчення власної (первинної) люмінесценції біологічних об’єктів:

а) у видимій області спектра. Має обмежене значення, застосовується в основному для визначення деяких гормонів (фолікулін, адреналін), окремих вітамінів (А, Вз), жирів і пігментів (хлорофіл, порфірини) [13];

б) в ультрафіолетовій області(УФ). УФ-флуоресцентна мікроскопія, запропонована Брумбергом [14], відкриває нові можливості в дослідженні клітини, насамперед кількості й стану її білків.

2.Вивчення люмінесценції біологічних об'єктів, оброблених фарбами-флуорохромами, які світяться (вторинна люмінесценція):

а) люмінесцентна гістохімія НК за допомогою АО і деяких інших діамінопохідних акридину і люмінесцентний реактив Шиффа [15]; полісахаридів ‒ за допомогою АО і люмінесцентного реактиву типу Шиффа і методу люмінесцентної імуноцитохімії[16]; ліпідів ‒ за допомогою флуорохромів бензапирену, фосфіну 3R і нильского блакитного [15]; білків ‒ за допомогою зразків, що люмінесцують, дихлортриазінових (проціонових) барвників і методу люмінесцентної імуноцитохімії [17];

б) люмінесцентномікроскопичні методи без чіткої гістохімічної основи. До цих методів відносяться: вивчення окремих клітинних структур ‒ мітохондрій (флуорохроми: тетрациклін, берберин-сульфат, аурофосфін) і лізосом (флуорохром акридиновий оранжевий); Останнім часом найбільше поширення одержав флуорохром флуоресцеінізотіоцианат, що частіше за все застосовується для мітки антитіл [18]. Розповсюдження цьогобарвника пов'язане із широким впровадженням методів фенотипування клітин із застосуванням моноклональних антитіл (МКАТ) [19].

# 1.3 Використання люмінофору акридин оранжевого для визначення активності лімфоцитів

На сьогодні в люмінесцентному методі продовжують використовувати люмінофор акридин оранжевий.

За хімічною будовою АО гетероцикл (рис. 1.2), що і визначає характерні особливості даного люмінофору [2].До них відноситься те, що він:

1. володіє суворою цитохімічною специфічністю;
2. дає яскраві та чіткі люмінесцентномікроскопічні картини, які одержують за його допомогою;
3. додає ДНК і РНК різне світіння при різних спектрах поглинання світла;
4. відсутність вицвітання препарату (особливо під дією збудливого світла).

Особливістю АО є його здатність існувати в розчині як в мономерній, так і в димерній формі. Максимум люмінесценції мономерів лежить в зеленій області спектра (530 нм), а для димерної форми характерна червона люмінесценція з максимумом випромінювання 640 нм. Співвідношення концентрацій мономерів і димерів залежить від концентрації люмінофору в розчині [15, 20].



Рисунок 1.2 ‒ Будова акридин оранжевого [2]

Важливо відзначити, що мономерна форма, яка існує в сильно розбавлених розчинах, має наступні оптичні властивості: максимум поглинання 494 нм, час життя збудженого стану τ = 2×10-9с, максимум люмінесценції 530 нм(рис. 1.3). У концентрованих розчинах АО існує в димерній формі з іншими оптичними характеристиками: максимум поглинання 465 нм, максимум люмінесценції 640 нм, час життя збудженого стану τ = 20×10-9 с[15, 21].

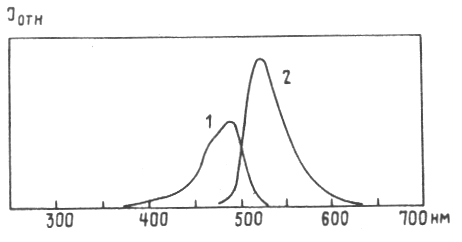
****

Рисунок 1.3 ‒Спектри збудження (1) та флуоресценції (2) акридинового оранжевого в комплексі з ДНК (мале заповнення ДНК барвником) [15]

При обробці АО гістологічних препаратів виникає червона і зелена люмінесценція різних клітинних структур [2, 15, 21-23].Це пов’язано з тим, що було показано, що зелена люмінесценція характерна для комплексу АО з ДНК, в той час як червона для комплексу з РНК.

Ця особливість і дає можливості для широкого використання АО при визначенні співвідношення ДНК і РНК в клітині по співвідношенню інтенсивності люмінесценції в зеленій і червоній областях спектру відповідно.

Під час обробки фіксованих клітин люмінофором АО в певних умовах в інтервалі рН = 4-5 виникає двокольорове люмінесцентне забарвлення. Це пояснюється комплексом мономерів з двох спіральною (смуга випромінювання в зеленій області спектра з максимумом 530 нм) і димерів з односпіральною (смуга випромінювання в червоній області спектра з максимумом 640 нм) нуклеїновими кислотами (рис. 1.4) [24, 25].

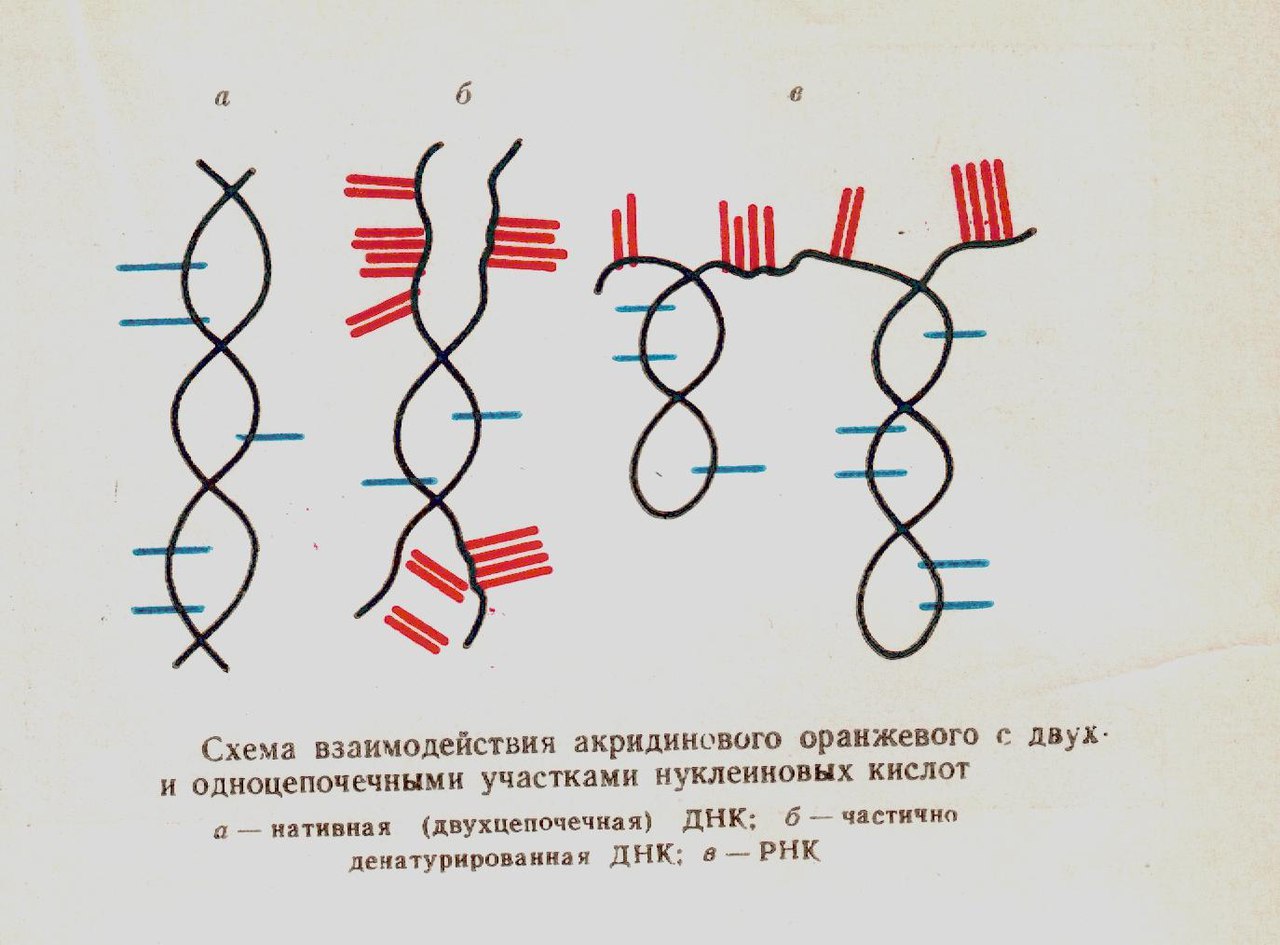


Рисунок 1.4‒Схема взаємодії акридинового оранжевого з нуклеїновими кислотами: а – двохлацюгова ДНК; б – частково денатурованадвохланцюгова ДНК; в – РНК [15]

Крім двохспіральних нуклеїнових кислот комплекси з мономерами можуть утворювати і білки. Однак при рН фарбувального розчину, що дорівнює 4-4,6, внесок комплексів мономерів АО з білками в загальну інтенсивність люмінесценції клітини в довжині хвилі 530 нм дуже малий [26, 27].

У свою чергу, димери АО можуть утворювати комплекси не тільки з односпіральними НК але і змукополісахаридами[28]. Однак для клітин, що не містять мукополісахаридів в цитоплазмі, а тим більше для ядер клітин внеском комплексів димерів з мукополісахаридами в загальну інтенсивність смуги люмінесценції з максимумом 640 нм можна знехтувати, хоча, мабуть, доцільно при цьому переконатися у відсутності в досліджуваній клітці мукополісахаридів, наприклад, фарбуючи препарат АО при рН=2, коли комплекси димерів можуть утворюватися тільки з мукополісахаридами в разі їх присутності в клітині[2, 15].

Таким чином, застосування спектральної техніки дозволяє отримувати досить надійні і відтворювані результати вимірювання інтенсивності червоною і зеленою люмінесценції пофарбованого люмінофором АО для встановлення активності білок-синтезуючої системи клітини.

# 1.4 ЗначеннярН при застосуванні акридинового оранжевого в люмінесцентому методі

Обов’язковою умовою одержання достовірних результатів є флуорохромування при суворо заданих значеннях рН. Як вже раніше згадувалося, існують два типи взаємодіїАО з НК [13, 15].

1. Взаємодія з дволанцюговими ділянками. При цьому АО або інтерколює між нуклеотидними парами, або розташовується у вузькій борозенці НК. При поєднанні такого типу НК набуває зеленої люмінесценції, по своїх властивостях практично ідентичну з люмінесценцією АО, що знаходиться в розчині у мономерній формі[17, 29, 30].

2. Зв’язуванняАО з РО4групами неспіралізованих ділянок НК. У результаті реакції цього типу неспіралізовані ділянки НК отримують червоне світіння, що залежить від утворення димерів АО [25].

Друга реакція аналогічна тій, при якій відбувається з'єднання НК з основними барвниками неакридинового ряду. В утворенні зв'язку цього типу головне значення має співвідношення позитивних зарядів основного барвника і негативних зарядів кислотних груп біополімерів[27].Як відомо, в основному в біополімерах містяться наступні кислотні групи – SO4 (сульфатировані мукополісахариди), РО4 (нуклеїнові кислоти), СОО-(гіалуроновакислота і білки). Використання барвника при визначених рН дає можливість виключити фарбування білків [15, 27].

Проведені експерименти із застосуванням АО [31] дозволили зробити ряд висновків про значення рН флуорохрому в процесі люмінесцентномікроскопічного дослідження НК. Зокрема, вони продемонстрували, що при роботі з рН більше 5,5-6,0 можлива поява неспеціфічного (незалежно від присутності в молекулах НК одноланцюгових ділянок,) червоного світіння препарату[2, 15]. Ця небезпека різко зростає при наближенні рН флуорохрому до 6,5. При роботі з рН менше 2,5-3,0 РНК методом люмінесцентної метахромазії виявлена бути не може, не дивлячись на її наявність у препараті. Люмінесценція комплексів АО з ДНК не піддається настільки сильній зміні в залежності від рН флуорохрому. Принаймні, у межах рН від 3-5 ці комплекси зберігають яскраво-зеленулюмінесценцію. Звертаєна себе увагу той факт, що інтенсивність червоної люмінесценції комплексів АО з РНК зростає при підвищенні рН розчину в межах від 3 до 5. Причина цього явища полягає, цілком ймовірно, у тому, що при цьому збільшується кількість дисоційованих РО4 груп, яка уможливлює приєднання великих кількостей АО. Різні дослідники використовують для готування розчинів флуорохрому всілякі буферні суміші[31, 32].

