**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

|  |
| --- |
| Кафедра фізіології, імунології і біохімії |

з курсом цивільного захисту та медицини

|  |
| --- |
| (повна назва кафедри) |

**Кваліфікаційна робота**

|  |
| --- |
| магістра |

(рівень вищої освіти)

на тему: *Реакція бластної трансформації лімфоцитів периферичної крові на*

*фітогемаглютинін у жінок з гіперстимуляції яєчників*

|  |
| --- |
|  |

Виконав: студент II курсу, групи 8.0918-1

спеціальності 091 Біологія

 (код і назва спеціальності)

освітньої програми Біологія

 (код і назва освітньої програми)

 Є.О. Маломуж.

 (ініціали та прізвище)

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

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

Рецензент доцент, доцент, к.б.н. Н.В. Новосад

 (посада, вчене звання, научний 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

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри В.Д.Бовт

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ року

**З А В Д А Н Н Я**

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

 Маломужу Євгену Олександровичу\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. Тема роботи Реакція бластної трансформації лімфоцитів периферичної крові на фітогемаглютинін у жінок з гіперстимуляції яєчників.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

керівник роботи Копійка Віра Вікторівна, к.б.н, доцент\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

затверджені наказом ЗНУ від «\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ року № \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. Строк подання студентом роботи січень 2020
2. Вихідні дані до роботи Дипломна робота на тему «Реакція бластної трансформації лімфоцитів периферичної крові на фітогемаглютинін у жінок з синдромом гіперстимуляції яєчників». \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
3. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1) проаналізувати вміст лейкоцитів та дані лейкоцитарної формули крові у жінок з синдромом гіперстимуляції яєчників; 2) дослідити рівень реакції бластної трансформації лімфоцитів на фітогемаглютинін у жінок з розвитком синдрому гіперстимуляції яєчників; 3) провести статистичне прорівняння дослідних груп. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов’язкових креслень): Таблиці 1.1, 1.2, 3.1 – 3.6
4. Консультанти розділів роботи

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Розділ | Консультант | Підпис, дата |
| завданнявидав | завданняприйняв |
| 4 | Клімова О.О. к.б.н., старший викладач  |  |  |

Дата видачі завдання 20.09.2019 р.

 **КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №з/п | Назва етапів кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітки |
| 1. | Поповнення джерел літератури за темою кваліфікаційної роботи | Лютий-березень 2019 року | виконано |
| 2. | Оформлення розділу з огляду літератури | Березень - квітень 2019 року | виконано |
| 3. | Формування розділу «Матеріали та методи дослідження» | Травень 2019 року | виконано |
| 4. | Аналіз мікропрепаратів  | Червень-липень 2019 року | виконано |
| 5. | Формування бази даних результатів експериментальних досліджень | Липень-вересень 2019 року | виконано |
| 6. | Статистичний аналіз експериментальних даних | Жовтень 2019 року | виконано |
| 7. | Формування експериментальної частини, оформлення кваліфікаційної роботи | Жовтень-грудень 2019 року | виконано |
| 8. | Оформлення матеріалів до захисту, попередній захист кваліфікаційної роботи | Січень 2019 року | виконано |

Студент Є.О. Маломуж

Керівник роботи В.В. Копійка

**Нормоконтроль пройдено**

Нормоконтролер О.О. Клімова

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 68 сторінках друкованого тексту, містить 8 таблиць. Список літератури включає 56 джерел.

Об’єкт дослідження – синдром гіперстимуляції яєчників. Дослідження проведено на базі лабораторії клітинних популяцій ЗНУ та згідно Договору з клініко-діагностичною лабораторією комунальної установи «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької міської ради.

Метою роботи було дослідити показники лейкоформули та рівень реакції бластної трансформації лімфоцитів периферичної крові у жінок з синдромом гіперстимуляції яєчників (СГЯ).

В результаті дослідження було виявлено, що у осіб з ризиком СГЯ та ознаками CГЯ відмічене збільшення вмісту лейкоцитів за рахунок сегментоядерних нейтрофілів. Зниження рівня показників реакції бластної трансформації в групі з ризиком СГЯ пов’язане з початком розвитку запальної реакції і виснаженням специфічної ланки імунної системи.

Новизна роботи полягає в тому, що вперше отримані результати показників реакції бластної трансформації в умовах ризику та реалізації СГЯ.

Значущість роботи – результати дослідження поширюють уявлення про імунологічні показники при розвитку гіперстимуляції яєчників.

Отримані результати можуть бути використані як прогностичні критерії, які доповнюють загальну клінічну картину при діагностиці СГЯ.

СИНДРОМ ГІПЕРСТИМУЛЯЦІЇ ЯЄЧНИКІВ, КРОВ, ЛЕЙКОГРАМА, РЕАКЦІЯ БЛАСТНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ, ФІТОГЕМАГЛЮТИНІН.

ABSTRACT

The work outlined in 68 pages of printed text, contains 8 tables. The list includes 56 literature sources.

The object of study – the ovarian hyperstimulation syndrome. The study was conducted at the laboratory of cell populations of ZNU and under Contract with clinical diagnostic laboratory of the municipal institution "Regional medical center of human reproduction" Zaporizhzhya city Council.

The aim of this study was to investigate the indicators of leucoformula and the level of response of blast transformation of peripheral blood lymphocytes in women with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS).

The study found that individuals with a risk of OHSS and signs of OHSS showed an increase in leukocyte content due to segmented neutrophils. The decrease in the rate of blast transformation reaction in the group at risk of OHSS is associated with the onset of the development of an inflammatory response and the depletion of a specific element of the immune system.

The novelty of the work is that for the first time the results of the blast transformation reaction indicators under the conditions of risk and realization of OHSS are obtained.

Significance of work – the results of the study extend the idea of immunological parameters in the development of ovarian hyperstimulation.

The obtained results can be used as prognostic criteria, which complement the general clinical picture in the diagnosis of OHSS.

OVARIAN HYPERSTIMULATION SYNDROME, BLOOD, LEUKOGRAM, BLAST TRANSFORMATION REACTION, PHYTOHEMAGGLUTININ.

ЗМІСТ

[ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, 8](#_Toc29733379)

[СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ 8](#_Toc29733380)

[ВСТУП 9](#_Toc29733381)

[1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ 12](#_Toc29733382)

[1.1 Синдром гіперстимуляції яєчників 12](#_Toc29733383)

[1.1.1 Програма екстракорпорального запліднення 12](#_Toc29733384)

[1.1.2 Патогенез синдрому гіперстимуляції яєчників 14](#_Toc29733400)

[1.1.2.1 Фактори ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників 14](#_Toc29733401)

[1.1.2.2 Клінічні варіанти розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників 15](#_Toc29733417)

[1.1.2.3 Класифікація синдрому гіперстимуляції яєчників 15](#_Toc29733418)

[1.1.2.4 Фактори, які сприяють розвитку синдрому гуперстимуляції яєчників 16](#_Toc29733419)

[1.2 Дослідження функціонального стану лімфоцитів 19](#_Toc29733420)

[1.2.1 Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) 19](#_Toc29733421)

[1.3 Оцінка методу РБТЛ 23](#_Toc29733423)

[1.3.2 Метод постановки реакції бластрансформації лімфоцитів 25](#_Toc29733424)

[2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 28](#_Toc29733425)

[2.1 Схема дослідження 28](#_Toc29733426)

[2.2 Матеріал дослідження 29](#_Toc29733427)

[2.3 Методи досліджень 29](#_Toc29733429)

[2.3.1 Визначення кількості лейкоцитів 29](#_Toc29733430)

[2.3.2 Аналіз лейкоцитарної формули крові 31](#_Toc29733431)

[2.3.2.1 Приготування мазків крові 31](#_Toc29733432)

[2.3.2.2 Фарбування мазків за Уна-Паппенгеймом 32](#_Toc29733433)

[2.3.2.3 Складання лейкоцитарної формули 32](#_Toc29733434)

[2.3.4 Постановка реакції бластної трансформації лімфоцитів 34](#_Toc29733435)

[2.4 Статистична обробка отриманих результатів 34](#_Toc29733436)

[3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА 36](#_Toc29733437)

[3.1 Описова статистика лабораторних показників дослідних груп 36](#_Toc29733438)

[3.1.1 Описова статистика лабораторних показників у жінок без ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників 36](#_Toc29733439)

[3.1.2 Описова статистика лабораторних показників у жінок з ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників 38](#_Toc29733440)

[3.1.3 Описова статистика лабораторних показників у жінок з клінічними проявами синдрому гіперстимуляції яєчників 39](#_Toc29733441)

[3.2 Порівняння лабораторних показників дослідних груп за U-крітерієм Манна-Уітні 41](#_Toc29733442)

[4 ОХОРОНА ПРАЦІ 46](#_Toc29733443)

[ВИСНОВКИ 61](#_Toc29733444)

[ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 62](#_Toc29733445)

[ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ 63](#_Toc29733446)

#

# ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,

# СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ЕКЗ – екстракорпоральне запліднення

ІЛ – інтерлейкін

ІС – індекс стимуляції

Кон А – кофермент ацилювання

ЛПС – ліпополісахарид

РАС – ренін-ангіотензивна система

РБТЛ – реакція бластної трансформації лімфоцитів

РБТ – реакція бластної трансформації

СГЯ – синдром гіперстимуляції яєчників

СЕФР – судино-епітеліальний фоктор роста

ФГА – фітогемаглютинін

ФНП – фактор некрозу пухлин

ХГЛ – хоріонічний гонадотропін людини

ЛГ – пептидний гормон який секретується гонадотропними клітинами передньої долі гіпофіза

PWM – широтно-імпульсна модуляція, або модуляція за тривалістю імпульсів

# ВСТУП

Синдром гіперстимуляції яєчників (СГЯ) – ятрогенне (штучно створене) ускладнення медикаментозної стимуляції функції яєчників (суперовуляції), яке полягає в надмірній неконтрольованій реакції яєчників на стимуляцію, що має системний вплив.