В експериментах in vitro установлено, що характер зв’язування акридинових похідних з НК у великому ступені залежить від іонної сили середовища [33, 34]. Стосовно до флуорохромування гістологічних препаратів ця залежність була спеціально вивчена Риглером [13], який показав, що властивість АО утворювати димерні асоціати обернено пропорційно іонній силі середовища. При підвищенні останньої здатність до агрегирування падає, однак, у більшому ступені для АО, з’єднаного з спіралізованною НК(ДНК), чим з неспіралізованною (РНК). Ця обставина має дуже велике значення, тому що правильний добір іонної сили дозволяє досягти максимальної різниці в кольорі люмінесценції ДНК і РНК, флуорохромованих АО. За Риглером оптимальні умови створюютьсяпри використанні розчину флуорохрому з іонною силою, рівної 0,6[13, 15].

Іншою важливою умовою одержання надійних результатів, особливо в кількісних дослідженнях, є проведення флуорохромування таким чином, щоб інактивувались власні нуклеази клітин. Для цього необхідно проводити фарбування при температурі 20°С, а також використовувати буферну суміш, яка містить лимоннукислоту. Остання, осаджуючи двовалентні метали, перешкоджаючи тимсамимдії ДНК-ази. Все сказане дало підставу Риглеру рекомендувати для флуорохромування розчин АО в концентрації 10-4 М (разведення 1:30000) на цитратно-фосфатній буферній (ЦФБ) суміші[15].

# 1.5. Сучасний стан дослідження білок-синтетичної системи імуннокомпетентних клітин з використанням флуорохромних барвників та міток у спектральних методах аналізу.

Дослідження стану БСС ІКК на сьогодні залишається актуальним питанням для багатьох науковців. За активністю БСС клітин можна встановити стан імунної системи та спрогнозувати патологічні розлади в організмі людини. Сучасні органічні флуорохроми повинні володіти досить ефективною інтеркаляцією з нуклеїновими кислотами та протеїнами, низькою токсичністю та здатністю до поєднання декількох люмінофорів одночасно у одній системі [35, 36]. Оскільки нуклеїнові кислоти не володіють світлочутливістю в видимій області спектра (максимум поглинання основ ДНК знаходиться в районі 260 нм), тому використання нових та комбінованих люмінесцентних зондів підвищить можливість з’ясувати їх склад та спектральні властивості.

У залежності від експериментальних завдань, у сучасний наукових дослідженнях для флуоресцентного зонду пред'являють різноманітні особливі вимоги – використання у визначених діапазонах, конкретні значення квантового виходу флуоресценції, тимчасова життєдіяльність молекули у вдосконаленому стані, зміна дипольного моменту при збудженні. Часто велике значення має заданий розмір і конформація молекул флуорофорів, селективність або мала вибіркова характеристика спектрального ефекту[37]. Тому пошук нових флуоресцентних молекул є актуальною проблемою, привабливою увагою спеціалістів з різних обласних біологічної та медичної хімії, біофізиків, органічного синтезу.

Аналізуючи стан сучасних досліджень нуклеїнових кислот спектральними методами, слід зазначити, що впроваджуються флуорохромні барвники у вигляді біополімерних плівок та у складі матриць[38].

Прояв того чи іншого способу зв'язування ліганда з певними структурами ДНК залежить від концентрації цих речовин. З цієї точки зору певний інтерес представляє дослідження взаємодії двох різних, проте однаковим за механізмом зв’язування лігандів з ДНК. Досить цікавим та новим є дослідження вірменських вчених[39] потрійна система ДНК-Бромистий етидій(БЕ)-АО, оскільки основним способом зв’язування і БЕ, і АОє інтеркаляція. Необхідно відзначити, що БЕ є класичним інтеркалятором і відповідним об'єктом для моделювання молекулярних механізмів взаємодії різних з’єднань з ДНК, так як для комплексів БЕ-ДНК розроблена теоретична модель структурного переходу спіраль-клубок. БЕ[40],а також інші ліганди (Hoechst 33258, актиноміцин Д) можуть зв'язуватися з ДНК декількома способами. Зокрема, в разі БЕ виявляється три способи зв'язування з двохланцюговою ДНК-інтеркаляційний, полуінтеркаляційний і електростатичний, які до того ж універсальні і проявляються незалежно від іонної сили розчину, pH або інших зовнішніх факторів. Цей факт дозволяє систему ДНК-БЕ застосувати в якості фундаменту в дослідженнях по взаємодії різних лігандів з ДНК. Зокрема, ця модель може стати інформативною як для досліджень по взаємодії інших інтеркалятору з ДНК, так і для досліджень спільної взаємодії двох лігандів з нею.При цьому інтеркаляційний спосіб зв'язування БЕ переважає над інтеркаляцією АО [41, 42].

Використання флуорохрому АО у плівці має різний квантовий вихід залежно від її стану[43].Згідно дослідженням російських вчених[44], якщо суху плівку ДНК-АО піддати зволоженню, її спектр поглинання у видимій області зазнає змін: димерна смуга в області 476 нм зникає, а мономерний максимум при 502 нм зростає, і при відносній вологості середовища 95% спектр стає повністю «мономерним». При висиханні плівки її спектр повертається до початкового стану. Процеси, що лежать в основі спостережуваних ефектів, пов’язані з оборотним конформаційним переходом між денатурованою ДНК і її нативною формою. Такий перехід призводить до зміни типу комплексів зв'язування АО з ДНК. При зволоженні сухої плівки відбувається дисоціація димерів барвника з подальшою інтеркаляцією мономерних молекул між парами основ. Зазначений процес доступний для моніторингу у видимій області, що може бути покладено в покращення підходів застосування АО[44, 45].

Методами абсорбційної і люмінесцентної спектроскопії досліджені спектри поглинання і люмінесценції барвника АО, інтеркальованого в складну біополімерну желатин-хітозанову матрицю в стані плівки, що дає змогу встановити залежність між інтенсивністю люмінесценції катіонного барвника і складом біополімерної матриці [46]. Спектри поглинання АО в плівках желатину і суміші желатину з хітозаном при концентраціях барвника 1,5⋅10-2 моль/л становить 440-520 нм. Варто відзначити, що при такій концентрації АО зазвичай має місце концентраційне гасіння люмінесценції барвника в матриці желатину. При додаванні в плівці хітозану до желатину висота короткохвильового максимуму при 476 нм падає, що може свідчити про зменшення кількості димерів в системі[46]. З цього слід очікувати, що люмінесценція в желатин-хітозановий матриці буде ефективніше, ніж в матриці желатину, а ефективність люмінесценції, навпаки, збільшується.

Вченими Оренгбурського державного університету [47] були досліджені флуоресцентні властивості барвника піроніну G, впровадженого в матрицю ДНК у формі біополімерної плівки, стабілізованої гліцерином. Спектр флуоресценції піроніну G в плівці ДНКгліцеріну, отриманий при лазерному збудженні на довжині хвилі 532 нм. Потужність збудливого лазерного випромінювання у всіх випадках становила 1 мВт. Наявність інтенсивної флуоресценції і незалежність її спектра від довжини хвилі збудження свідчать про те, що молекули піроніну G в плівці ДНК, стабілізованої гліцерином, являють собою оптично активні центри одного типу. У сухих плівках ДНК флуоресценція піроніну G практично відсутня.Особливістю підходу до створення плівкових структур на основі комплексів ДНК-органічний барвник є відсутність ПАР як необхідного компонента Це істотно спрощує процедуру отримання плівок, і головне, дозволяє використовувати переваги внутрішньоспіральної упаковки молекул барвників.

На сучасному етапі досліджень французькими вченими[48] описаний надзвичайно простий, недорогий і надійний метод для ДНК-маркування клітин і електрофоретичних гелів з використанням дуже добре відомого гістологічного фарбування металевого зеленого (МЗ). МЗ, який використовується в дуже низьких концентраціях при фізіологічному pH, показав відносно вузькі спектри збудження і емісії, з піками при 633 і 677 нм відповідно і дуже високою стійкістю до фотознебарвлення. Його можна використовувати в поєднанні з іншими звичайними мітками або антитілами, ДНК без будь-якого видимого втручання або просочування. Крім того, флуоресценція МЗ може використовуватися в якості барвника для прямого виміру життєздатності за допомогою мікроскопії та проточної цитометрії, з повною кореляцією з фарбуванням БЕ. Таким чином, МЗ є дуже зручною альтернативою використовуваним в даний час барвників з червоним випромінюванням[37, 48].

Спектрально-люмінесцентні дослідження комплексів барвника сульфородаміна В з хітозаном показує досить ефективні результати з проявами суперлюмінесценції[49]. Оскільки хітозан є полікатіонним полімером, то зв'язування аніонних барвників з ним може бути приводити до формування комплексів мономерного барвника-хітозан з високою щільністю упаковки барвника. Спектри поглинання і люмінесценції сульфородаміна В у плівках хітозану становить в межах 600 нм. Характерною особливістю відомого люмінофора аніонного барвника сульфородаміна В є його висока здатність до утворення ассоціатів у водних розчинах. Це істотно знижує вихід люмінесценції барвника. Введення барвника в матрицю хітозану призводить до формування комплексів «мономер барвника-біополімер», що значно зменшує кількість асоціатів барвника в системі і сприяє розвитку люмінесцентного каналу дезактивації енергії збудження. Слід зазначити, що даний метод дозволяє не застовувати ПАВ як стабілізуючий елемент[47, 49].

Багато специфічних флуоресцентних барвників часто використовуються для виявлення РНК, наприклад, Hoechst, який при зв’язуванні з РНК або ДНК збільшує свій квантовий вихід флуоресценції через збільшення часу життя [50, 51]. Hoechst 33258 вбудовується в основному в АТ-області. Відомо, що бісбензимідазол (похідне Hoechst 33258) може зв'язуватися з AT-сайтами в мінорній борозді ДНК, а також може добре взаємодіяти з GC-багатими сайтами, як в ДНК, так і в РНК[52]. Для Hoechst 33342 (більш гідрофобного через мембрани клітин, ніж Hoechst 33258), було показано, що він добре зв’язується з поверхнею тРНК, і його флуоресценція помітно збільшується[53]. Цей барвник відмінно пов’язується зі шпильковими олігонуклеотидами і розплетеними ділянками ДНК. У водних розчинах при нейтральних рН ~ 6,5-7 спостерігається багаторазове збільшення флуоресценції Hoechst 33258 при зв’язуванні з рРНК. Максимум спектру випромінювання Hoechst при цьому зсувається від 497 нм до 487 нм. Настільки невеликий зсув на 10 нм означає, що барвник налипає на поверхню рРНК, а не інтеркалює між площинами нуклеотидів. При додаванні рРНК в концентрації від 0,1 мкМ до 1 мкМ до розчину Hoechst спостерігалося збільшення флуоресценції барвника, що дозволяє впевнено визначати рРНК в зазначеному діапазоні концентрацій[52, 54].

Використання флуоресцентних методів попереджає не лише реєстрацію та аналіз положень амінокислотних залишків у білкових молекулах, але також широко застосовують спеціальні флуорохромні-зонди, які мають флуоресцентні властивості при використанні з білковими молекулами[55].

Центрами, відповідальними за оптичне поглинання, флюоресценцію та фосфоресценцію в біологічних молекулах, є групи атомів, що містять так звані π-електронвмісні системи. У протеїнах такі групи містяться в амінокислотах – фенілаланіні, тирозині та триптофані.Оскільки триптофан має найнижчий триплетний рівень, то енергію триплетного збудження може захоплювати саме він. Як результат має спостерігатися домінування флюоресенції та фосфоресценції триптофану в розчинах[56]. Однак у спектрах флюоресценції та фосфоресценції у разі низьких температур при збудженні за довжини хвилі 260 нм виявляються обидва компоненти розчинів. Лише за кімнатної температури дійсно має вияв в основному флюоресценція тирозину та триптофану. Однак це пов’язано з тим, що нуклеотиди за кімнатної температури мають дуже низький (10–5) квантовий вихід флюоресценції[57-59].

Похідні 2-(3-кумароїл)бензопірилію– новий клас органічних солей, молекули яких складаються з кумаринового і бензопіріловогофрагментів[60].Кумариновий фрагмент зустрічається з багатьма флуоресцентними фарбниками, а бензопіриловий катіон входить до складу природних пігментів – антоціанінів. Поєднання кумаринового та бензопірилового фрагментумає високу чутливість. Дослідження спектральних параметрівпохідних 2-(3-кумароїл)бензопірилію в органічних середовищах і у воді показали, що найкраще підходить для наступних випробувань для використання в якості флуоресцентного зонду. У присутності білка даний флуорофор демонструє важливий батохромний зсув полоси випромінювання, а також зростає інтенсивність флуоресценції, щодозволяє використовувати його для детекції низьких, до 2 × 10–6 моль/л, концентрації протеїнів у водних розчинах.

# 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

# 2.1 Характеристика клінічного матеріалу

Дослідження виконувалися на кафедрі фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медициниЗапорізького національного університету в навчально-дослідній лабораторії клітинної та організменної біотехнології ЗНУ.

В ході першого дослідження було обстежено 15 хірургічних хворих, оперованих із приводу пухлин головного мозку різної локалізації,до операції і після її закінчення. Групою порівняння служили 10 донорів крові, подібні з хворими віком. Для другого дослідження обстежували групу з 20 онкохворих 4 стадії захворювання різної етіології.В ході третього дослідження обстежували 15 хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервовї системи на 7 етапах обстеження. Препарати готували за описаним нижче способом, рівень люмінесценції визначали на мікроспектрофлуориметрі-2 (МСФ-2). Всі обстежуванні проходили лікування на кафедрі анастезіології та інтенсивної терапії Запорізької медичної академії післядипломної освіти.

# 2.2. Виділення лімфоцитів за градієнтом щільності у фіколл-урографіні

Лімфоцити виділяють з периферичної крові людини за методом Boyum (1968), заснованому на седиментації в одноступінчатому градієнті щільності фіколл-урографіну. Фіколл в даній суміші виступає як агент, який агрегує еритроцити, а урографін застосовують для створення ізотонічності і щільності 1,077 г/см3[61].

Принцип методу: гепаринізовану кров розводять в 3 рази культуральним середовищем і акуратно нашаровуються на градієнт фіколл-урографіну. Кров затримується над фіколлом і не змішується з ним. Поступово еритроцити склеюються фіколлом і опускаються на дно пробірки (рис. 2.1). Гранулоцити, що мають щільність більшу, ніж седиментуючий розчин, осідають разом з еритроцитами. Лімфоцити разом з моноцитами залишаються в інтерфазі, їх збирають, переносять в іншу пробірку і відмивають центрифугуванням. Метод не дає виходу більше 90% клітин [62].

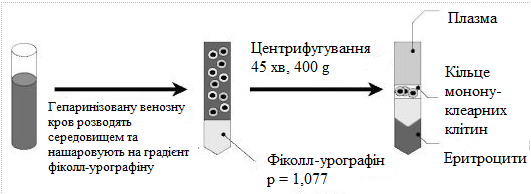


Рисунок 2.1 ‒ Виділення мононуклеарних клітин в градієнті щільності фіколл-урографіну[30]

# 2.3 Фіксація. Підготовка матеріалу для дослідження

Вибір фіксатора має безсумнівне значення. При проведенні якісногоаналізуНКіснує важлива умова – істотно не змінювати їх первинну і вториннуструктуру. Практично це означає, що фіксатор повинний давати можливість одержувати в результаті наступного флуорохромування найбільшу кольорову різницю між РНК (яскраво-червоне, багряне-червоне або оранжево-червоне світіння) і ДНК (зелене або, у крайньому випадку, жовто-зелене світіння).

Вибір фіксаторів, придатних для якісного люмінесцентномікроскопічного дослідження НК, досить широкий. Рекомендують усі ті фіксатори, що застосовують при гістохімічному дослідженні НК за методом Браше, насамперед рідина Карнуа, суміш етанолу з оцтовою кислотою, етанол і метанол.

Фіксатори, що містять солі важких металів, звичайно вважаються зовсім непридатними через здатність їх гасити люмінесцентне випромінювання. Слід зазначити зауваження, що формалін володіє здатністю активно взаємодіяти з ДНК, конкуруючи при цьому з АО за місця з’єднання з її молекулою[2].

Під час роботи з кислими фіксаторами (рідина Карнуа й інші суміші, що містять оцтову кислоту) фіксацію варто проводити в найбільш короткі проміжки часу і краще при низьких температурах (+2 –+4°С), що пов'язано з дією кислоти , яка ушкоджує ДНК [13, 15].

Дані про використання АО в кількісній гістохімії НК дуже обмежені. Найбільш повна робота такого роду належить Риглеру [13]. За даними цього дослідника, максимально сприятливі умови для проведення наступного кількісного дослідження створює фіксація в суміші етанол-ацетон (1:1) при кімнатній температурі. Автор [13] докладно досліджував дію на клітини запропонованого їм фіксатора і показав, що під його впливом не відбувається зморщування клітин і втрати ними НК.

Найбільш широко для люмінесецентномікроскопічного дослідження НК застосовують клітинні мазки і відбитки, а також одношарові препарати клітин тканинних культур. Однак, цілком можливо використання гістологічних зрізів, отриманих або з залитого в парафін, або з замороженого матеріалу.

# 2.4 Методи фарбування та оцінювання матеріалу дослідження

Мазки крові для люмінесценції готують з суцільної крові. Кращі результати отримують, якщо готувати мазки з лейкоконцентрату, отриманого доступним для даної лабораторії методом (спонтанне осадження еритроцитів, або за допомогою желатину, з використанням градієнтних розчинів). Слід зауважити, щоб уникнути неспецифічної люмінесценції, аутоплазму необхідно заміняти на ембріональну телячу сироватку (ЕТС), спонтанна люмінесценція якої знаходиться на мінімальному рівні[2].

Висушені на повітрі препарати фіксують у суміші ацетону та абсолютного етилового спирту в пропорції 1:1 20 хвилин, проводять через батарею разведення етилового спирту знижаючої концентрації: 96% 15 хв.; 60% 10 хв.; 30% 5 хв. На цьому етапі препарати після висихання можна берегти декілька місяців до використання. Подальша обробка препаратів полягає в промиванні дистильованою водою, інкубації в ЦФБ (рН=6,0)4 хв., флуорохромуванні АО у концентрації 1:20000 на такому ж буфері протягом 10 хв., двічі відмивають від непрореагувавшого АО у буфері по 2 хв. Для запобігання фотодеструкції наносять 2-3 краплі протектора. Далі клітини покривають покривним склом, окантовують від висихання 30% розчином полістиролу в ксилолі, сушать у термостаті при 370 С 20-30 хв[63].

Інтенсивність флуоресценції в спектрі збудження 436 нм оцінюють в умовних одиницях за допомогою люмінесцентного мікроскопу з приставкою цифрового лічильника або використовують мікроспектрофлуориметри, наприклад, МСФ-2, (виробник НПО "Біоприбор", м.Пущино, Московської області). З метою виключення впливу технічних варіацій методу на показники люмінесценції, контрольні та дослідні зразки препаратів аналізують одночасно. У різних місцях препарату за алгоритмом аналізу формули крові вимірюють інтенсивність люмінесценції в спектрі 640 нм 100 клітин (лімфоцитів). При аналізі 10-15 клітин у трьох місцях мазка визначають I640 фону і так далі до аналізу потрібної кількості клітин. Від I640 нм клітин віднімають середнє значення І640 фону для даної групи клітин[15, 63].

Оцінку синтетичної, а отже, й імунологічної активності лімфоцитів проводять за сумарним значенням І640 нм вивченої популяції клітин. Із загальної популяції проаналізованих клітин можна виділити частку активованих лімфоцитів. Для цього складають варіаційний ряд I640 нм лімфоцитів з інтервалом 0,1 у.о. [63].

# 2.5 Методи виділення, фіксації, фарбування клітин периферичної крові для підрахунку лейкоцитарної формули крові. Оцінка результатів

Для мазківвикористовували периферичну кров та виділяли клітини методом описаним у пункті 2.2. Предметні скельця я використовувала нові або заздалегідь вимиті розчином хромпіку (суміш К2Сг2О7та концентрованої Н2SО4) на 24 години. та знежиренісумішшю спирт-ефір [64].

Мазок крові робила за наступною схемою:

1. до купола краплі доторкаємося предметним склом на відстані 1,5-2 см від краю;
2. шліфоване скло ставимо перед краплею крові під кутом 45° так, щоб вона рівномірно розтіклася по ребру шліфованого скла;
3. рівномірним швидким рухом ведемо шліфоване скло справа наліво, не натискаючи і не піднімаючи скла від предметного (рис. 2.2), щоб запобігти механічному руйнуванню клітин.

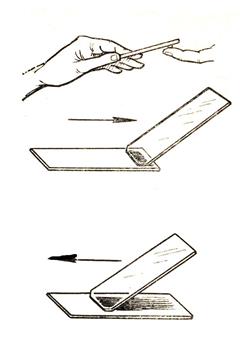


Рисунок 2.2 – Техніка приготуваня мазку крові[64]

Після висихання мазка на повітрі мазок фіксуємо метиловим спиртом, помістивши мазок у кювету протягом 3-5 хв. Фіксацію мазка крові проводимо для закріплення його на склі та запобігання гемолізові еритроцитів. Зафіксовані мазки виймаємо із фіксатора і ставимо у штатив вертикально для висихання на повітрі.

Фарбування мазків проводила за методом Романовського-Гімза (містить метилен-азур, метиленовий фіолетовий, метиленовий синій і еозин). Спочатку готуємо робочий розчин фарби. Готуємо кілька різних розведень барвника (1 крапля барвника на 1 мл дистильованої води, 2 краплі на 1 мл води та 3 краплі на 1 мл води). Необхідно 3-4 мл робочого розчину, який готуємо перед самим використанням [64].

Фіксовані мазки укладають на місток, що складається з двох скляних паличок, покладених на два протилежних краю кювети. Потім мазки заливають розведеною фарбою, яку наливають на мазок можливо більш високим шаром. Фарбування триває залежно від температури повітря в приміщенні від 25 до 45 хв. Після закінчення забарвлення фарбу змивають (але не зливають) сильним струменем води і ставлять мазки вертикально в дерев'яний штатив для просушування.

Підрахунок лейкоформули проводимо з урахуванням нерівномірного розташування лейкоцитів у мазку. При цьому просуваємо мазок по лінії меандра (рис. 2.3), заглиблюючись на 3-5 полів зору в його середину і на 2-3 поля зору до периферії мазка. Важчі лейкоцити (еозинофіли, моноцити) зустрічаються частіше по краю мазка, а легші (лімфоцити) - в середині. Підрахунок ведемо як по середині, гак і по краю мазка в тонкій його частині, де добре видно будову клітини. Облік кількості клітин ведемо за допомогою лічильника[64].

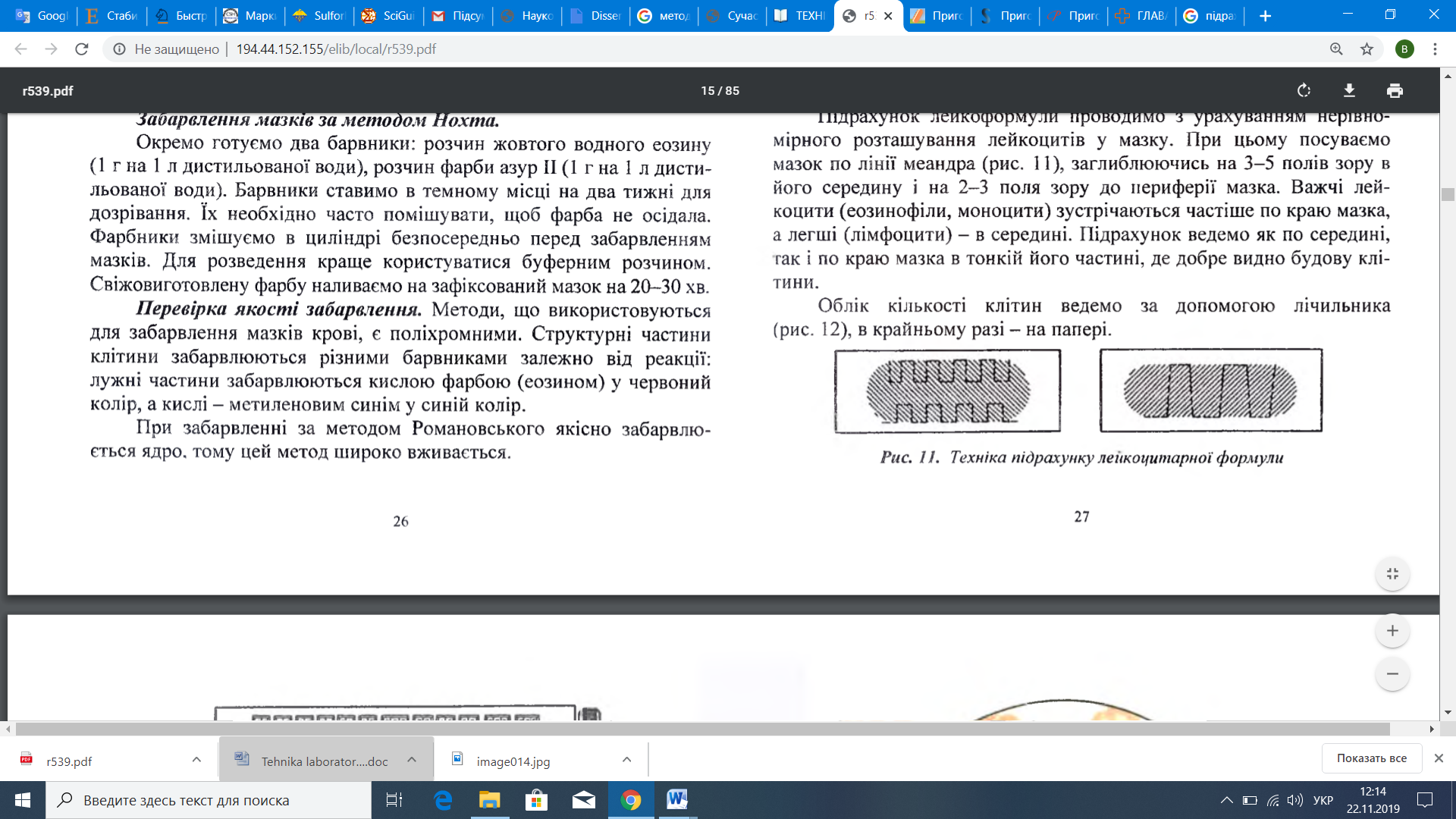


Рисунок 2.3 – Техніка підрахунку лейкоцитарної формули[64]

Підраховуємо 100-200 клітин, (якщо 200 клітин, то відповідно ділимо результат на два) і знаходимо процентний вміст кожного виду лейкоцитів.