Згідно з даними різних клінік, частота СГЯ становить від 0,08 до 33 % серед пацієнтів, що пройшли цикл екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). Частота важкого СГЯ – від 0,3 до 10 %. На жаль, реєструються летальні випадки – 0,5 % серед випадків важкого СГЯ, що загалом становить 1,5 випадків на 100 тис. проведених циклів ЕКЗ.

Сьогодні у зв’язку зі значним зниженням кількості випадків СГЯ взагалі, більшість вагітностей у результаті програми ЕКЗ настає без пізнього СГЯ. За ступенем тяжкості виділяють легку, середню та важку форми СГЯ.

Патогенетичний механізм СГЯ сьогодні до кінця не вивчений і є предметом обговорення. Дослідники погоджуються, що пусковим механізмом СГЯ є поява у крові хоріонічного гонадотропіну (ХГЛ), а у деяких випадках – передовуляторне підвищення рівня ЛГ.

Вважається, що вплив ХГЛ або ЛГ на гранульозні клітини фолікула стимулює утворення й виділення ними так званого фактору Х, який надалі стимулює ангіогенез у створеному жовтому тілі, зумовлює підвищення судинної проникності, що фізіологічно має сприяти функціонуванню жовтого тіла як активного ендокринного органу.

Більшість сучасних публікацій присвячених даній тематиці направлені на вивчення клінічних аспектів СГЯ; серед досліджень імунологічного статусу організму жінок є нечисленні дослідження цитокінового профілю у жінок з синдромом гіперстимуляції яєчників.

Мета роботи: дослідити показники лейкоформули та рівень реакції бластної трансформації лімфоцитів периферичної крові у жінок з синдромом гіперстимуляції яєчників.

Досягнення мети передбачало вирішення наступних завдань:

1. проаналізувати вміст лейкоцитів та дані лейкоцитарної формули крові у жінок з синдромом гіперстимуляції яєчників;
2. дослідити рівень реакції бластної трансформації лімфоцитів на фітогемаглютинін у жінок з розвитком синдрому гіперстимуляції яєчників;
3. дослідити показник кількості фолікулів у жінок, отриманих після їх гормональної стимуляції.

Об’єкт дослідження – синдром гіперстимуляції яєчників.

Предмет дослідження – особливості клітинних реакцій периферичної крові при гормональній стимуляції яєчників жінок.

Методи дослідження: загально-клінічні (загальний вміст лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові ), імунологічні (реакція баластної трансформації), статистичні з використанням методів описової статистики та U-крітерію Манна-Уітні.

Дослідження проведено на базі лабораторії клітинних популяцій ЗНУ та згідно Договору з клініко-діагностичною лабораторією комунальної установи «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької міської ради.

Теоретичне значення роботи полягає у розширенні знань щодо факторів які сприяють розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників, патогенезу та основних клінічних форм СГЯ.

Практичне значення роботи: результати дослідження розширють уявлення про стан лейкоцитарної формули крові та проліферативної здатності лімфоцитів у жінок з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників. Виявити вплив різних чинників на результат лейкоцитарної формули крові та перебіг реакції бластної трансформації лімфоцитів периферичної крові у без ознак СГЯ, з ризиком розвитку синдрому та з ознаками гіперстимуляції яєчників.

Робота була представлена на XI університетській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «МОЛОДА НАУКА-2018» (10-13 квітня 2018 року. у м. Запоріжжя) та VII регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених «актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук»(30 листопада 2019 року у м. Запоріжжя) – публікації тез доповіді.

# 1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

# 1.1 Синдром гіперстимуляції яєчників

# 1.1.1 Програма екстракорпорального запліднення

Екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ) – це допоміжна репродуктивна технологія, яка використовується у випадках безпліддя. Даний метод заснований на попередньому вилученні яйцеклітин з яєчників, з’єднання їх зі спермою у пробірці, з культуральним середовищем, і імплантація запліднених яйцеклітин в порожнину матки [1].

Лікування методом ЕКЗ включає в себе: гормональну терапію, за допомогою якої можливе дозрівання відразу декількох яйцеклітин в яєчниках (суперовуляція). На першому етапі використовуються агоністи гонадотропін-рилізинг-гормона, препарати людських менопаузальних гонадотропінів та препарати хоріонічного гонадотропіна людини. Дані гормони вводять за спеціальними лікувальними схемами. Процес дозрівання яйцеклітин контролюється за допомогою ультразвукового дослідження та визначення рівня гормонів.

Перед початком овуляції проводять пункцію фолікулів та аспірацію яйцеклітин. Дана процедура проводиться під УЗД – контролем через 36 годин після введення хоріонічного гонадотропіна, в операційній. Аспірація фолікулів проводиться з обох яєчників.

Для підготовки сперматозоїдів до запліднення проводять їх відмивання від елементів плазми та готують розчин з життєздатними сперматозоїдами. Після 5-7 годин находження в поживному середовищі відбувається з’єднання яйцеклітин і сперматозоїдів у «пробірці» і поміщають їх в інкубатор на 24-42 години. День пункції вважається нульовим днем культивування зародків, першим днем культивування є наступний день після пункції. Перші ознаки запліднення проявляються вже через 16-18 годин після змішування яйцеклітин та сперматозоїдів. Наступна оцінка запліднення проводиться через 24-26 годин після інсемінаціїї. Але одного запліднення яйцеклітин недостатньо для перенесення зародка в порожнину матки. Спочатку необхідно оцінити нормальність дроблення та розвитку ембріона. Перші прояви дроблення видно лише на другий день культивування. Доброякісних ембріонів переносять зазвичай на 2-й чи 3-й день культивування

Існує кілька модифікацій процедури ЕКО, в залежності від складності випадку безпліддя. В цілому цикл зазвичай триває близько 18-21 дня і складається з декількох етапів. Повний цикл включає стимуляцію яєчників, забір яйцеклітин, їх запліднення в пробірці і пересадку в порожнину матки. Щоб підвищити шанси на успіх, підсаджують 2 і більше ембріона. Іноді всі вони приживаються, і тоді народжуються двійні і трійні.

Можливі ускладнення при проведенні ЗІВ:

1. синдром гіперстимуляції яєчників (СГСЯ);
2. алергічні реакції, пов’язані з введенням лікарських засобів для контрольованої суперовуляції і підтримки лютеїнової фази стимульованого менструального циклу;
3. кровотеча;
4. гостре запалення або загострення хронічного запалення жіночих статевих органів;
5. позаматкова вагітність;
6. багатоплідна маткова і гетеротопічна вагітність;
7. перекрут яєчника;
8. апоплексія яєчника;
9. травма суміжних органів [2].

# 1.1.2 Патогенез синдрому гіперстимуляції яєчників

# 1.1.2.1 Фактори ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

Синдром гіперстимуляції яєчників – це ятрогенне ускладнення, в основі якого лежить гіперергічна відповідь яєчників на введення гонадотропінів в циклах стимуляції овуляції і в програмах допоміжних репродуктивних технологій [3].

За даними деяких авторів частота СГЯ варіює 0,5-14 % [3, 4], 0,5-22 % [5], 0,5-30% [6], тяжка форма зустрічається з частотою 0,2-10% [3, 7].

До факторів ризику розвитку СГЯ відносять:

1) молодий вік (<30 років);

2) низький індекс маси тіла – астенічний тип статури;

3) синдром полікістозних яєчників;

4) велика кількість антральних фолікулів в яєчнику, за даними УЗД, до початку стимуляції овуляції;

5) використання високих доз гонадотропінів для стимуляції овуляції;

6) використання ХГЛ замість прогестерону для підтримки лютеїнової фази після ЕКЗ;

7) швидко зростаючий або високий рівень естрадіолу в сироватці крові;

8) велика кількість дрібних фолікулів (від 8 до 12 мм), що визначаються при УЗД під час стимуляції яєчників;

9) епізоди СГЯ в анамнезі;

10) велика кількість отриманих ооцитів (>20) [6, 8]. За даними Е. Ф. Сафронової та ін. [9] більше 10 зростаючих фолікулів в одному яєчнику;

11) наявність алергійної реакції [10];

12) рання вагітність.

# 1.1.2.2 Клінічні варіанти розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

Розрізняють ранній СГЯ, який розвивається протягом перших семи днів після пункції фолікулів і асоціюється з введенням препаратів, що стимулюють ріст і дозрівання фолікулів. У разі імплантації ембріона, найчастіше спостерігається погіршення стану пацієнтки, що триває до терміну 12 тижнів вагітності. Однак, якщо вагітність не настає, симптоми раннього СГЯ при будь-якого ступеня його вираженості у більшості жінок зникають з настанням менструації. Лише в окремих пацієнток на тлі відсутньої вагітності симптоми СГЯ можуть зберігатися деякий час і навіть наростати. Пізній СГЯ, встановлюється при розвитку синдрому в період більше 7 днів після пункції фолікулів. Даний варіант СГЯ пов'язують з настанням вагітності і розглядають як наслідок активної продукції ендогенного ХГЛ [10].

#

# 1.1.2.3 Класифікація синдрому гіперстимуляції яєчників

Єдиної класифікації СГЯ не існує. На основі клініко-лабараторних досліджень виділяють 4 ступеня тяжкості даного синдрому (табл. 1.1) [10].