Лейкоцитарна формула дає уявлення тільки про відносних величинах. Точніше уявлення про кількість тієї чи іншої групи лейкоцитів можна отримати після визначення абсолютного числа лейкоцитів в одному літрі крові.

Знаючи загальну кількість лейкоцитів в 1 л крові і процентний вміст кожного виду лейкоцитів, можна обчислити абсолютне їх число[64], тобто визначити, скільки клітин кожного виду міститься в 1 л крові за формулою 2.1.

= (2.1)

# 2.6Статистична обробка експериментальних даних

Статистична обробка експериментальних даних проводилась за допомогою комп’ютерної програми Microsoft Excel та STATISTICA.

Результати експерименту оброблені методами варіаційної статистики. Середнє арифметичне знаходили по формулі:

(2.2)

де – середнє арифметичне;

Σ*xі*–сума варіант;

*n* – число варіант у виборці.

Середнє квадратичне відхилення:

 (2.3)

де *хs*–індивідуальні значення окремої ознаки, варіанти;

 – середня арифметична;

*n*-1 – число ступенів свободи.

Помилка середнього арифметичного:

(2.4)

де – середнє квадратичне відхилення;

*S*– середня квадратична помилка окремої ознаки вимірювання;

*n*-1 – число ступенів свободи.

В багатьох дослідженнях виникає необхідність оцінити вірогідність різниці середніх арифметичних: середні арифметичні двох груп, які порівнюються, завжди в деякій мірі відрізняються одна від одної. Для рішення задач такого роду визначали різницю між двома середніми. Ця різниця (d) дорівнює:

(2.5)

де *d*–різниця між вимірюваними двома середніми арифметичними;

– середнє арифметичне першої групи;

– середнє арифметичне другої групи;

Середню помилку різниці обчислювали за формулою:

 (2.6)

де – cередня помилки різниці;

та  – середні помилки результатів, що порівнюються.

Далі розраховували розподілення вибіркових середніх арифметичних при малих вибіркових сукупностях, підставляючи отримані значення у критерій t-розподілення за Ст’юдентом:

 (2.7)

де *d*–різниця між вимірюваними двома середніми арифметичними;

та  – середні помилки результатів, що порівнюються.

Число ступенів свободи знаходили по формулі:

(2.8)

де*v*– число ступенів свободи;

n1 та n2 – число досліджень в обох групах.

На основі величини t та числа ступенів свободи по таблиці t-розподілення Ст’юдента визначали ступінь вірогідності відмінностей (p). Якщо p ≤ 0,05, відмінності отриманих результатів вважались вірогідними, що свідчить про їх правильність[65].

# 3ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

# 3.1 Інформативність показників лімфоцитів у периферичній крові хірургічних хворих люмінесцентної мікроскопіїз застосуванням акридинового оранжевого

Застосування спектральної техніки дозволяє одержувати досить надійні та відтворені результати виміру інтенсивності червоної і зеленої люмінесценції препаратів, пофарбованих АО[32].

За спектрами люмінесценції НК у клітинах, пофарбованих АО, можна з великою точністю судити про вторинну структуру НК, що у свою чергу характеризує білоксинтетичну активність клітини в цілому. Ріглер [13] у якості показника ступеня упорядкованості вторинної структури ДНК запропонував спеціальний коефіцієнт α, що представляє собою відношення інтенсивностей червоної (димерної, λ = 640 нм) і зеленої (мономерної, λ = 530 нм) люмінесценції АО.

Слід зазначити, що відомі способи визначення білоксинтетичної активності клітин по α-параметру мало придатні для повної характеристики клітин крові, що циркулюють. Клітини крові, що циркулюють: моноцити, гранулоцити,в тому числі й лімфоцити на відміну від мієлоїдних, лімфоїдних тканин, вийшли з мітотичного циклу і знаходяться в G0 стадії життєвого циклу. У цей період синтез НК знаходиться на мінімальному рівні, а ДНК у ядрі максимально конденсується (наростає дволанцюговість)[66]. Тому активність білоксинтетичної системи лімфоцитів визначається, в основному, кількістю синтезованих ще в мієлоїдних та лімфоїдних органах РНК. Данний висновок підтверджується нашими даними про слабку та недостовірну популяційну варіацію I530 нм (дволанцюгові НК, в основному ДНК), тоді як І640 нм (одноланцюгові НК, в основному РНК) набуває широкого діапазону. В такому випадку α-параметр не дає однозначної характеристики функціональної активності конкретної клітини крові. Він є відношенням інтенсивності люмінесценції при максимумі 640 нм до інтенсивності люмінесценції при максимумі 530 нм і може бути низьким при високих значеннях І640 і I530, високим при низьких їхніх значеннях і однаковим у клітин із різної І640і I530.

Слабка інформативність α-параметра стосовно білоксинтетичної функції клітин крові пояснюється ще і тим, що лейкоцити розрізняються за ступенем диференціювання. Лімфоцити периферичної крові, на відміну від сегментоядерцевих лейкоцитів, розрізняються за ступенем диференціювання і функціональної активності їх білоксинтетичної системи [67]. Але варіації I530їхніх ядер також відбуваються у вузьких межах за рахунок конденсації ДНК, яка спостерігається вG0-періоді життєвого циклу лімфоцитів. Метаболічна активність ДНК (редуплікація, транскрипція), що призводить до появи одноланцюгових НК, відбувалася в короткий період часу при імуногенезі ще в лімфоїдних органах[3]. У той же час продукти цієї транскрипційної активності різні види РНК (інформаційна, транспортна, рибосомальна), зберігаються в ядрі й особливо в цитоплазмі клітини значно довше, включаючи і лімфоцити крові, що циркулюють. Даний факт пояснює причини значно меншої варіації I530 у порівнянні з І640. Тому усі варіації α-параметра в клітинах крові, що відбиває їх білоксинтетичну активність, відбуваються за рахунок рівня І640.

Отже, при вивченні функціональної активності білоксинтетичної системи в клітинах периферичної крові досить і об’єктивніше аналізувати І640 замість α-параметра [63, 68].

Було обстежено 15 хірургічних хворих, оперованих із пухлиною головного мозку різної локалізації. Обстеження проводили до операції і після її закінчення. Групою порівняння служили 10 донорів крові, подібні з хворими віком. Препарати готували за описаним вище способом, рівень люмінесценції визначали на мікроспектрофлуориметрі-2 (МСФ-2). Отримані дані наведені в таблицях 3.1, 3.2.

З таблиці 3.1 видно, що навіть після сильного антигенного і стресорного впливу на організм, яким супроводжується операція, α-параметр у лімфоцитах крові не досягає достовірних різниць після операції в обстежених хворих, а також при порівнянні даного показника у донорів, унаслідок відсутності зрушень I530 до і після операції. Значні зрушення показників люмінесценції відбувалися тільки в спектрі І640 (таблиця 3.2).

Таблиця 3.1 ‒Характеристика активності білоксинтетичної системи лімфоцитів периферійної крові хірургічних хворих

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Контингент, етапи обстеження, кількість обстежених | Лімфоцити | | |
| I640 | I530 | α-параметр |
| Донори  (10 осіб) | 0,56±0,04 | 3,81±0,41 | 0,15±0,02 |
| До операції  (15 осіб) | 0,69±0,04 \* | 4,41±0,49 | 0,16±0,03 |
| Після операції  (15 осіб) | 0,93±0,05\* | 4,31±0,079 | 0,22±0,04 |
| Р  1-2  1-3  2-3 | <0,05  <0,05  <0,05 | >0,05  >0,05  >0,05 | >0,05  >0,05  >0,05 |

Примітки:

1. І640 – інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 640 нм.
2. I530 – інтенсивність люмінісценції при довжині хвилі 530 нм.
3. α-параметр – відношення І640 до І530 (І640/І530).
4. \* – достовірно відрізняється від показників донорів.

Високі і достовірні зміни інтенсивності люмінесценції відбуваються в лімфоцитах тільки в спектрі І640 (одноланцюгові НК). Лімфоцити активуються антигенами та аутоантигенами, перетворюючись у эффекторні і регуляторні клітини. В лімфоцитах , що циркулюють у крові накопичуються одноланцюгові НК (в основному РНК) під час попереднього імуногенезу в лімфоїдних органах.

У ході операції відбувається ушкодження структури тканин, що призводить до накопичення аутоантигенів. Морфогенетична функція лімфоцитів спрямована на усунення клітинного детриту і регуляцію процесу репаративної регенерації. В них активується білоксинтетична система, що супроводжується накопиченням одноланцюгових НК, у результаті чого І640наприкінці операції значно підвищується. Тому рівень зрушення І640у лімфоцитах, є показником активності в них білоксинтетичної системи, а, отже, і їх імунологічній активності.

Таблиця 3.2 ‒Характеристика активності білоксинтетичної системи лімфоцитів периферійної крові хірургічних хворих, визначена за рівнем інтенсивності люмінесценції при довжині хвилі 640 нм (I640)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Контингент, етапи обстеження, кількість осіб | I640лімфоцитів та фону разом | I640 фону | I640лімфоцитів |
| Донори  (10 осіб) | 0,95±0,06 | 0,39±0,02 | 0,56±0,04 |
| До операції  (15 осіб) | 1,07±0,06\* | 0,38±0,02 | 0,69±0,04\* |
| Після операції  (15 осіб) | 1,34±0,07\* | 0,41±0,02 | 0,93±0,05\* |
| Р  1-2  1-3  2-3 | >0,05  <0,05  <0,05 | >0,05  >0,05  >0,05 | <0,05  <0,05  <0,05 |

Примітка.\* – достовірно відрізняється від показників донорів.

Дані таблиці 3.2 також підтверджують наш висновок про те, що статистично стабільний рівень зрушення I530 у периферичних клітинах крові пов’язаний із конденсацією хроматину (ДНК) ядра. Деконденсація хроматину супроводжується появою одноланцюгових ділянок ДНК і синтезом РНК. Однак вона спостерігається при активації білоксинтетичної системи клітин, що знаходяться ще в мієлоїдних та лімфоїдних органах. Деконденсація ДНК є короткочасним процесом У лімфоцитах, що мігрували в периферичну кров, хроматин ядра знову конденсується, тому що клітини виходять з мітотичного циклу і знаходяться в G0 стадії. Тому I530, що відбиває ступінь конденсації НК і появу дволанцюгових структур досить стабільний показник для даного типу клітин периферичної крові і не може відбивати ступінь попередньої активації білоксинтетичної системи в кровотворних та лімфоїдних органах. Однак функціональним кроком цієї активності є накопичення в клітинах периферичної крові одноланцюгових НК, в основному РНК, що люмінесцюють у спектрі 640 нм, які зберігаються в циркулюючих лімфоцитах крові, легко доступних для аналізу при узятті крові. Отже, найбільш об'єктивним показником динаміки інтенсивності люмінесценції периферичних клітин крові, оброблених АО, є рівень І640, що відбиває активність білоксинтетичної системи лімфоцитів крові.

# 3.2 Дані люмінесцентного аналізу лімфоцитів крові, пофарбованих акридиновим оранжевим у хворих з злоякісними новоутвореннями.

В наступний час всановлено, що кожна пухлина, яка виникла внаслідок хімічного канцерогенезу, вірусного чи спонтаного походження, має антигени, які відрізняють її від тканини, з якої вона з’явилася [3, 63]. Такі антигени називають пухлиноспецифічними. Поява їх в крові викликає імунологічну відповідну реакцію. Однак пухлині захворювання, а також процес лікування пригнічують функціональну здібність імунокомпетентних клітин [61, 69, 70].

На першій стадії пухлиного захворювання лімфатичні вузли реагують гіперплазією лімфоїдної тканини та ретикулярних клітиних елементів.

Для демонстрації інформативності люмінесцентного методу при аналізі крові онкохворих була обстежена група з 20 онкохворих 4 стадії захворювання різної етіології. Мазки крові для люмінесцентного аналізу були надані науковим керівником та готувалися із суцільної крові. Результати люмінесцентного аналізу наведені в таблицях 3.3.

Таблиця 3.3 ‒Показники середніх значень люмінесценції лімфоцитів крові онкологічних хворих

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Тип клітин | Люмінесценція клітин, у.о. | | |
| I 530 | I 640 | α - параметр |
| 1 | Лімфоцити | 2,97±0,52\* | 1,15±0,10\* | 0,52±0,06\* |
| 2 | Лімфоцити (контроль) | 1,46±0,11 | 0,45±0,03 | 0,28±0,01 |

Примітка.\* – достовірно відрізняється від показників контролю, p<0*,*05.

Аналізуючи дані, наведені в таблиці 3.3, можна відзначити такі закономірності.

1. Інтенсивність люмінесценції лімфоцитів крові онкохворих вірогідно значно перевершує контрольної групи обстеження (I530 нм складає 203,42% від контролю, а І640 нм – 255,56%). Це обумовлено активацією імунної системи антигенами пухлинних клітин та величезною кількістю аутоантигенів, що утворюються при руйнуванні клітин у результаті багатократних сеансів хіміотерапії, променевої терапії та операційного втручання, тому що для всіх обстежених пацієнтів характерна 4-а стадія онкопроцесу.
2. Високий рівень І640 нм свідчить про процеси реплікації та транскрипції, що інтенсивно протікають в клітинних ядрах, і процесу трансляції в цитоплазмі у результаті антигенної стимуляції. Візуально це можна спостерігати у вигляді темно-червоного фарбування окремих лімфоцитарних ядер (у нормі фарбування ядра – зелене), що можна трактувати як ознаку бластності лімфоциту, тому що тотальна деконденсація хроматину можлива лише при реплікації, що активно протікає, у S-періоді. Крім того, І640 нм лімфоцитів була збільшена в порівнянні з контролем більше, ніж I530 нм (показанняα -параметра найчастіше перевищували одиницю).
3. α-параметр лімоцитів крові онкохворих також перевершував контрольні значення. Розмір α-параметру визначається в основному величиною І640 нм. Значення α-параметру для лімфоцитів склав – 185,71% від контрольного рівня.

Таким чином, активація імунної системи антигенами пухлинних клітин та величезною кількістю аутоантигенів призводить до активації білоксинтетичної системи великої кількості лімфоцитів, що в свою чергу відбивається на поліфункціональній напрузі імунної системи онкологічних хворих.

# 3.3 Дослідження активності лімфоцитів крові хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи

Уточнена діагностика і лікування пухлин ЦНС займають виняткове становище не тільки тому, що їх розвиток контролює особливий імунний механізм – гематоенцефалічний бар’єр, а й тому, що у вітчизняній практиці ці проблеми вирішує нейрохірург, діяльність якого рідко передбачена в штаті навіть великих онкологічних установ. Ці пухлини розвиваються в порожнині черепа і спинномозковому каналі, які представляють собою простір, обмежений з усіх боків практично нерозтяжною твердою оболонкою, кістками і зв'язками. Пухлини відрізняються своєрідністю гістогенезу і клінічних проявів. Будь-об'ємний процес, а пухлини найчастіше мають також властивості об'ємного процесу, в цьому замкнутому просторі викликає здавлення прилеглих відділів мозку і підвищення внутрішньочерепного тиску[70, 71].

В ході дослідження було обстежено 15 хірургічних хворих пухлинами ЦНС та периферичної НС у яких вивчався вплив операційної травми на функціональний стан імунної системи. Всі досліджувані групи клінічних спостережень є репрезентативними за віком та об'ємом оперативних втручань. Мазки крові для дослідження були надані науковим керівником та готувалися із периферичної крові для дослідження лейкоцитарної формули крові та лейкоконцетрату для люмінесцентного методу.Результати люмінесцентного аналізу та визначення загальної формули кровінаведені в таблиці3.4-3.6.

Відповідно до таблиці 3.4 та 3.5 на контрольному етапі дослідження різко виражених порушень лейкоцитарної формули виявлено не було.

Таблиця 3.4 – Абсолютні показники лейкоцитарної формули хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи за етапах обстеження

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ета-пи обс-теження | Кіль-кість лейко-цитів,  Г/л | Формула крові | | | | |
| Еозинофіли, | Нейтрофіли | | Моноцити | Лімфоцити |
| Г/л | П,  Г/л | С,  Г/л | Г/л | Г/л |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 7,07±  0,51 | 0,18±  0,02 | 0,29±  0,03 | 4,35±  0,30 | 0,32±  0,03 | 1,92±  0,13 |
| 2 | 7,09±  0,71 | 0,17±  0,02 | 0,37±  0,04 | 4,43±  0,28 | 0,32±  0,04 | 1,79±  0,16 |
| 3 | 6,16±  0,60 | 0,17±  0,01 | 0,19±  0,02\* | 3,74±  0,19 | 0,29±  0,03 | 1,77±  0,14 |
| 4 | 7,23±  0,65 | 0,16±  0,01 | 0,31±  0,03 | 4,44±  0,26 | 0,28±  0,02 | 1,82±  0,15 |

Продовження таблиці 3.4

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 5 | 11,73±  0,98\* | 0,20±  0,02 | 0,62±  0,06\* | 8,32±  0,47\* | 0,40±  0,05 | 2,13±  0,21 |
| 6 | 13,34±  1,13\* | 0,16±  0,01 | 0,79±  0,08\* | 9,33±  0,52\* | 0,47±  0,06\* | 2,65±  0,17\* |
| 7 | 12,02±  1,18\* | 0,25±  0,03 | 0,43±  0,04\* | 8,25±  0,44\* | 0,49±  0,06\* | 2,44±  0,15\* |

Примітки:

1. 1-й етап – контроль (вихідний стан).
2. 2-й етап – 30-40 хвилин після премедикації.
3. 3-й етап –через 30-40 хвилин після індукції та інтубації трахеї.
4. 4-й етап – травматичний етап операції.
5. 5-й етап – кінець операції.
6. 6-й етап – наступний день після операції.
7. 7-й етап – тиждень після операції.
8. \* – достовірно відрізняється від показників контролю, p˂0*,*05*.*

Індукція і перехід хворих на штучну вентиляцію легень супроводжувалися зменшенням числа майже всіх типів клітин крові. Кількість моноцитівта еозинофіліву відносних та абсолютних показниках значно не змінювалася на всіх етапах. Перерозподіл клітин білої крові на даному етапі характерно для фази тривоги при розвитку загального адаптаційного синдрому за Сельє.

Загальна кількість лейкоцитів, починаючи з четвертого етапу зростала до 6-ого етапу (доба після операції), на якому досягала максимуму (188,68%). Звертає на себе увагу різке достовірне збільшення кількості лейкоцитів наприкінці операції в порівнянні з попереднім етапом (11,73±0,98 і 7,23±0,65 відповідно), що пояснюється посиленням антигенного навантаження в результаті операційної травми. Розвиток лейкоцитозу в ході обстеження відбувався в основному за рахунок нейтрофільозу.

Таблиця 3.5 – Відносні показники лейкоцитарної формули хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи за етапах обстеження

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ета-пи обс-теження | Формула крові | | | | |
| Еозино  філи,  % | Нейтрофіли | | Моноцити  % | Лімфоцити  % |
| П,% | С,% |
| 1 | 2,64±  0,20 | 4,22±  0,22 | 61,61±  2,19 | 4,61±  0,39 | 26,92±  1,86 |
| 2 | 2,36±  0,25 | 5,23±  0,25\* | 62,57±  1,76 | 4,64±  0,41 | 25,27±  1,46 |
| 3 | 2,63±  0,15 | 3,22±  0,27 | 60,84±  1,43 | 4,84±  0,42 | 28,5±  1,37 |
| 4 | 2,21±  0,17 | 4,26±  0,33 | 61,53±  3,54 | 3,89±  0,25 | 27,05±  2,68 |
| 5 | 1,74±  0,13\* | 5,34±  0,35\* | 70,97±  2,82\* | 3,47±  0,21\* | 19,92±  1,51\* |
| 6 | 1,24±  0,10\* | 5,95±  0,41\* | 70,00±  2,91\* | 3,53±  0,24\* | 19,26±  1,03\* |
| 7 | 2,15±  0,18 | 3,62±  0,24 | 68,69±  3,49 | 4,12±  0,32 | 21,46±  1,63\* |

Примітки:

1. 1-й етап – контроль (вихідний стан).
2. 2-й етап – 30-40 хвилин після премедикації.
3. 3-й етап –через 30-40 хвилин після індукції та інтубації трахеї.
4. 4-й етап – травматичний етап операції.
5. 5-й етап – кінець операції.
6. 6-й етап – наступний день після операції.
7. 7-й етап – тиждень після операції.
8. \* – достовірно відрізняється від показників контролю, p<0*,*05.

Динаміка кількості лімфоцитів в ході хірургічного лікування була подібна динаміці кількості лейкоцитів: зменшення на 2-3 етапах (93,23% і 92,19% відповідно) з наступним збільшенням, починаючи з 4-ого етапу до максимуму на 6-ому етапі (138%). Максимальна кількість лейкоцитів і лімфоцитів на шостому етапі збігалася з максимумом кількості ПЯН 0,79±0,08 та 5,95±0,41% відповідно (141% від вихідного рівня), що говорить про зрушення лейкоцитарної формули вліво і про напругу імунітету через добу після операції.

На фоні лейко- та лімфоцитозу, що зберігаються, зменшення кількості лейкоцитів і лімфоцитів тиждень після операції (7 етап) у порівнянні з попереднім етапом рівень клітин становив 12,02±1,18 і 13,34±1,13 для лейкоцитів і 2,44±0,17 і 2,65±0,15 (21,46±1,63 і 19,26±1,03%) для лімфоцитів і зменшення ПЯН 0,79±0,08 і 0,43±0,04 (5,95±0,41 і 3,62±0,24%) свідчить про зниження напруженості протікання імунних реакцій.

Аналіз люмінесцентних показників (табл. 3.6) показує, що інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 640 нм (I640 нм) наростала в ході хірургічного лікування, однак це наростання було не рівномірним, та відбиває стресорний вплив на організм.

На етапі премедикації інтенсивність люмінесценції падала (86,67% від предопераційного рівня) унаслідок негативної регуляції гормонів кортикостероїдів на імуногенез та міграцію лімфоцитів, тому що в цей період розвивався емоційний стрес.Після інтубації і введення в наркоз показник вирівнявся як наслідок дії анестезії. Однак у період травматичного етапу операції на 4 етапі, рівень I640 нм різко зростав до 164% від предопераційного рівня (0,74±0,05). Це зростання можна пояснити активацією БСС при імуногенезі у відповідь на травму, а також перерозподілом активованих лімфоцитів у зону альтерації. До кінця операції показник ще більше збільшився і залишався на тому ж високому рівні і добу після операції (0,87±0,05 на п'ятому етапі і 0,80±0,04 на шостому). На 7 день після операції під час загоєння рани показник досягав максимуму (0,96±0,05 – 213,33%), але мабуть вже не тільки як відбиток імуногенезу, а як показник додаткового виходу у периферичну кров активованих лімфоцитів із рани.