Таблиця 1.1 – Класифікація синдрому гіперстимуляції яєчників [10]

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ступінь СГЯ | Діаметр яєчників, см | Симптоми |
| Легка | < 8 | Абдомінальний дискомфорт, біль в животі незначної інтенсивності, лабораторні показники в нормі |

Продовження таблиці 1.1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Средня | 8-12 | Біль в животі середньої інтенсивності, нудота і/або блювота, УЗ-ознаки асцита |
| Тяжка | >12 | Клінічні ознаки асцита (іноді гідроторакс), олігурія, гемоконцентрація, гематокрит > 45%, гіпопротеїнемія, дисфункція печінки, випіт в плевральній порожнині |
| Критична | >12 | Напружений асцит чи масивний гідроторакс, гематокрит > 55%, лейкоцитоз > 25000/мл, оліго-анурія, тромбоемболічні ускладнення, збільшення в’язкості крові, зниження ниркової перфузії, гострий респіраторний дістрес-синдром |

#

# 1.1.2.4 Фактори, які сприяють розвитку синдрому гуперстимуляції яєчників

# Патогенез СГЯ до кінця не з’ясований. В основі розвитку даного синдрому, як згадувалося раніше, лежить синдром надмірної судинної проникності, яка веде до масивного виходу ексудату в міжсудинний простір (тканини, порожнини органів). Фактор який викликає даний процес досі не відомий [10].

Основними проявами СГЯ є збільшення яєчників, порушення водно-електронного балансу та патологічне збільшення проникності стінок судин, функцій печінки та інших органів. Також даний синдром може супроводжуватися гіповоліємією та гіперкоагуляцією, що може привести до розвитку тромбоемболічних ускладнень [10].

Становлять інтерес дослідження з вивчення ролі компонентів ренін-ангіотензинової системи (РАС) та імунної систем у розвитку СГЯ, з залученням різних цитокінів, молекул адгезії, ендотеліну-1, фактора Віллебранда. Обґрунтуванням для вивчення ролі РАС в патогенезі розвитку СГЯ з'явилися уявлення про здібності ангіотензину II через систему реніну активувати вазоконстрикцію, посилювати біосинтез простагландинів і альдостерону, неоваскуляризацию і підвищувати проникність судин.

Участь компонентів РАС у розвитку СГЯ не викликає сумнівів, але в той же час до сьогоднішнього дня немає чіткого визначення, чи є РАС провідним чинником, що запускає механізм розвитку СГЯ, або втягується в процес вторинно [11].

Тривають численні дослідження, зокрема присвячені вивченню ролі цитокінів у патофізіології СГЯ. В більшості випадків результати їх суперечливі. У той же час ці роботи об'єднує постулат про те, що на ранніх стадіях СГЯ відбувається підвищення рівня медіаторів ранньої фази запалення – ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-18, фактора некрозу пухлини α (ФНП-α), СЕФР – і зниження рівня протизапальних (регуляторних) цитокінів ІЛ-10. Одним з основних джерел утворення цитокінів є макрофаги, які разом з моноцитами становлять від 5 до 15% клітинної популяції фолікулярної рідини, отриманої при пункції яєчників у пацієнток, які беруть участь у програмі екстракорпорального запліднення.

СЕФР є фактором, який здатний до активації ангіогенезу. Виділяється гранульозними клітинами і має пептидну природу. До числа основних функцій даного фактора відноситься: стимуляція проліферації ендотеліальних клітин та збільшення судинної проникності при СГЯ.

ІЛ-1 вивільняється активованими лейкоцитами. Відомо, що ІЛ-1 існує в двох структурно зв’язаних формах. ІЛ-1α активує переважно Т-лімфоцити, маєаутокринну і паракринну дію, в той час як ІЛ-1β – багатофункціональний цитокін з широким спектром дії. Даний ІЛ приймає участь в стероїдогенезі, біосинтезі простогландинів та регулює клітинний метаболізм. Але точна участь ІЛ – в розвитку СГЯ точно не виявлена.

ІЛ-2 – розчинний глікопротеїд. Грає центральну роль у регуляції клітинного імунітету. Виробляється активованими Т-лімфоцитами, клітинами при лейкімії, лімфоцитарними активованими кілер-клітинами і натуральними кілер-клітинами. ІЛ-2 значно підвищується в фолікулярній рідині у жінок з СГЯ. ІЛ-2 підвищує проникність судин і на підставі цього вважають його відповідальним за підвищення капілярної проникності судин.

ІЛ-6 продукується багатьма Т- і В-лімфоцитами, деякими клітинами пухлин в разом з ІЛ-1β і фактором некрозу пухлин α надають системний вплив, який проявляється лейкоцитозом, підвищенням проникності судин та підвищенням рівня гострофазних білків. Підвищення ІЛ-6 спостерігається в фолікулярній, асцитичній рідині і в периферійній крові у пацієнток з СГЯ.

ІЛ-8 приймає активну участь в процесах овуляції, запліднення та імплантації ембріона. Даний IЛ в лімфі має низьку концентрацію, тоді як в асцитичній та перитонеальній рідині – високу у жiнок з тяжкою стадією СГЯ.

ІЛ-10 відомий як регуляторний цитокін, продукується T-хелперами (Тх) 2, основний регулятор імунної відповіді, що пригнічує вироблення прозапальних цитокінів. ІЛ-10 приймає участь у виробленні прогестерону, диференціюванні і функціонуванні жовтого тіла, пригнічує активність СЕФР.

ІЛ-18 впливаючи на функцію Тх1 і Тх2 активує каскад прозапальних цитокінів (ФНП-α, ІЛ-1β, ІЛ-6). При цьому ІЛ-18 бере участь у боротьбі організму з внутрішньоклітинними мікробами і в той же час – у патогенезі розвитку деяких аутоімунних захворювань.

ФНП-α являє собою неглікозований білок. Фактор некрозу пухлин синтезується активованими макрофагами. Він володіє цитотоксичною дією, імуномодулюючою і прозапальним ефектом [12].

При СГЯ також спостерігається підвищенний рівень С-реактивного білку (С-РБ), який свідчить про наявність системного запалення. С-РБ грає роль в активації ендотеліальних клітин, що приводить до тромботичних порушень.

# 1.2 Дослідження функціонального стану лімфоцитів

Існує велика кількість методів, що дозволяють досліджувати in vitro різні функції лімфоїдних клітин. Зокрема, в клінічних імунологічних лабораторіях досліджують інтенсивність проліферативної відповіді лімфоцитів на Т-і В-клітинні мітогени, продукцію антитіл, а також синтез мононуклеарами периферичної крові цитокінів [13].

# 1.2.1 Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ)

Перехід малих лімфоцитів в владні форми, здатні до проліферації і подальшої диференціювання називається бласттрансформаціею і супроводжується морфологічними змінами лімфоцитів. Бласти – великі, округлої форми клітини мають велике ядро, що займає більшу частину цитоплазми. У ядрі міститься кілька великих базофільних ядерець, цитоплазма бластів зерниста. Одна бластна клітина може дати клон з 16-32 і навіть 64 клітин, що володіють більш високою імунокомпетентністю, ніж вихідний лімфоцит [14, 15].

Бласттрансформація лімфоцитів може бути спричинена специфічними і неспецифічними стимуляторами (мітогенами). До бактеріальних мітогенів відносяться полісахариди грамнегативнихбактерій, туберкулін мікобактерій і ін.

Здатністю викликати бласттрансформаціі лімфоцитів мають окремі продукти тваринного (імуноглобулін, виділений з гетерологичной імунної сироватки) і рослинного (фітогемаглютинін) походження [16, 17, 18].

Неспецифічні стимулятори втягують в процес бласттрансформації більшу частину лімфоцитів незалежно від їх імунологічної специфічності. Причому одні з них активують тільки Т-клітини (ФГА), інші переважно В-клітини (туберкулін, ліпополісахариди) [19].

Специфічними мітогенами є розчинні і корпускулярні антигени, які втягують в процес бласттрансформації імунні Т і В-лімфоцити. На відміну від неспецифічних стимуляторів антигени активують тільки ті лімфоцити, які несуть специфічні до нього рецептори [20].

РБТЛ вивчають в культурі лімфоцитів in vitro. При постановці РБТЛ у людини беруть кров або попередньо виділені з неї лейкоцити і вносять їх в середу 199 або Голка, потім додають специфічний антиген або мітоген. Облік реакції після внесення мітогенів проводять через 2-4 доби, а після стимуляції антигенами через 3-5 доби. Неспецифічний мітоген ФГА трансформують в бласти 70-80%, а ЛПС – 30% лімфоцитів крові людини. Під впливом специфічних антигенів в бласти трансформуються не більше 7-12% малих лімфоцитів. Результати РБТЛ можна враховувати морфологічно – прямим підрахунком бластів в забарвлених препаратах під мікроскопом. При наявності апаратури РБТЛ враховують радіометричним методом, вимірюючи рівень включення в ДНК лімфоцитів міченого тритієм тимідину. Здатність до бласттрансформації відображають функціональну активність імунокомпетентних клітин, тому РБТЛ з антигенами і неспецифічними стимуляторами застосовують для оцінки імунного статусу організму [21].

Відомі речовини, які надають на лімфоцити ссавців мітогенну дію (табл. 1.2) [21].

Таблиця 1.2 – Неспецифічні мітогени лімфоцитів

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Мітоген | Походження | Мішень |
| Фітогемаглютинін (ФГА) | Phaseolus vulqaris - квасоля звичайна | Т-лімфоцити |
| Конконавалін А (Кон А) | Canavalia ensiformis | Т-лімфоцити |
| Мітоген лаконосу МЛ (PWM) | Phytolaca americana | В-лімфоцити за присутності Т-лімфоцитів |
| Ліпополісахариди (ЛПС) грам-позитивних бактерій | E. coli (кишкова паличка) S. thyphi (сальмонела тифу) N. meninqitiqis (нейсерія менінгіту) | В-лімфоцити |

Найчастіше для оцінки функціонального стану Т-лімфоцитів в клінічній лабораторній практиці використовують фітогемаглютинін (ФГА) – рослинний лектин, який отримують із насіння квасолі. Результати реакції можна враховувати або морфологічним методом, або по включенню радіоактивності [22].