Таблиця 3.6 – Показники люмінесцентного аналізу хірургічних хворих з пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи за етапами обстеження

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники люмінесценції | Етапи обстеження | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| І530 | 1,46±  0,11 | 1,87±  0,13\* | 1,55±  0,09 | 1,48±  0,10 | 1,75±  0,11\* | 1,24±  0,08 | 1,62±  0,09\* |
| І640 | 0,45±  0,03 | 0,39±  0,03 | 0,49±  0,04 | 0,74±  0,05\* | 0,87±  0,05\* | 0,80±  0,04\* | 0,96±  0,05\* |
| α-параметр | 0,28±  0,01 | 0,21±  0,01 | 0,30±  0,02 | 0,49±  0,03\* | 0,49±  0,03\* | 0,63±  0,03\* | 0,58±  0,04\* |

Примітки:

1. 1-й етап –контроль (вихідний стан).
2. 2-й етап – 30-40 хвилин після премедикації.
3. 3-й етап –через 30-40 хвилин після індукції та інтубації трахеї.
4. 4-й етап – травматичний етап операції.
5. 5-й етап –кінець операції.
6. 6-й етап –наступний день після операції.
7. 7-й етап –тиждень після операції.
8. І 530 –інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 530 нм.
9. І640 –інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 640 нм.
10. α-параметр – відношення І640 до І530 (І640 /І530).
11. \* – достовірно відрізняється від показників контролю, p<0*,*05.

# 3.4 Кількісний метод оцінки люмінесценції лімфоцитів крові за допомогою оптичної фотокамери

Одним із перспективним напрямів кількісного методу оцінки стану імунної системи є люмінесцентний аналіз мазків пофарбованих АО, що надалі і є головним напрямом мого дослідження [71].

Інтенсивність флуоресценції в спектрі збудження 436 нм оцінювали в умовних одиницях за допомогою люмінесцентного мікроскопу з приставкою фотоелектропомножувача (ФЕП). АО в пофарбованих клітинах сприймає сигнал від джерела світла ртутної лампи та випромінює в більш довгохвильову частину спектру 530 та 640 нм за допомогою фотоелектронного помножувача. ФЕП-пристрій, призначений для підсилення слабкого[світлового](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%BB%D0%BE)сигналу й перетворення його в електричний. ФЕП складається із фотокатоду, з якого при поглинанні[кванта світла](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%BD)завдяки[фотоефекту](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B5%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82)вибиваються[електрони](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%95%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BD)та кількох додаткових електродів, з яких вибиті й прискорені електрони вибивають нові вторинні електрони завдяки[вторинній електронній емісії](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B0_%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%B0_%D0%B5%D0%BC%D1%96%D1%81%D1%96%D1%8F)[12].Але обробка приладів досить трудомістка та ФЕП-лампи дорогі за вартістю.

Тому надалі варіант реєстрації люмінесценції клітин за допомогою оптичної фотокамери, яка переводить зображення на монітор комп’ютера за допомогою програми GIMP. Також слід зазначити, що для даного дослідження беруться мазки-відбитки для більшої концентрації імунних клітин. Застосування мазків-відбитків при люмінесцентному аналізі з АО дозволяє підвищити оперативність люмінесцентного дослідження без утрати вірогідності і дозволяє рекомендувати цей спосіб як аналіз визначення оцінки імунної системи пацієнта в клінічних дослідженнях.Люмінесценція лімфоцитів зроблена за допомогою оптичної фотокамери наведена на рисунку 3.1.

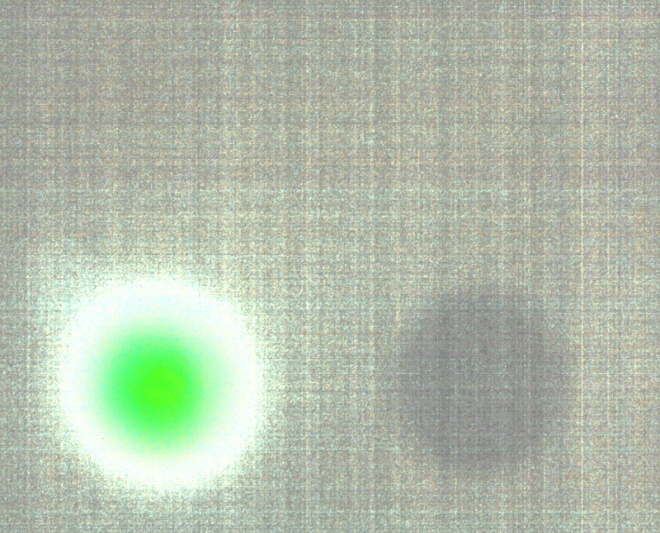


Рисунок 3.1 – Люмінесценція лімфоцитів реєстрована на оптичну фотокамеру та програмного забезпечення GIMP

GIMP – програмне забезпечення для роботи над зображеннями. Її можна використовувати як простий графічний редактор, мережеву систему пакетної обробки зображень і відтворення зображень, перетворювач форматів зображень. Фото даного дослідження представлено у додатках.

Таким чином є можливість оцінки активності білок синтетичної системи лімфоцитів та реєстрації кількості активованих клітин для оцінки стану імунної системи.

# 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

У процесі проведення імунологічних досліджень доводиться мати справу з біологічно активними речовинами, електроприладами і лабораторним посудом. Необережність при використанні хімічних препаратів і приладів, неуважність і неправильне проведення роботи можуть мати важкі наслідки. Тому, щоб звести до мінімуму ризик роботи, усі знання, які були отримані мною на таких предметах “Охорона праці”, “Неорганічна хімія”, “Органічна хімія”, “Аналітична хімія”, “Фізичні методи в біології” використовувалися на практиці.

Перед початком роботи над дипломом, зі мною був проведений інструктаж з охорони праці №60, та інструктаж з пожежної безпеки №62 науковим керівником; також застереження щодо роботи з хімічними препаратами та біологічними рідинами [72].

Мета даного розділу показати практичні вміння застосовувати теоретичне знання при вивченні охорони праці. Оскільки кваліфікаційна робота пов’язана з перебуванням у лабораторії, то я обов’язана була дотримуватися правил техніки безпеки. Працювала у лабораторії у зручному одязі, який не стримував рухів.

Об’єктом кваліфікаційної роботи була кров – біологічна речовина. Під час роботи слід дотримуватися правил техніки безпеки. Ці правила виконувались для попередження зараження хворобами, які передаються через кров, а саме СНІД, вірусний гепатит. Відомо, що кров є сприятливим середовищем для життєдіяльності мікроорганізмів, у тому числі – патогенних, через що роботу з кров’ю проводили згідно наказам №380, 408, 722, 1175 Міністерства охорони здоров’я України[73].

При роботі з кров’ю можливе її потрапляння на шкіру, одяг, слизові оболонки. Всі біологічні рідини треба сприймати як потенційно заражені ВІЛ-інфекцією, тому згідно приказу №120 МОЗ України від 20.05.00 розроблена перша допомога при цих випадках.

Так при потраплянні крові на халат, потрібно його зняти і замочити у дезінфікуючому розчині на 1 годину. Таким дезінфікуючим розчином може бути 0,5% р-н хлорантоіну, 0,5% р-н дезактину, 0,05% р-н бактоліну.

Якщо ж кров потрапила на шкіру, потрібно обробити уражену ділянку одним із дезінфіктантів – це може бути 700 спирт, 3% розчин перекису водню, 5 % розчин йоду. Потім промивають шкіру двократно під проточною водою з милом, сушать стерильним рушником і знову обробляють дезінфікатантом.

У разі потрапляннякрові на слизові оболонки очей потрібно промити очі великою кількістю води і закапати 30% р-ном альбуциду, якщо ж сироватка потрапила на слизові оболонки ротової порожнини, потрібно прополоскати рот 700 спиртом. Про всі випадки аварії потрібно повідомляти керівництво підприємства.

У лабораторії я ніколи не працювала самотньо, так як наявність другої особи необхідна для надання допомоги при нещасних випадках. Робота у лабораторії проводилася у зручному одязі, який не стримував рухів[74].Лабораторія – це окреме приміщення в ньому формується свій мікроклімат, який впливає на здоров’я людини. Під оптимальними мікрокліматичними умовами розуміють такі сполучення характеристик мікроклімату, які забезпечують при систематичній дії нормальне функціонування організму не напружуючи механізми терморегуляції. Показники, які характеризують мікроклімат: відносна вологість повітря, температура повітря, швидкість руху повітря, атмосферний тиск [75,76].

Згідно з діючими в нашій країні нормативними документамиГОСТ 12.1.005–88 "Загальні санітарно–гігієнічні вимоги до повітря робочої зони":

‒ температура повітря повинна складати 22-24°C;

‒ швидкість його руху – 0,1 м/с;

‒ відносна вологість повітря – 40-60%.

В теплі пори року:

‒ температура повітря дорівнює 23-25 °C;

‒ швидкість його руху – 0,1-0,2 м/с;

‒ вологість – 40-60%.

Температура повітря була оптимальною (18о-24оС). Відносна вологість повітря була така як в навколишньому середовищі. При підвищенні відносної вологості існує ймовірність порушення тепловіддачі і зниження працездатності людини[48]. Оптимальна швидкість руху повітря у приміщенні – 0,25-0,3 м/с.

Атмосферний тиск в лабораторії відповідав навколишньому середовищу. Оптимальним вважають атмосферний тиск 760 мм.рт.ст. Людина же може виконувати роботу в інтервалі 550 – 950 мм.рт.ст[77].

Гранично допустимі концентрації пилу і мікроорганізмів у зоні дихання працюючих встановлено ДОСТ 12.1.005-76. Пристрої для видалення надлишків теплоти, вологи, пилу, шкідливих парів та газів з приміщення відповідно до ДОСТ 12.1.005-88 утворюють систему вентиляції, яка забезпечує необхідний повітрообмін у лабораторії. Згідно Сніп 2.04.85-86 "Опалення, вентиляція, кондиціонування" і ДОСТ 12.04.021-75 "Системи вентиляційні. Загальні вимоги безпеки" повинні бути раціонально спроектовані, механічно і правильні експлуатовані природні вентиляційні системи.

При проведенні дослідів у лабораторії застосовувався хімічний посуд загального, спеціального призначення і мірний. Найбільш широко використовувалися пробірки. З метою попередження вихлюпування та потрапляння рідини на шкіру та одяг, я запобігала наповненню пробірки до країв. Категорично уникала закривання пробірки пальцем і струшування її в такому вигляді, оскільки можна ушкодити шкіру пальця. На випадок потрапляння на шкіру лугів чи кислот, її треба обробити розчином борної кислоти або розчином гідрокарбонату натрію, відповідно, які завжди стояли напоготові[76].

Відпрацьовані хімічні реактиви з пробірок виливала у спеціальний посуд. Утилізацію реактивів та миття пробірок проводив лаборант, який відповідає за це. Найбільш небезпечними речовинами в даній роботі є ацетон, толуол, спирт. Для запобігання вдихання їх парів, роботу проводила у витяжній шафі. Також уникала потрапляння цих речовин на шкіру й одяг.

Щоб уникнути потрапляння на шкіру та слизові оболонки шкідливих речовин після закінчення роботи, я завжди охайно знімала гумові рукавички та складала в призначеному місті для утилізації, мила руки з милом та обробляла їх спиртом, прала спецодяг.

При виконанні своєї роботи я використовувала природне освітлення та штучне освітлення. Відповідно до норми освітлення повинно бути 400 лк, але можуть бути і зміни цього показника в залежності від роботи. Освітлення об'єктів роботи має велике практичне значення. Освітлення повинно забезпечувати високу продуктивність праці, високу якість продукції, бути безпечним, викликати найменше загальне і зорове стомлення. Світло на робочих місцях повинно падати згори та зліва згідно СНіП 11-4-79від 12.01.2017 р. “Природне і штучне освітлення.” [78]. Місцеве освітлення має забезпечувати потрібну освітленість на окремих робочих місцях. Величина освітленості відповідно до санітарних норм СНіП 11-4-79 нормується залежно від точності роботи, яку виконують, типу ламп, що застосовується і виду освітлення.

Правила роботи з електроприладами були вивішені на видному місці. Згідно з цими правилами я ніколи не розкривала електрообладнання та не робила в ньому ремонт, не використовувала електроприлади з ушкодженою ізоляцією, а також не працювала з незаземленим обладнанням.

Дотримувалась правил протипожежної безпеки. При виникненні пожежі, в першу чергу, дії повинні бути спрямованні на забезпечення безпеки та евакуації людей. При виявленні пожежі необхідно вимкнути від енергопостачання прилади та обладнання; приступити до гасіння пожежі первинними засобами пожежегасіння, а при неможливості здійснення даних дій, вийти із приміщення, щільно зачинити за собою двері та вікна щоб запобігти приливу свіжого повітря, що сприятиме швидкому поширенню вогню. Негайно викликати пожежну охорону [79].

У разі виникнення непередбаченої екстремальної ситуації змогла б застосувати знання, отриманні при вивченні охорони праці, надати медичну допомогу у разі потреби, знаючи, що перша медична допомога потерпілим повинна надаватись негайно та правильно. У всіх випадках потерпілому забезпечується спокій, приток свіжого повітря. При роботі в лабораторії можуть виникати травми різного характеру внаслідок невмілого використання приладів та ін. Будь-яку рану очищують від забруднення, змазують краї настойкою йоду (рану промивати водою не можна), її дезінфікують 3% розчином перекису водню, накладають стерильну пов’язку. При роботі в лабораторії можуть виникати термічні опіки 1-го, 2-го і навіть 3-го та 4-го ступенів. Допомога при термічних опіках 1-го, 2-го ступеня: зняти обгорілі куски одягу, обробити обпечену поверхню 96% спиртом та накласти пов’язку з протиопіковою маззю[80].

Всі легкозаймисті й пожежнонебеспечні реактиви та матеріали зберігаються у герметичній шафі; луги й кислоти знаходяться окремо одне від одного. Легкі рідини містяться у хімічному посуді, що щільно закривається.

При проведенні дослідження працювала у гумових рукавичках, мила руки після проведення експерименту, так як досліджувані могли мати шкірні захворювання.

При проведенні досліджень я використовувала люмінісцентний мікроскоп. При роботі з люмінесцентним апаратом, його завжди облаштовували на стійкому, важкому столі. Його робота відповідала правилам охорони праці в лабораторіях згідно ДНАОП 2.1.20-1.20.03-75. З метою уникнення переантаження очей, що може привести до погіршення гостроти зору, я уникала тривалого контакту з мікроскопом. Після підрахунку кожної формули крові робила короткочасні перерви для відпочинку й здорової гімнастики [81].

Враховуючи, що тривала робота з комп’ютером призводить до іонізації приміщення позитивними та негативними іонами, я через кожну годину 20 хвилин робила перерви. В цей час провітрювалась кімната. Так як робота з комп’ютером є роботою з тривалим перебуванням в фіксованій позі, я виконувала під час перерви фізичні вправи та вправи для очей [82].

При виконанні робіт на комп'ютерах необхідно дотримуватись вимог загальної та даної інструкції з охорони праці.

Під час роботи на комп'ютерах можуть діяти такі небезпечні та шкідливі фактори, як:

‒ фізичні;

‒психофізіологічні.

Робочі місця мають бути розташовані на відстані не менше 1,5 м від стіни з вікнами, від інших стін на відстані 1м, між собою на відстані не менше 1,5 м. Відносно вікон робоче місце доцільно розташовувати таким чином, щоб природне світло падало на нього збоку, переважно зліва.

Враховуючи сучасне конструктивне оформлення комп'ютерної техніки - засіб індикації інформації, я дотримувалась при роботі таких правил:

1) не сідала ближче до екрану ніж 50-70 см, знаючи, що на цій відстані α- та β-частки втрачають свій заряд, чим вони найбільш шкідливо впливають на живі клітини організму. На відстані 50-70 см від екрану, негативний вплив частинок на ДНК-клітини практично відсутній;

2) γ-промені мають іонізуючу та велику проникаючу здатність. Іонізація живої тканини викликає зміни в ДНК та порушує кінетику їх розвитку. Під впливом іонізуючих випромінювань в організмі гальмується робота кровотворних органів, збільшується крихкість кровоносних судин, знижується опір організму інфекційним захворюванням. γ-промені можуть призвести до смертельного наслідку, а α- та β-частини до ураження шкіри та зміну генетичного коду;

3) враховуючи, що тривала робота з комп'ютером приводить до іонізації приміщення "+" та "-" іонами (аеронами), з котрих негативно на стан здоров'я впливають "+" аерони, я через кожну годину 20 хвилин робила перерви. Норма концентрації min аеронів від 160 до 5000 в 1 см3. Враховуючи, що робота з комп'ютером є роботою з тривалим перебуванням в фіксованій позі, я виконувала під час перерви фізичні вправи та вправи для очей[82].

Виконання правил пожежної безпеки протягом усього дослідження було обов’язковою умовою, що відповідало ДНАОП 0.01-1.01-95 [79]. У лабораторії завжди знаходилися вогнегасник та ковдра. При виникненні аварійної ситуації необхідно ліквідувати джерело її виникнення. При пожежі, в першу чергу, дії повинні бути спрямовані на забезпечення безпеки та евакуації людей. При виявленні пожежі, необхідно вимкнути від енергопостачання прилади та обладнання; приступити до гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння, а при неможливості здійснення даних дій, вийти з приміщення, щільно зачинити за собою двері та вікна, щоб запобігти приливу свіжого повітря, яке сприятиме швидкому поширенню вогню. Негайно викликати пожежну охорону.

Таким чином, охорона праці під час виконання кваліфікаційної роботи включала правові, соціально-економічні, організаційно-технічні, санітарно-гігієнічні, лікувально-профілактичні засоби та заходи, спрямовані на збереження здоров’я та працездатності. Дотримання встановлених вимог з охорони праці забезпечило створення безпечних умов проведення експерименту в польових умовах та обробки отриманої інформації в лабораторії в результаті чого я не отримала жодного травматизму.

# ВИСНОВКИ

1. У хірургічних хворих оперованих із пухлиною мозку різної локалізації α-параметр у лімфоцитах крові не досягає достовірних різниць після операції при порівнянні даного показника у донорів, унаслідок відсутності зрушень I530до і після операції. Значні зрушення показників люмінесценції спостерігалися тільки в спектрі 640 нм, що свідчить про активацію білоксинтетичної системи у результаті чого I640наприкінці операції значно підвищується.
2. Інтенсивність люмінесценції лімфоцитів крові онкохворих значно перевершує показники люмінесценції контрольної групи обстеження (I530 нм складає 203,42% від контролю, а I640 нм – 255,56%). Значенняα-параметру для лімфоцитів склав – 185,71% від контрольного рівня. Високий рівень люмінесценції лімфоцитів в крові при 640 нм та 530 нм онкологічних хворих 4 стадії свідчить про високу напругу імунної системи пацієнтів внаслідок розвитку глибокого вторинного імунодефіциту.
3. При підрахунку лейкоцитарної формули у хірургічних хворих із пухлинами ЦНС та периферичної нервової системи відзначається розвиток лейкоцитозу, починаючи з 4етапу, досягаючи максимуму на 6-ого етапі –188,68%, як результат антигенного навантаження в результаті операційної травми. Розвиток лейкоцитозу в ході обстеження відбувався в основному за рахунок нейтрофільозу.Максимальна кількість лейкоцитів(13,34±1,13), лімфоцитів(2,65±0,17 і 19,26±1,03%) та ПЯН (0,79±0,08 і 5,95±0,41%), відповідно 141% від вихідного рівня, що говорить про зрушення лейкоцитарної формули вліво і про напругу імунітету через добу після операції. Зменшення кількості лейкоцитів і лімфоцитів на 7-му етапі у порівнянні з попереднім етапом свідчить про зниження напруженості протікання імунних реакцій.
4. Аналіз люмінесцентних показниківу хірургічних хворих із пухлинами ЦНС та периферичної нервової системипоказує, що інтенсивність люмінесценції при довжині хвилі 640 нм наростала в ході хірургічного лікування, однак це наростання було не рівномірним, та відбиває стресорний вплив на організм. Починаючи з хірургічного втручання показник різко зростав. На 7 день після операції під час загоєння рани показник досягав максимуму (0,96±0,05 – 213,33%), як показник додаткового виходу у периферичну кров активованих лімфоцитів із рани.
5. Запропоновано метод кількісної люмінесценції з використанням акридинового оранжевого для оцінки функціональної активності лімфоцитів з використанням фотокамери та програми GIMP. Проведена модифікація приготування мазків для люмінесцентної мікроскопії з використанням АО для зниження погрішностей при проведенні досліджень. Застосування мазків-відбитків при люмінесцентному аналізі з АО дозволяє підвищити оперативність люмінесцентного дослідження без втрати вірогідності і дозволяє рекомендувати цей спосіб як аналіз визначення оцінки імунної системипацієнта в клінічних дослідженнях.

# ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати можуть бути використані в клініко-біологічних дослідженнях для формування наукових концепцій про механізми розвитку імунної відповіді, а також в медико-біологічній практиці для характеристики стану імунної реактивності людини.

В ході вивчення динаміки активності лімфоцитів, що циркулюють, виділено інформативні ознаки (I640 нм, I530 нм, α-параметр), що відображають їхній попередній імуноцитопоез у центральних та імуногенез у периферійних органах імунної системи, та відповідність основним етапам (активація, проліферація, диференціювання). По динаміці активованих лімфоцитів у ході операційного лікування та у постопераційний період досліджено напрямок міграції і депонування імунокомпетентних клітин в органах імунної системи, що дозволяє оцінювати інтенсивність відновлювальних процесів і прогнозувати післяопераційні ускладнення. Результати досліджень можуть мати практичне застосування в експериментальній біології та клінічній імунології.

Результати дослідження можуть бути використані в навчальному процесі кафедр фізіології, імунології медичних та біологічних вищих навчальних закладів та при викладанні дисциплін імунології.