У першому випадку з клітинної культури готують мазки, фіксують їх в метанолі і забарвлюють за Романовським-Гімза, так само, як мазки крові. У світловому мікроскопі з імерсійною системою визначають відсоток бластів по відношенню до загальної кількості лімфоцитів. Результат може бути виражений також у вигляді індексу стимуляції (ІС), що представляє собою відношення відсотка трансформованих клітин в досвіді (культура з ФГА) до відсотку трансформованих клітин в контролі (культура без ФГА) [23, 24].

Облік результатів по включенню радіоактивності більш зручний. Цей метод дозволяє зменшити кількість крові для дослідження, а також скоротити витрати поживних середовищ і трудовитрати. Культивування проводять не в пробірках або флаконах, а в 96-ямковий планшетах з об'ємом лунки близько 200 мкл. У кожну лунку досить внести 50000 клітин, що в перерахунку на цільну кров становить 0,05 мл. За 4-6 год до закінчення культивування в лунки вносять ДТ-тимідин. Далі за допомогою спеціального приладу (клітинного харвестера) клітини переносять на скляні фільтри, надлишок мітки змивають великою кількістю води, фільтри висушують і поміщають у флакони зі сцинтиляційної рідиною. Рівень включення мітки оцінюють на сцинтиляційному спектрофотометре. Результати виражають в імпульсах за хвилину або у вигляді індексу стимуляції (відношення рівня включення мітки в культурі з ФГА до рівня включення мітки клітинами, культивувати без ФГА). На інтенсивність стимуляції лімфоцитів можуть впливати умови культивування, якість використаних реактивів, якість сироватки, яку використовують як добавки до живильного середовища. При оцінці результатів РБТЛ слід звертати увагу, як на інтенсивність проліферативної відповіді викликане культури, так і на висоту відповіді в контрольних лунках. Зниження проліферативної відповіді на ФГА свідчить про наявність імунодефіциту, однак механізми останнього можуть бути різні [25, 26].

Оптимальна концентрація лімфоцитів при радіометричному методі 1,5-2 млн/мл. За 16 год до завершення інкубації в кожну пробірку вносять 1 мікрокюрі на мл Н3-тімідіна. Після завершення інкубації проби обробляють 10%-ю оцтовою кислотою на протязі 10 хв., центрифугують, супернатант відкидають, а до осаду додають 1-5 мл 5%-ї трихлороцтової кислоти для екстракції ДНК із клітини. Витримують 10 хв., при 4˚С, осаджують на мембранні фільтри з діаметром 0,4-0,5 мкм, фіксують 2 мл 96˚ етанолу 5 хв., до готового матеріалу додають синтиляційну рідину (5-8 мл) і вимірюють радіоактивність в імпульсах за хвилину. Враховують індекс стимуляції. У здорових осіб індекс стимуляції складає 10-20 і більше [27].

#

# 1.3 Оцінка методу РБТЛ

Для виявлення специфічної сенсибілізації бажано мати якомога більш чистий антиген з великим вмістом білка. Необхідно виключити вплив домішок. Спектр можливих застосувань простягається від виявлення алергії до виявлення сенсибілізації до найпростіших, грибків, бактерій, вірусів або визначення блокуючих сироваткових факторів, вивчення дії фармакологічних препаратів in vitro і визначення органоспецифічних антигенів. Останній метод виявився не таким успішним, тому для діагностики пухлинних захворювань слід відмовитися від реакції бластрансформації лімфоцитів на користь визначення лімфокінів. Причина цього полягає в тому, що неможливо дослідити всі процеси, що протікають в культурі клітин протягом 7 днів [28].

При використанні бактеріальних, вірусних або грибкових антигенів необхідно пам'ятати, що багато хто з них мають мітогенну дію. Особливий областю застосування реакції бластрансформації лімфоцитів є оцінка мітогеної дії. Найбільш часто використовувані мітогени Т-клітин – ФГА, В-клітин і Т-клітин – PWM і протеїн А [29].

В клініці, дослідження мітогенозалежної реактивності застосовується при оцінці первинних імунодефнцітних станів. У ряді випадків цей аналіз проводять при вторинних імунодефіцитних станах. Оцінка результатів мітогенної стимуляції представляється вельми непростою справою. Так, обумовлена терапією "нормалізація мітогенозалежної реактивності" зовсім не обов'язково розвивається паралельно з поліпшенням клінічної картини. Найбільш виражена кореляція з клінічною картиною відзначається відносно реактивності до алогенних клітини [30].

1.3.1 Умови постановки реакції бластрансформації лімфоцитів

Обмеження, які постійно зустрічаються при постановці реакції бластрансформації лімфоцитів [31]:

1) вихідний матеріал;

2) неприродні умови утримання лімфоцитів;

3) біологічні ритми;

4) величина відібраної проби у пацієнта;

5) встановлення «нормальних значень» у донорів;

6) інші оптимальні умови, як при інших пробах в реакціях клітинного імунітету.

Іноді зустрічаються обмеження [31]:

1) навмисне чи випадкове вплив терапевтичних заходів;

2) багатофакторні причини зниження мітогеної реактивності;

3) вплив імунорегуляторних лімфоцитів або моноцитів;

4) причини різної виживання клітин;

5) артефакти, пов'язані з приготуванням препаратів клітин і вибором оптимальної концентрації;

6) придатність даних модельного експерименту;

7) визначення мінімального числа клітин для досягнення специфічного ефекту;

8) короткочасні ефекти (період рефрактерності);

9) планування часу для проведення спостережень.

В останні роки все частіше використовують для реакції бластрансформації лімфоцити цільної крові. З 1-2 мл крові можна отримати понад 30 культур. Результати реакції бластрансформації лімфоцитів, як правило, залежать від числа клітин в культурі, тому рекомендується використовувати постійне число лімфоцитів при засіву культури або проводити перерахунок на постійне число лімфоцитів. Використання градієнтів фіколл і візотраст створює додаткові нефізіологічні умови. Воно призводить до порушення співвідношення різних форм лейкоцитів, зокрема до збагачення суспензії моноцитами, що може викликати супресорний ефект. Відзначається втрата лімфоцитів з великою щільністю і аутологічних розеткостворюючих клітин. Було також показано, що видалення еритроцитів веде до зміни реактивності лімфоцитів. Це найбільше заважає спробам функціональної оцінки реакції бластрансформації лімфоцитів. Для тест-системи на супресорні клітини характерна зворотна закономірність. За допомогою індексу супресорних клітин виявляють неспецифічні, стероідорезистентні, моноцитозалежні ефекти [32, 33].

Індуковані КонА супресорні функції неспецифічні, активність моноцитів маскується еритроцитами. Індекс супресорних клітин неможливо визначати в цільної крові, в той же час обумовлена КонА супресія краще виявляється в препаратах лейкоцитів з цільної крові, ніж в препаратах, отриманих із застосуванням фіколл і візотраста. Є свідчення про те, що індукована КонА супресія протікає за участю моноцитів. Можливість перенесення цих даних in vivo в даний час обговорюється. Слід зазначити, що, крім вимірювання швидкості синтезу ДНК, необхідно вимірювати інші параметри в культурі лімфоцитів (наприклад, синтез імуноглобулінів або інтерферону, спектр лімфокінів, селективний вплив моноцитів), щоб отримати інформативну картину стану імунної системи при всіх існуючих обмеженнях. Особливу увагу слід звертати на динаміку процесів [34].

# 1.3.2 Метод постановки реакції бластрансформації лімфоцитів

Використовують мононуклеарние клітини з периферичної крові людини або тварини. Забір крові виробляють натщесерце в стерильну пробірку з гепарином (20 ME на 1 мл крові). Від забору крові до початку виділення мононуклеарних клітин має пройти не більше 3 год. Кров в цей час зберігається при кімнатній температурі в щільно закритій пробірці. Перед розведенням її слід перемішати. Гепаринизированную кров розводять в два рази середовищем 199, потім нашаровуються на градієнт щільності фіколл-пака (8 мл розведеної крові на 2 мл фіколла в центрифужной пробірці). Пробірки центрифугують 30-40 хв при 400 g. Потім відбирають утворилося в інтерфазі «кільце» мононуклеаров. Після цього клітини двічі відмивають центрифугуванням в середовищі 199. Концентрацію клітин доводять до 2-106 клітин/мл повної культуральної середовищем. Їх життєздатність після виділення повинна становити не менше 95%, що визначають по включно 0,2%-го трипанового синього [34, 35].

Мононуклеари культивують в 150 мкл ПКС (повної культурального середовища – живильне середовище, що містить всі необхідні для культивування компоненти: ембріональну телячу сироватку, 2-меркаптоетанол, гентаміцин) в 96-ямковий круглодонних планшетах при 37 ° С в атмосфері 5% -го С02 протягом 72 г в присутності вищевказаних мітогенів в робочих концентраціях. В якості контролю використовують клітини, інкубовані тільки в присутності середовища. За 6 годин до закінчення реакції в кожну лунку додають Н3-тимідину 118 в концентрації 1 мкКі. Після закінчення реакції клітинну суспензію переносять на скловолокнисті фільтри. Висушені протягом ночі фільтри переносять в сцинтиляційні флакони з 3 мл сцін- тілляціонової рідини і підраховують включення радіоактивної мітки: в культурі з середовищем - спонтанна бласттрансформація, з фітогемагглютініном, ФГА-індукована бласттрансформація, з мітогеном лаконоса – МЛ-індукована бласттрансформація. Результати виражають в імпульсах за хвилину (імп / хв) і у вигляді індексу стимуляції – відносини включення мітки в присутності мітогена до включення мітки в присутності тільки середовища [36, 37].

Слід зазначити, що дана методика розроблена тільки для певних мітогенів, які володіють неспецифічним впливом на клітини. Дослідження проводиться in vitro. У дослідника можуть виникати питання при екстраполяції отриманих за допомогою даного тесту результатів на реальний стан Т- і В імунітету та імунітету в цілому. Для виявлення специфічного відповіді лімфоцитів на антигени потрібно більш тривалий (до 7 діб) культивування клітин. Тому сам по собі показник активності лімфоцитів не повинен служити єдиним досліджуваним критерієм при клітинних імунопатологій самого різного генезу. Відомо, що обумовлена терапією «нормалізація міто – гензавісімой активності» не обов'язково розвивається паралельно з поліпшенням клінічної картини. Зниження проліферативної відповіді на мітогени в більшості випадків є непрямим доказом наявності клітинного імунодефіциту, але механізми останнього можуть бути різними. Тільки в комплексі з іншими кількісними і особливо якісними характеристиками імунної системи метод може дати найбільш повну інформацію про стан імунітету, виявленні конкретного імунологічного дефекту, а отже, підібрати адекватне лікування та (або) спосіб імунокорекції [38, 39].

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1 Схема дослідження

Дослідження проведено на базі лабораторії клітинних популяцій Запорізького національного університету за договором з клініко-діагностичною лабораторією КУ «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької міської ради.

Обстежено 59 жінок (20-45 років), які отримали контрольовану гормональну стимуляцію яєчників за коротким протоколом. Жінки у дослідженні були розподілені на 3 групи. Контрольну групу (КГ) склали 42 жінки без ознак синдрому гіперстимуляції яєчників. Дослідну групу склали 17 пацієнток з ризиком розвитку раннього СГЯ. Критерієм включення до дослідної групи було формування 10 і більше фолікулів. Дослідну групу обстежених також розподілили на 2 групи: друга група (n=14) – жінки з ризиком розвитку СГЯ, але у яких клінічні ознаки гіперстимуляції в подальшому не проявлялися, третя група (n=3) – жінки, у яких в подальшому розвивалися клінічні ознаки розвитку синдрому.

Проведені дослідження не суперечать загальноприйнятим біоетичним нормам і виконані з урахуванням принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини та відповідних законів України про проведення експериментальних і клінічних досліджень.

## 2.2 Матеріал дослідження

# Досліджували периферичну венозну кров отриману в умовах лабораторії КУ «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької міської ради відразу після пункції фолікулів. У зразках крові, стабілізованої гепарином (20 од/мл), аналізували загальний вміст лейкоцитів, лейкоцитарну формулу, проводили реакцію бластної трансформації лімфоїдних клітин.

##

## 2.3 Методи досліджень

## 2.3.1 Визначення кількості лейкоцитів

Визначення кількості лейкоцитів пробірковим способом (за П’ятницьким).

У лунці сірологічного планшета варіпіпеткою відміряють 380 мкл 3% розчину оцтової кислоти. Досліджуваний зразок крові відміряють дозованою мікропіпеткою 20 мкл крові, яку вносять в лунку з 380 мкл 3% розчину оцтової кислоти. В цьому випадку розведення крові виходить 1:20. Порцію крові перемішують піпетуванням тією ж піпеткою і залишають на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів. Підрахунок лейкоцитів проводять в рахунковій камері Горяєва.

Рахункова камера Горяєва представляє собою скляну пластинку, що має невелике поглиблення в центрі, куди поміщається розведена кров. На дні поглиблення вигравійовано дві сітки, розділені одна від одної подовжнім і двома поперечними жолобами. Перед підрахунком лейкоцитів на камеру кладуть знежирене покривне скло і притирають його до країв камери до поява кілець Ньютона по притертим краям. Оскільки покривне скло накладають на бічні пластинки камери Горяєва, цим створюється поглиблення, яке закрите з двох сторін і відкрите з двох зовнішніх сторін у вигляді щілин. Через ці щілини рахункова камера заповнюється суспензією лейкоцитів. Для заповнення камери суспензію лейкоцитів в лунці з кислотою ретельно перемішують мікропіпеткою і невелику порцію суспензії піпеткою доставляють до щілини камери. Суспензія клітин, витікаючи з мікропіпетки заповнює камеру, надлишок рідини стече в жолоби. Іншу частину камери можна заповнити суспензією клітин наступного зразка лейкоцитів.

Після того, як камері Горяєва заповниться суспензією клітин, приступають до підрахунку лейкоцитів. Експозиція рахункова камера в суспензії клітин складає близько 1 хв. для їх рівномірного осідання на поверхні камери. Для підрахунку лейкоцитів камеру розглядають під мікроскопом і рахують формені елементи, що лежать в сітці Горяєва.

Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів (по 15 в кожному з рядів), 25 з них розділені на 15 маленьких квадратів (для підрахунку еритроцитів) і 100 великих порожніх квадратів зібрано в групи по 4 квадрати кожна (для підрахунку лейкоцитів). Сторони малого квадрата рівні 0,05 мм; отже площа його рівна 0,0025 мм2; глибина рахункової камери рівна 0,1 мм, тому об’єм малого квадрата рівний 0,00025 мм3. Великий квадрат сітки Горяєва складається з 16 малих квадратів, отже має S=0,04 мм2, а V=0,004 мм3.

Лейкоцити підраховують у 100 великих порожніх квадратах (20x5) площа яких рівна 4 мм2 (площа одного великого квадрата дорівнює 0,04 мм2). Кількість підрахованих лейкоцитів ділять на 4 і перемножують на 200, одержують кількість лейкоцитів в 1мм3 крові. Ділять на 4 з розрахунку загальної площі 100 великих порожніх квадратів, рівної 4 мм2. Перемножують з розрахунку, що ступінь розведення крові дорівнює 20 (380 мкл 3% розчину оцтової кислоти і 20 мкл крові), а глибина камери 0,1 мм. Замість вище приведених розрахунків можна кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах, помножити на 50 (якщо врахувати попередні розрахунки: 200:4=50). Для того, щоб повторно не підрахувати один і той же лейкоцит, потрібно суворо дотримуватися певного порядку: рахувати ряди великих порожніх квадратів зліва направо і справа наліво, переміщуючи камеру на один ряд зверху вниз; у кожному квадраті потрібно рахувати елементи, що лежать в середині, а також на лівому та верхньому боці камери [40, 41].

## 2.3.2 Аналіз лейкоцитарної формули крові

## 2.3.2.1 Приготування мазків крові

Для приготування мазка крові на сухе знежирене предметне скло, ближче до короткого боку, наносять піпеткою невелику краплю крові. Предметне скло слід держати на столі або у лівій руці за вузькі краї. Правою рукою приставляють шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров’ю зліва від краплі під кутом 450 та продвинути його вправо до з’єднання з краплею крові. Почекати до тих пір, поки кров розподілиться по всьому ребру шліфованого скла, а потім легким швидким рухом провести його з права наліво до тих пір, поки не буде вичерпана вся крапля. Крапля крові повинна бути невеликою (5-10 мкл), щоб весь мазок поміщався на склі, не доходячи 1,0-1,5 см до його краю. Не можна сильно нажимати на скло, так як більшість клітин крові можуть бути ушкодженими. Добре зроблений мазок тонкий, має жовтуватий колір та закінчується «щіточкою».

Після приготування мазки слід швидко висушити на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висушуванні може змінюватися морфологія клітин крові [32, 41].

## 2.3.2.2 Фарбування мазків за Уна-Паппенгеймом

Фарбування за Уна-Паппенгеймом є комбінацією двох методів фарбування – Май-Грюнвальда та Романовського-Гімза. Дана методика не потребує фіксації та дає більш чіткі результати.

Не фіксовані мазки заливають нерозведеної готової фарбою Май-Грюнвальда (це суміш еозину і метиленової сині, яка не містить слідів азура, але готується на метиловому спирті; внаслідок цього набуває властивості фіксатора) на 3-5 хв.Після цього мазки промивають дистильованою водою, після чого мікропрепарати заливають розведеним розчином Романовського-Гимза (20%) на 20-30 хв. Після цього мазки промиваються дистильваною водою і висушуються. При необхідності проводять диференціювання 1% соляною кислотою [42].

## 2.3.2.3 Складання лейкоцитарної формули

При фарбуванні за Паппенгеймом ядра клітин мають красно-фіолетовий колір, цитоплазма зрілих гранулоцитів забарвлюється у рожевий колір, а цитоплазма лімфоцитів, моноцитів і бластних клітин – у синій. Еритроцити забарвлюються в яскраво-рожевий колір. Якщо еритроцити забарвлені в відтінки синього кольору, то препарат перефарбований і його треба повторно диференціювати в підкисляючому середовищі. Якщо еритроцити забарвлені в червоний або оранжевий колір, значить фарба роз’їдена кислою дистильованою водою.

Після правильного приготування мазка крові й якісного забарвлення приступають до його вивчення. Огляд мазка починають з малого збільшення, при якому оцінюють якість мазка, але аналіз його проводять під імерсією. Слід мати на увазі, що не зважаючи на достатньо правильне технічне виконання мазка, клітини крові розподіляються не рівномірно по всьому препарату. Тому для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Щоб уникнути повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатися по мазку крові зигзагами – лінією Меандра. Прийнято рахувати 200 лейкоцитів, відступаючи 0,3-0,5 см від основи "вусиків", рухаючись зигзагами на всю ширину мазка через 2-3 поля зору. Необхідно прагнути набрати дану кількість клітин на 1/2 мазка, де клітини розподілені найбільш оптимально без накладень. Різні види лейкоцитів, що зустрічаються при аналізі препарату, заносять в таблицю або враховують за допомогою спеціалізованого десятиклавішного лейкоцитарного лічильника. Після закінчення перегляду 200 лейкоцитів, визначають процентний вміст кожного з видів білих кров’яних тілець. Це і є лейкоцитарна формула. Окрім процентного вмісту лейкоцитів велике значення має абсолютна кількість окремих видів імуноцитів. Воно визначається з урахуванням загальної кількості лейкоцитів. Абсолютна кількість будь-якого виду білих кров’яних тілець характеризує їх реальну участь в імунних реакціях. Абсолютну кількість імуноцитів визначають за наступною формулою:

Абсолютний зміст окремих видів лейкоцитів в одиниці об’єму крові можна визначити за формулою (2.1):

$\frac{\begin{array}{c}А(\%)×WBC(109 / л) \end{array}}{100} $(2.1)

де А (%) – частка певного виду лейкоцитів серед інших лейкоцитів в%;

 WBC (109 / л) – кількість лейкоцитів.