# ПЕРЕЛІК ПОСИЛАННЬ

1. Хаитов Р. М. Иммунология : структура и функции иммунной системы : учебное пособие. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 280 с.
2. Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. Москва : Наука, 1978. 207 с.
3. Ройт А. Р., Бростофф Дж. А., Мейл Д. К. Иммунология / пер. с англ. В.И. Кандрора. Москва : Мир, 2000.592 с.
4. Абрамов М. Г. Гематологический атлас. 2-е изд. Москва: Медицина, 1985. 344 с.
5. Хаитов Р. М. Иммунология : ученик. 2-е изд., перераб. и доп. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. 528 с.
6. Ковальчук Л. В., Игнатьева Г. А., Ганковская Л. В. Иммунология: практикум, учеб. пособие. Москва : ГЭОТАР- Медиа, 2010. 176 с.
7. Змушко Е. И.,Белозеров Е. С., Митин Ю. А. Клиническая иммунология: руководство для врачей.Санкт Петербург: Питер, 2001. 576 с.
8. Ляликов С. А. Клиническая иммунология и аллерголория: учебное пособие. Минск : Вышейшая школа, 2015. 366 с.
9. Физическая химия. Физические методы исследования. Практикум : учебное пособие/ под ред.М. Я. Мельникова, Е. П.Агеева, В. В. Лунина. Москва : Академия, 2014. 528 с.
10. Лакович Дж. С. Основы флуоресцентной спектроскопии. Москва : Мир, 1986. 496 с.
11. Юденфренд С. А. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. Пер. с англ. В. Е. Барского / под ред. М. Н. Мейселя, Я. М. Варшавского. Москва : Мир, 1965. 484 с.
12. Маряхина В. С. Оптические методы в химии, биологии и медицине : монография. Москва : Наука, 2015. 141 с.
13. Карнаухов В. Н. Люминесцентный анализ клеток : учебное пособие. Пущино: ИБК РАН, 2002. 131 c.
14. Побилат А. Е. Флюоресцентная диагностика. Москва : LAPLambertAcademicPublishing. 2011. 176 с.
15. Зеленин A. B. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот. Москва : Наука, 1974. 184 с.
16. Roda A. К., Guardigli M. A. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Analyticalchemistry.* 2012. No 402(1). Р. 69-76.
17. Фролов А. К., Арцимович Н. Г., Сохнин А. А. Иммуноцитогенетика. Москва : Медицина, 1993. 240 с.
18. Любченко Г. А., Морєв Р. М., Холодна Р. С.Застосування флуоресцентних протеїнів для дослідження активації лімфоцитів.*BiotechnologiaActa*. 2013. № 1. С. 22-33.
19. ШиршевС. В.Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов по степени гашения биолюминесценции.*Иммунология.* 2015. № 6. С. 312-317.
20. Карнаухова Н. А., Сергиевич Л. А., Карнаухов В. Н. Двухволновая микрофлуоримитерия – метод исследования функциональной активности клеток иммунной системы. *Альманах клинической медицины*. 2008. № 17. С. 4-9.
21. Зеленин A. B. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой.Москва : Наука, 1971.231 с.
22. Борисова О. Ф., Тумерман Л. А.Применение люминесцентного красителя акридинового оранжевого для изучения вторичной структуры нуклеиновых кислот. *Биофизика.* 1965. Т. 10, №1. С. 32-36.
23. Борисова О. Ф., Минят Э. Е. Комплексы дезоксирибонуклеопротеида с акридиновым оранжевым. *Молекулярная биология.* 1969. Т.3, №5. С. 758-768.
24. Lerman L. S. Structural considerations in interaction of DNA and acridines. *Molecular Biology.* 1961. Vol. 3. P. 18-30.
25. Морозов Ю. В. Особенности люминесценции димеров акридинового оранжевого и родамина В. *Биофизика*. 1963. №8. С. 331-334.
26. Завгородняя Е. Т., Шахмардонов М. З., Исаева Н. П. Модифицированный метод определения функциональной активности лимфоцитов крови с использованием акридина оранжевого. *Клиническая лабораторная диагностика.*1993. №2. С. 75-76.
27. Зеленин А. В. Люминесцентная микроскопия в гистохимии нуклеиновых кислот. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* 1961. №40.С.88-98.
28. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов: учебно-методическое пособие. Санкт-Петербург : СОЛО, 2014. 108 с.
29. Спектроскопические свойства биополимерных пленок ДНК – акридиновый оранжевый /Ю. Д.Лантух и др. *Оптика и спектроскопия*. 2011. Т. 110, № 6. С. 932-937.
30. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство / Д. Э.Коржевский и др.; под ред. Д. Э. Коржевского. 2-е изд., испр. и доп. Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. 119 с.
31. Rodrigues-OrozcoR., Ruiz-Reyes A., Medina-Serriteno N.RecentApplicationsofChemiluminescenceAssaysinClinicalImmunology. *Mini Reviews in Medical Chemistry.*2010. V. 10. P. 1393-1400.
32. Рымарова М. В., Сипливая Л. Е.Фотолюминисцентные методы анализа: учебное пособие. Курск : КГМУ, 2015. 137 с.
33. KarnaukhovV. N., KarnaukhovaN. A., YashinV. A. Methodsandtechniquesofluminescentcytodiagnostics. *ONTISCBRA. Sci. USSR*. Pushchino,1984. Р. 32.
34. Гуртовой Р. И., Лампека Я. Д. Влияние строения ароматических соединений на люминесценцию композита цинксодержащего металл-органического каркаса с акридиновым оранжевым. *Теоретическая и экспериментальная химия.* 2016. № 4. С. 239-243.
35. Сибирцев В. С. Молекулярная люминометрия в биотехнологических исследованиях : учебное пособие. Санкт Петербург : Университет ИТМО, 2018. 62 с.
36. [Зайцев С. Ю.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=42976), [Шапошников М. Н.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=658232), [Соловьева Д. О.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=643487), [Царькова М. С.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=111184)Флуоресцентные красители: свойства и применение в клеточной биологии. [*Ветеринария, зоотехния и биотехнология*](https://elibrary.ru/contents.asp?id=34029487)*.* 2015. № 7. С. 73-85.
37. Terai T, Nagano T. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging*. Pflugers Arch*. 2015. V. 465. P. 347-359.
38. Thompson R. B. Fluorescence Sensors and Biosensors.*ChemBio*. 2006. V. 62. Р. 147-152.
39. Вардеванян П. О., Антонян А. П., Парсаданян М. А., Саакян В. Г. Исследование совместного связывания акридинового оранжевого и бромистого этидия с ДНК. *Ереванский государственный университет.* 2017. № 1. С. 74-82.
40. Kask P., Kaupo P., Fay N. et all. Two-Dimensional Fluorescence Intensity Distribution Analysis: Theory and Applications. *Biophysical journal.* 2000. V. 78. P. 1703-1713.
41. Nafisi A., Saboury N., Keramat N. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecukar Structure.* V. 2015. V. 827. P. 35-43.
42. Drummen G. P. C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques–Illuminating Biological and Biomedical Research. Molecules.2015. V. 17*.* P. 167-175.
43. KawabeY. etal. Thin-filmlasersbasedondye-deoxyribonucleicacid-lipidcomplexes.Appl. *Phys. Lett.* 2002. V. 81.P. 137-137.
44. [Лантух Ю. Д.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=54304), [Пашкевич С. Н.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=54302), [Летута С. Н.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=54303), [Алиджанов Э.К.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=109056), [Кульсарин А.А.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=608744)Нестационарная голографическая запись в биополимерных пленках ДНК-акридиновый оранжевый. *Оптика и спектроскопия.* 2013. № 2. С. 312-317
45. Лантух Ю. Д., Пашкевич С. Н., Алиджанов Э. К. Фотофизика оптических функциональных материалов на основе комплексов биополимеров с органическими красителями*. Вестник Оренбургского государственного университета.* 2015. № 13 (188). С. 162-167.
46. Тихонов Г. А., Лантух Ю. Д., Чайченко К. В. Спектры поглощения и люминесценции акридинового оранжевого в смешанной желатинхитозановой матрице. [*21 век : фундаментальная наука и технологии*](https://elibrary.ru/item.asp?id=32440180)*. 2017. Материалы XIV международной научно-практической конференции.* 2017. С. 93-96.
47. Тихонов Г. А., Лантух Ю. Д., Чайченко К. В. Люминесценция бинарной смеси ксантеновых красителей в биополимерной матрице. *Вестник Оренбургского государственного университета.* 2018. № 1. С. 2620-2625.
48. PrietoD., AparicionG., MorandeP. Afast, lowcost, andhighlyefficientfluorescentDNAlabelingmethodusingmethylgreen. [*Histochemistry and Cell Biology*](https://link.springer.com/journal/418)*.* 2015. V.142. P. 335-345.
49. Dongpeng Y. Sulforhodamine B Intercalated Layered Double Hydroxide Thin Film with Polarized Photoluminescence. *Physical Chemistry*. 2016. V. 113. P. 181-188.
50. ИбрагимовН. Е, КозловЕ. Н., КурбидаеваА. С., РябичкоС. С., [Шидловский Ю.В.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=112552) Современные методы визуализации РНК в клетке. *Генетика.* 2017. Т. 53. № 10. С. 1141-1152.
51. Eldh M., Lotvall J., Malmhal C. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. *Molecular immunology*. 2012. V. 50. P. 278-286.
52. [Дойникова А. Н.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=1015653), [Чаплыгина А. В.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=936705), [Фролова М. С.](https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=799096), Векшин Н. Л.Флуоресцентное определение микроколичеств РНК с использованием Hoechst 33258 и биназы. [*Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*](https://elibrary.ru/item.asp?id=39266853)*.*2019. № 1. С. 411-416.
53. [Chazotte](http://cshprotocols.cshlp.org/search?author1=Brad+Chazotte&sortspec=date&submit=Submit)B. Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Mol. Cell.*2016. V. 78. P. 245-253.
54. Дойникова А. Н., Векшин Н. Л. Детекция гидролиза РНК биназой по флуоресценции акридинового оранжевого. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 5. С. 465-470.
55. Zhijie C. Illuminating biology with engineered fluorescent proteins. *ChemBioChem*. 2016. V. 9. P. 210-213.
56. StecklA. J., SpaethH. DNAasanOpticalMaterial. *OPNOptics&PhotonicsNews.* 2015. V. 3. P. 35-39.
57. Longworth J. W. Luminescence of Polypeptides and Proteins. *Mol. Cell.* 2015. V. 25. P. 458-462.
58. Miller A., Fischer A., Laurence T. Single-molecule dynamics of phytochrome-bound fluorophores probed by fluorescence correlation spectroscopy. *Science.* 2006. V. 314. P. 300-306.
59. Аветисов Р. И., Чередниченко А. Г., Хомяков А. В., Аветисов И. Х. Методика измерения спектров фотолюминесценции порошков органических электролюминесцентных препаратов. [*Вестник Казанского технологического университета*](https://cyberleninka.ru/journal/n/vestnik-kazanskogo-tehnologicheskogo-universiteta)*.* 2015. Т.18. № 10. С. 47-49.
60. Скрипинец Э. В., Новиков А. И., Рошаль А. Д. Производные 2-(3-кумароил)бензопирилия как перспективные флуоресцентные зонды для детектирования протеинов в водных растворах. *Вісник НТУ «ХПІ».* 2015. № 28. С. 128-134.
61. Просекова Е. В., Забелина Н. Р., Сабыныч В. А. Иммунологические методы исследования в клинической лабораторной диагностике: учебное пособие. Тихоокеанский гос. мед. ун-т. Владивосток : Медицина ДВ, 2016. 117 с.
62. Лимфоциты: методы / под ред. Дж. Клауса ; пер. с англ. Москва: Мир, 1990.313с.
63. Федотов Є. Р. Вивчення функціонального стану лейкоцитів за допомогою кількісної люмінесценції із застосуванням акридинового оранжевого в комплексі імунологічних методів при різних патологіях : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09 / Запорізький національний університет. Запоріжжя, 2005. 147 с.
64. Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф. Гистология, эмбриология, цитология : учебник. 6-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицина. 2012. 800 с.
65. Володарський Є. Т., Кошева Л. О. Статистична обробка даних : навч. посібник. – Київ : НАУ, 2008.308с.
66. Молекулярная биология клетки : в 3 т. / Б. Альбертси др.2-е изд. Пер. с англ.Москва : Мир, 1994.Т. 2. 517 с.
67. Коржевский Д. Э. Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. 110с.
68. Фролов А. К., Шифрин Г. А., Федотов Е. Р., Грицаенко Ю. М. Люминесценция лейкоцитов крови, флюорохромированных акридиновым оранжевым, оперированных больных в динамике эмоционального, анестезиологического и хирургического стресса. *Цитология и генетика*. 1999.№ 6. С. 14-19.
69. Зубрицкая Г. П. Биофизические характеристики клеток крови и биологических жидкостей как показатели патологических состояний человека : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.01.02. Минск, 2016. 26 с.
70. Severin E. S., Moskaleva E. Y., Severin S. E. Modern approaches to cancer therapy: Immunoterapy and targeted drug delivery. *Russ. J. Immunol.* 2001. №4. Р. 345 - 356.
71. Wu B, Piatkevich K. D. Modern fluorescent proteins and imaging technologies to study gene expression, nuclear localization, and dynamics.*Curr. Opin. Cell Biol*.2011.Vol. 23. P. 310-317.
72. Правила безпеки при проведенні учбово-виховного процесу в кабінетах (лабораторіях) хімії загальноосвітніх учбових закладів: затв. наказом Міністерства надзвичайних ситуацій України від 16.11.98. № 222.Дата оновлення:16.07.2012.URL: https://dnaop.com/html/32262/doc9F\_80.2-1.01-12 (дата звернення: 15.04.2018).
73. Про затвердження Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях: затв.наказом Міністерством надзвичайних ситуацій України від 2013 р. № 1192. Київ : КМ, 2013. 31 с.
74. Про видачу спеціального одягу й інших засобів індивідуального захисту: Кодекс законів про працю України від 15.12.1993.№ 3694-12.*Відомості Верховної Ради України.*№ 163.Ст.62
75. Трахтенберг І. М., Коршун М. М. Гігієна праці і виробнича санітарія: навч.-метод.посібник. Київ: Основа,1997.464с.
76. Семенов А. С. Охорона праці і техніка безпеки по хімії:підр. посібник. Москва: Освіта, 1981.142 с.
77. ДСТУ 2293-99.Охорона праці. Терміни та визначення основних понять.[Чинний від 2014-12-02].Київ: Держстандарт України, 1999.22 с.
78. СНіП 11-4-79. Про природне і штучне освітлення. [Чинний від 2017-04-01]. Вид. офіц. Київ : Міністерство освіти і науки, 2017. 128 с.
79. Кузнєцов В. А. Пожежна безпека: навч.посібник. Харків: Фактор, 2008. 575 с.
80. Основи охорони праці: навч. посібник для студентів вищих закладів освіти України / за ред. Б. М. Коржика. Харків: ХДАМГ, 2002.105 с.
81. Охорона праці та промислова безпека :  навч. посібник / К. Н. Ткачук та ін. ; під ред. К. Н. Ткачука, М. О. Халімовського. Київ: Основа, 2006.448 с.
82. Основи охорони праці : підручник / О. І. Запорожець та ін. 2-ге вид. Київ : ЦУЛ, 2016. 264 с.

**Декларація**

**академічної доброчесності**

**здобувача ступеня вищої освіти ЗНУ**

Я Сухенко Валентина Сергіївна, студентка\_\_ІІ\_\_курсу магістратури,

форми навчання денна, факультету біологічного, спеціальність 109 Біологія, адреса електронної пошти [suhenkov57@gmail.com](mailto:suhenkov57@gmail.com),

* підтверджую, що написана мною кваліфікаційна робота на тему «Модифікації люмінесцентного аналізу при визначенні активності лімфоцитів з використанням акридинового оранжевого» відповідає вимогам академічної доброчесності та не містить порушень, що визначені у ст. 42 Закону України «Про освіту», зі змістом яких ознайомлена;
* заявляю, що надана мною для перевірки електронна версія роботи є ідентичною її друкованій версії;
* згодна на перевірку моєї роботи на відповідність критеріям академічної доброчесності у будь-який спосіб, у тому числі за допомогою інтернет-системи а також на архівування моєї роботи в базі даних цієї системи.

Дата\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Підпис\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ ПІБ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(студент)

Дата\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Підпис\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ ПІБ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(науковий керівник)