Відносну і абсолютну кількість лейкоцитів враховують у клінічній практиці [32, 40].

## 2.3.4 Постановка реакції бластної трансформації лімфоцитів

Метод реакції баластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) заснований на активації лімфоцитів (проліферація, трансформація), яка відбувається під впливом стимулів (міогенів або антигенів) з наступною трансформацією їх в бласти (великі клітини, що діляться). Викликати РБТЛ здатні мітогени тваринного (імуноглобулін та ін.) та рослинного (фітогемаглютинін – ФГА, Кон А та ін.) походження [43].

РБТЛ ставили на цільній крові (1 мл), до якої додавали ФГА з антибіотиками (10 мкл) та проводили інкубацію при температурі +37 °С протягом 3-х діб. Робили мікропрепарати, які фарбували комбінованим методом (за Уна-Паппенгеймом).

Препарати РБТЛ мікроскопували під імерсією (об. 100х; ок. 10х). Аналізували 200 мононуклеарів, що знаходились на різних стадіях бластної трансформації. Із них відрізняли: 1 – малі лімфоцити (нетрансформовані); 2 – малі бласти, або перехідні лімфоцити; 3 – великі бласти; 4 – мітоз.

Спонтанна РБТЛ, у здорових осіб, знаходиться в межах 1-6%. Нормальний показник РБТЛ знаходиться в межах 60-80 %, знижений рівень РБТЛ – 40-59% і різко знижений – нижче 40% [32, 40].

## 2.4 Статистична обробка отриманих результатів

Отримані експериментальні дані піддали статичній обробці за допомогою пакету статистичних програм StatSoft STATISTICA 10.0.1011.0 Russian.

Для порівняння двох незалежних вибірок використовували непараметричні методи варіаційної статистики – критерій Манна-Уітні (показник U). Статистична значущість відмінностей оцінювалася при p ≤ 0,05 [44].

Дані, описової статистики в роботі представлені у вигляді зазначення медіана, середнього арифметичного, мінімального та максимального значення, 25-го і 75-го процентилей. Опис лабораторних показників проводився з урахуванням медіани, 25-го і 75-го процентилей [45].

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

##  Описова статистика лабораторних показників дослідних груп

Описова статистика лабораторних показників досліджуваних груп відображена в табл. 3.1 – 3.3. В табл. 3.1 представлені дані описової статистики контрольної групи (КГ), без ознак гіперстимуляції яєчників, яку склали 29 пацієнток віком 20-45 років. Табл. 3.2 висвітлює опис лабораторних показників в 2-ій дослідній групі, з ризиком розвитку гіперстимуляції яєчників, яку склали 11 жінок. В табл. 3.3 представлені показники в групі з клінічними ознаками гіперстимуляції (3-тя група).

## 3.1.1 Описова статистика лабораторних показників у жінок без ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

За даними табл. 3.1 виявлено, що кількість фолікулів отриманих після пункції не перевищує 10 фолікулів. За вітчизняних авторів [46] одним із факторів ризику виступає одночасне зростання в яєчниках більше 10 фолікулів.

Загальний вміст лейкоцитів, відносні та абсолютні показники лейкоцитарної формули крові та показник загальної та лімфоцитарної реакції баластної трансформації знаходився в межах норми.

Таблиця 3.1 – Описова статистика лабораторних показників у жінок без ризику розвитку СГЯ

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | $$\overline{Х}$$ | Ме | Мin | Маx | x0.25 | x0.75 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Кількість фолікулів, шт | 5,45 | 5,00 | 2,00 | 9,00 | 4,00 | 7,00 |

Продовження таблиці 3.1

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Кількість лейкоцитів, х109/л | 7,42 | 7,35 | 3,55 | 12,65 | 6,25 | 8,30 |
| Еозинофіли, % | 1,08 | 1,00 | 0,00 | 3,70 | 0,50 | 1,50 |
| Еозинофіли, х109/л | 0,08 | 0,07 | 0,00 | 0,44 | 0,03 | 0,10 |
| П. нейтрофіли, % | 3,60 | 3,00 | 1,30 | 11,50 | 2,00 | 4,50 |
| П. нейтрофіли, х109/л | 0,26 | 0,24 | 0,07 | 0,94 | 0,17 | 0,34 |
| С. нейтрофіли, %  | 58,04 | 58,80 | 36,50 | 73,90 | 53,50 | 63,70 |
| С. нейтрофіли, х109/л | 4,32 | 4,36 | 2,13 | 7,94 | 3,61 | 5,03 |
| Моноцити, % | 5,43 | 5,50 | 1,00 | 10,00 | 4,50 | 6,60 |
| Моноцити, х109/л | 0,42 | 0,41 | 0,05 | 1,00 | 0,31 | 0,54 |
| Лімфоцити, % | 31,85 | 33,00 | 13,00 | 51,50 | 25,40 | 36,70 |
| Лімфоцити, х109/л | 2,35 | 2,10 | 0,81 | 4,41 | 1,60 | 3,06 |
| РБТ, % | 88,49 | 87,26 | 23,90 | 161,07 | 61,07 | 117,71 |
| РБТ лімфоцитів, % | 81,85 | 79,65 | 17,70 | 159,09 | 50,45 | 110,38 |

Примітки:

1. $\overline{Х} $– середнє арифметичне.
2. Ме – медіана.
3. Мin – мінімум.
4. Маx – максимум.
5. x0.25 – 25,00 процентіль.
6. x0.75 – 75,00 процентіль.

В даній групі спостерігалися наступні індивідуальні коливання. Так, у 4-х пацієнток (13,8 %) спостерігався помірний лейкоцитоз. У двох пацієнток (6,9%) спостерігалося підвищення відносних показників паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів. Тоді як абсолютні показників кількості паличкоядерних нейтрофілів та сегментоядерних нейтрофілів були підвищенні у 4-х жінок(13,8%) і 2-х жінок (6,9%), відповідно. У 5-х пацієнток (13,2%) спостерігалося зниження відносного показника кількості моноцитів та в 3-х (10,3%) відмічалося збільшення їх абсолютних показників. Відносний та абсолютний показник кількості лімфоцитів збільшувалися у 5-ти (13,2%) і 6-ти жінок (20,7%), відповідно. У 6-ти (20,7%) та 10-ти (34,5%) пацієнток спостерігалося зниження показника загального РБТ та РБТЛ, відповідно.

## 3.1.2 Описова статистика лабораторних показників у жінок з ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

В табл. 3.2 представлені свідчить про значне збільшення кількості фолікулів, у порівнянні з контрольною групою, що є передумовою розвитку гіперстимуляції яєчників.

Вміст лейкоцитів, відносні та абсолютні показники лейкоцитарної формули крові знаходилися в референтних межах норми. Однак було виявлено значне підвищення абсолютної кількості сегментоядерних нейтрофілів та помірний лейкоцитоз.

Таблиця 3.2 – Описова статистика лабораторних показників у жінок з ризиком розвитку СГЯ

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | $$\overline{Х}$$ | Ме | Мin | Маx | x0.25 | x0.75 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Кількість фолікулів, шт. | 15,11 | 14,00 | 11,00 | 21,00 | 13,00 | 17,00 |
| Кількість лейкоцитів, х109/л | 10,57 | 9,05 | 6,60 | 20,40 | 8,75 | 11,00 |
| Еозинофіли, % | 0,95 | 0,43 | 0,00 | 3,60 | 0,00 | 1,50 |
| Еозинофіли, х109/л | 0,10 | 0,09 | 0,00 | 0,35 | 0,00 | 0,13 |
| П. нейтрофіли, % | 2,79 | 2,40 | 0,87 | 5,40 | 1,80 | 3,50 |

Продовження таблиці 3.2

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| П. нейтрофіли, х109/л | 0,28 | 0,20 | 0,09 | 0,67 | 0,17 | 0,31 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| С. нейтрофіли, %  | 61,57 | 60,90 | 49,50 | 75,90 | 58,40 | 63,80 |
| С. нейтрофіли, х109/л | 6,40 | 6,41 | 4,02 | 10,73 | 5,14 | 7,02 |
| Моноцити, % | 5,82 | 6,40 | 2,40 | 8,40 | 5,40 | 6,70 |
| Моноцити, х109/л | 0,63 | 0,67 | 0,20 | 1,33 | 0,48 | 0,74 |
| Лімфоцити, % | 28,88 | 29,70 | 15,30 | 41,10 | 24,30 | 32,80 |
| Лімфоцити, х109/л | 3,16 | 2,67 | 1,47 | 8,08 | 2,16 | 3,34 |
| РБТ, % | 61,07 | 55,76 | 16,82 | 110,63 | 28,32 | 94,70 |
| РБТ лімфоцитів, % | 54,41 | 44,25 | 11,86 | 107,09 | 22,57 | 91,69 |

На відміну від контрольної групи, в групі з ризиком розвитку СГЯ показники РБТ (загальний та лімфоцитарний) були знижені.

Щодо індивідуальних коливань, було відмічений лейкоцитоз у 3-х пацієнтів (27,3%), у інших даний показник знаходився в верхній межі норми. Абсолютні показники паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів збільшувалися у 2-х (18,2%) та 5-ти жінок (45,5%), відповідно. У 4-х (36,4%) і 3-х жінок (27,3%) спостерігалося підвищення абсолютних показників моноцитів та лімфоцитів, відповідно. Щодо реакції баластної трансформації у 6-ти пацієнток (54,5%) цієї групи було відмічений знижений (3 жінки) та різко знижений (3 жінки) показник як загального РБТ, так і РБТЛ.

## 3.1.3 Описова статистика лабораторних показників у жінок з клінічними проявами синдрому гіперстимуляції яєчників

За даними табл. 3.3, в групі з ознаками СГЯ спостерігається значне збільшення кількості фолікулів, в порівнянні з групою без ознак СТЯ та з ризиком розвитку СГЯ. Значне підвищення кількості зрілих фолікулів в яєчниках є пусковим фактором, який сприяє розвитку гіперстимуляції яєчників.

Аналіз лейкоцитарної формули крові виявив, що у жінок цієї групи, помірний лейкоцитоз, підвищення абсолютного показника сегментоядерних нейтрофілів та лімфоцитів. Відносні та абсолютні показники інших імунокомпетентних клітин знаходилися в межах норми.

Таблиця 3.3 – Описова статистика показників фолікулів та лейкоцитарної формули крові у жінок з ознаками СГЯ

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | $$\overline{Х}$$ | Ме | Мin | Маx | x0.25 | x0.75 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Кількість фолікулів, шт | 25,00 | 23,00 | 17,00 | 35,00 | 17,00 | 35,00 |
| Кількість лейкоцитів, х109/л | 11,02 | 11,55 | 9,50 | 12,00 | 9,50 | 12,00 |
| Еозинофіли, % | 0,63 | 0,50 | 0,00 | 1,40 | 0,00 | 1,40 |
| Еозинофіли, х109/л | 0,07 | 0,05 | 0,00 | 0,16 | 0,00 | 0,16 |
| П. нейтрофіли, % | 4,07 | 3,00 | 1,00 | 8,20 | 1,00 | 8,20 |
| П. нейтрофіли, х109/л | 0,45 | 0,29 | 0,12 | 0,95 | 0,12 | 0,95 |
| С. нейтрофіли, %  | 61,90 | 57,50 | 53,80 | 74,40 | 53,80 | 74,40 |
| С. нейтрофіли, х109/л | 6,87 | 6,21 | 5,46 | 8,93 | 5,46 | 8,93 |
| Моноцити, % | 4,23 | 4,90 | 2,50 | 5,30 | 2,50 | 5,30 |
| Моноцити, х109/л | 0,48 | 0,59 | 0,24 | 0,61 | 0,24 | 0,61 |
| Лімфоцити, % | 29,17 | 31,30 | 19,70 | 36,50 | 19,70 | 36,50 |
| Лімфоцити, х109/л | 3,15 | 3,47 | 2,36 | 3,62 | 2,36 | 3,62 |
| РБТ, % | 47,79 | 47,79 | 46,02 | 49,56 | 46,02 | 49,56 |
| РБТ лімфоцитів, % | 36,72 | 36,64 | 36,55 | 36,96 | 36,55 | 36,96 |

Щодо показників реакції бластної трансформації, зберігається подальша тенденція до зменшення рівня загального та лімфоцитарного РБТ і в групі з СГЯ ці показники досягають різкого зниження, в порівнянні з КГ та 2-ю групою.

## 3.2 Порівняння лабораторних показників дослідних груп за U-крітерієм Манна-Уітні

Порівнюючи лабораторні показники груп досліджуваних, розраховували достовірність за допомого U – теста Манна- Увітні, що відображено у табл. 3.4-3.6

В табл. 3.4 представлене порівняння лабораторних показників групи з ризиком розвитку СГЯ відносно групи контролю і виявлено статистично значиме підвищення (р ≤ 0,05) кількості фолікулів в групі з ризиком.

Значиме підвищення абсолютного вмісту сегментоядерних нейтрофілів та моноцитів було виявлене в групі з ризиком розвитку СГЯ відносно групи контролю. Саме за рахунок збільшення вмісту сегментоядерних нейтрофілів спостерігалася підвищення показника кількості лейкоцитів в групі ризику. Статистично значима відмінність вмісту лейкоцитів виявлена в групі з ризиком СГЯ порівняно з групою без ознак СГЯ.

Значима відмінність (р ≤ 0,05) показника РБТЛ виявлена в групі ризику розвитку СГЯ відносно контролю.

Інші показники статистично значимих відмінностей не досягли.

Таблиця 3.4 – Порівняння лабораторних показників групи з ризиком розвитку СГЯ відносно групи контролю за U-крітерієм Манна-Уітні

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Група без ознак СГЯ (Ме) | Група з ризиком розвитку СГЯ (Ме) | U | р≤0,05 |
| 1 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| Кількість фолікулів, шт | 5,00 | 14,00 | 0,00 | 0,00\* |
| Кількість лейкоцитів, х109/л | 7,35 | 9,05 | 47,50 | 0,003\* |
| Еозинофіли, % | 1,00 | 0,43 | 109,50 | 0,48 |
| Еозинофіли, х109/л | 0,07 | 0,09 | 125,00 | 0,87 |
| П. нейтрофіли, % | 3,00 | 2,40 | 97,00 | 0,26 |
| П. нейтрофіли, х109/л | 0,24 | 0,20 | 125,00 | 0,87 |
| С. нейтрофіли, % | 58,80 | 60,90 | 105,00 | 0,40 |
| С. нейтрофіли, х109/л | 4,36 | 6,41 | 50,00 | 0,004\* |
| Моноцити, % | 5,50 | 6,40 | 112,50 | 0,54 |
| Моноцити, х109/л | 0,41 | 0,67 | 72,00 | 0,05\* |
| Лімфоцити, % | 33,00 | 29,70 | 102,50 | 0,34 |
| Лімфоцити, х109/л | 2,10 | 2,67 | 98,00 | 0,28 |
| РБТ, % | 87,26 | 55,76 | 80,00 | 0,09 |
| РБТ лімфоцитів, % | 79,65 | 44,25 | 73,00 | 0,05\* |

Примітка. \* – показники статистично значимо відрізняються між собою (р ≤ 0,05).

В табл. 3.5 представлене порівняння лабораторних показників групи з ознаками СГЯ відносно групи контролю і виявлено статистично значиме підвищення (р ≤ 0,05) кількості фолікулів в групі з ознаками СГЯ у порівнянні з групою без ознак СГЯ

Як і при порівнянні контрольної групи з групою з ризиком розвитку СГЯ, при порівнянні цих груп було відмічене значиме (р ≤ 0,05) підвищення абсолютного вмісту сегментоядерних нейтрофілів та загальної кількості лейкоцитів.

Також при порівнянні показників загального РБТ та РБТЛ була виявлена статистично значима відмінність в ході порівняння групи з ознаками СГЯ відносно групи контролю, без ознак СГЯ.

Інші показники статистично значимих відмінностей не досягли.

Таблиця 3.5 – Порівняння лабораторних показників групи з ознаками СГЯ відносно групи контролю за U-крітерієм Манна-Уітні

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Група без ознак СГЯ(Ме) | Група з ознаками СГЯ(Ме) | U | р ≤ 0,05 |
| 1 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| Кількість фолікулів, шт | 5,00 | 23,00 | 0,00\* | 0,0004\* |
| Кількість лейкоцитів, х109/л | 7,35 | 11,55 | 7,00\* | 0,01\* |
| Еозинофіли, % | 1,00 | 0,50 | 32,50 | 0,50 |
| Еозинофіли, х109/л | 0,07 | 0,05 | 42,00 | 0,95 |
| П. нейтрофіли, % | 3,00 | 3,00 | 42,00 | 0,95 |
| П. нейтрофіли, х109/л | 0,24 | 0,29 | 34,00 | 0,58 |
| С. нейтрофіли, % | 58,80 | 57,50 | 36,00 | 0,67 |
| С. нейтрофіли, х109/л | 4,36 | 6,21 | 7,00\* | 0,01\* |
| Моноцити, % | 5,50 | 4,90 | 27,50 | 0,32 |
| Моноцити, х109/л | 0,41 | 0,59 | 32,00 | 0,50 |
| Лімфоцити, % | 33,00 | 31,30 | 36,00 | 0,67 |
| Лімфоцити, х109/л | 2,10 | 3,47 | 19,00 | 0,13 |
| РБТ, % | 87,26 | 47,79 | 7,50\* | 0,01\* |
| РБТ лімфоцитів, % | 79,65 | 36,64 | 4,00\* | 0,004\* |

Примітка. \* – показники статистично значимо відрізняються між собою (р ≤ 0,05).

В табл. 3.6 представлене порівняння лабораторних показників групи з ризиком розвитку СГЯ відносно групи з ознаками СГЯ відносно групи контролю і виявлено лише статистично значиме підвищення (р≤0,05) показника кількості фолікулів.

Значимі відмінності інших показників при порівнянні цих дослідних груп були відсутні.

Таблиця 3.6 – Порівняння лабораторних показників групи з ознаками СГЯ відносно групи з ризиком розвитку СГЯ за U-крітерієм Манна-Уітні

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показник | Група з ризиком розвитку СГЯ (Ме) | Група з ознаками СГЯ(Ме) | U | р≤0,05 |
| 1 | 2 | 3 | 3 | 4 |
| Кількість фолікулів, шт | 14,00 | 23,00 | 2,50\* | 0,04\* |
| Кількість лейкоцитів, х109/л | 9,05 | 11,55 | 8,00 | 0,37 |
| Еозинофіли, % | 0,43 | 0,50 | 12,50 | 0,86 |
| Еозинофіли, х109/л | 0,09 | 0,05 | 12,50 | 0,86 |
| П. нейтрофіли, % | 2,40 | 3,00 | 11,50 | 0,73 |
| П. нейтрофіли, х109/л | 0,20 | 0,29 | 12,00 | 0,86 |
| С. нейтрофіли, % | 60,90 | 57,50 | 12,00 | 0,86 |
| С. нейтрофіли, х109/л | 6,41 | 6,21 | 11,00 | 0,73 |
| Моноцити, % | 6,40 | 4,90 | 5,00 | 0,15 |
| Моноцити, х109/л | 0,67 | 0,59 | 9,00 | 0,48 |
| Лімфоцити, % | 29,70 | 31,30 | 12,00 | 0,86 |
| Лімфоцити, х109/л | 2,67 | 3,47 | 10,00 | 0,60 |

Продовження таблиці 3.6

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| РБТ, % | 55,76 | 47,79 | 9,50 | 0,48 |
| РБТ лімфоцитів, % | 44,25 | 36,64 | 9,00 | 0,48 |

Таким чином, в ході порівняння лабораторних показників дослідних груп за допомого U – теста Манна-Увітні, було виявлено, що показник кількості фолікулів може виступати в якості прогностичного маркера розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників.

Виявлена динаміка підвищення показника кількості лейкоцитів в групах (контрольна група – 7,35 х109/л, група з ризиком розвитку СГЯ – 9,05 х109/л, група з ознаками СГЯ – 11,55 х109/л), без здвигу лейкоцитарної формули крові вліво, що за даними відчізняних авторів [47, 48] є характерним при розвитку гіперстимуляції яєчників і свідчіть про розвиток запальної реакції в умовах використання допоміжних репродуктивних технологій.

Зниженя значень показників РБТ та РБТЛ можуть бути пов’язані як із зниженою проліферативною здатністю клітин, так і з тим що під час гормональної терапії до гормональних зрушень у організмів приєднується і зрушення імунного гомеостазу, а саме відбувається активація лімфоцитів і більшість із них на момент обстеження відноситься до великих розмірних класів, які є активованими і при додатковій стимуляції рослинним лектином ФГА значно менша кількість клітин входить до проліферативних реакцій, що обумовлює знижені рівні бластної трансформації клітин.

# 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

1. Загальні вимоги охорони праці

1.1 На роботу в біохімічну лабораторію приймаються особи, які досягли 18 років, що пройшли медичний огляд для вирішення питання про можливість роботи в лабораторії.

1.2 Нові працівники, які щойно потрапили на роботу допускаються до виконання своїх обов'язків лише після проходження вступного інструктажу про забезпечення заходів безпеки, інструктажу на робочому місці і після співбесіди з питань техніки безпеки.

1.3 Проходження інструктажу обов'язково для всіх прийнятих на роботу незалежно від їх освіти, стажу роботи та посади, а також для людей,які проходять практику або виробниче навчання.

1.4 При переведені співробітника на нові види робіт, незнайомі операції, перед роботою з новими речовинами, а також в разі порушення працівником правил техніки безпеки проводиться позаплановий інструктаж.

1.5 Проведення всіх видів інструктажу реєструється в журналі.

1.6 Розпорядженням по лабораторії в кожному робочому приміщенні призначаються відповідальні за дотриманням правил техніки безпеки, правильне зберігання легкозаймистих, вибухонебезпечних і отруйних речовин, санітарний стан приміщень, забезпеченість засобами 5 індивідуального захисту та аптечками першої допомоги з необхідним набором медикаментів.

1.7 Проведення вступного інструктажу, контроль виконання правил техніки безпеки у всій лабораторії і ведення журналу інструктажу здійснює призначена завідуючим лабораторією посадова особа, в підпорядкуванні якого знаходяться відповідальні робочих приміщень.

1.8 Усі працюючі в лабораторії повинні бути забезпечені необхідним спецодягом та засобами індивідуального захисту [49].

2. Засоби індивідуального захисту

2.1 При роботі в хімічній лабораторії необхідно надягати халат з бавовняної тканини.

2.2 При виконанні робіт, пов'язаних з виділенням отруйних газів і пилу, для захисту органів дихання слід застосовувати респіратори або інші засоби захисту.

2.3 При роботі з їдкими і отруйними речовинами додатково застосовують фартухи, засоби індивідуального захисту очей і рук.

2.4 Для захисту рук від дії кислот, лугів, солей, розчинників застосовують гумові рукавички. На рукавичках не повинно бути порізів, проколів та інших пошкоджень. Одягаючи рукавички, слід посипати їх зсередини тальком.

2.5 Для захисту очей застосовують окуляри різних типів, щитки, маски [50].

3. Правила пожежної безпеки в лабораторії

Всі приміщення лабораторії повинні відповідати вимогам пожежної безпеки по (ГОСТ 12.1, 004-91) та мати засоби пожежогасіння по (ГОСТ12.4.009-83).

3.1 Лабораторія повинна бути оснащена пожежними кранами (не менше одного на поверх) з пожежними рукавами. У кожному робочому приміщенні повинні бути в наявності вогнегасники [51].

3.2 У приміщенні лабораторії на видному місці повинен бути вивішений план евакуації співробітників в разі виникнення пожежі.

3.3 Розпорядженням по лабораторії з числа співробітників призначається група (3-5 осіб), яка організовує всі протипожежні заходи, отримавши інструктаж місцевої пожежної команди.

3.4 Всі співробітники лабораторії повинні бути навчені правилам поводження з вогне- та вибухонебезпечними речовинами, газовими приладами, а також повинні вміти поводитися з протигазом, вогнегасником та іншими засобами пожежогасіння, наявними в лабораторії [52].

3.5 У приміщеннях лабораторії і в безпосередній близькості від них (в коридорах, під сходами) забороняється зберігати горючі матеріали і встановлювати предмети, загороджують проходи і доступ до засобів пожежогасіння.

3.6 Без дозволу завідувача лабораторією та особи, відповідальної за протипожежні заходи, забороняється установка лабораторних і нагрівальних приладів, для проведення випробувань, їх використання та переробка електропроводки.

3.7 Всі нагрівальні прилади повинні бути встановлені на термоизолюючих підставках.

3.8 Забороняється експлуатація несправних лабораторних і нагрівальних приладів.

3.9 Після закінчення роботи необхідно відключити електроенергію, газ та воду у всіх приміщеннях.

3.10 Кожен співробітник лабораторії, який помітив пожежу, задимлення або інші ознаки пожежі зобов'язаний: негайно викликати пожежну частину по телефону; довести до відома завідувача лабораторією, який в свою чергу повинен сповістити співробітників, вжити заходів до їх евакуації та ліквідації пожежі; прийняти заходи щодо обмеження поширення вогню та ліквідації пожежі;

4. Правила електробезпеки в лабораторії Всі приміщення лабораторії повинні відповідати вимогам електробезпеки при роботі з електроустановками [53, 54].

4.1 Всі електрообладнання з напругою понад 36 В, а також обладнання та механізми, які можуть виявитися під напругою, повинні бути надійно заземлені.

4.2 Для відключення електромереж на вводах повинні бути рубильники або інші доступні пристрої. Відключення всієї мережі, за винятком чергового освітлення проводиться загальним рубильником.

4.3 З метою запобігання електротравматизму забороняється: працювати на несправних електричних приладах і установках; перенавантажувати електромережу; -переносити і залишати без нагляду ввімкнені електроприлади; працювати поблизу відкритих частин електроустановок, торкатися до них; загромаджувати прохід до електричного пристрою.

4.4 Про всі виявлені дефекти в ізоляції проводів, несправності рубильників, штепсельних вилок, розеток, а також заземлення та огороджень слід негайно повідомити електрику [53, 54].

4.5 У разі перерви в подачі електроенергії електроприлади повинні бути негайно вимкнені.

4.6 Забороняється використання в межах одного робочого місця електроприладів класу «0».

4.7 Категорично забороняється торкатися до корпусу пошкодженого приладу або струмопровідних частин з порушеною ізоляцією і одночасно до заземленого обладнання (інший прилад з справним заземленням, водопровідні труби, опалювальні батареї), або торкатися до ушкодженого приладу, стоячи на вологій підлозі [49].

4.8 У разі ураження електричним струмом необхідно якомога швидше звільнити потерпілого від дії електричного струму, відключивши електроприлад, якого торкається потерпілий. Відключення проводиться за допомогою вимикача або рубильника.

4.9 При неможливості швидкого відключення електроприладу необхідно звільнити потерпілого від струмопровідних частин дерев'яним або іншим предметом, який не проводить струм

4.10 У всіх випадках ураження електричним струмом необхідно викликати лікаря [53].

5.1 Загальні положення зберігання реактивів

5.1.1 Лабораторні запаси реактивів повинні зберігатися в спеціально обладнаних, добре вентильованих, сухих місцях, згідно з правилами безпеки

5.1.2 При розміщенні реактивів в лабораторії слід неухильно дотримуватися порядку сумісного зберігання горючих і вибухонебезпечних речовин. Не дозволяється сумісне зберігання реактивів, здатних реагувати один з одним з виділенням тепла або горючих газів. Забороняється також спільно зберігати речовини, які в разі виникнення пожежі можна гасити одним вогнегасним засобом.

5.1.3 Забороняється розфасовувати сипучі речовини на складі.

5.1.4 Основним правилом при зберіганні і відборі реактивів є запобігання їх від забруднення.

5.1.5 На всіх упаковках з реактивами повинні бути етикетки із зазначенням назви, кваліфікації та строку придатності.

5.1.6 Реактиви, які не можна зберігати в скляній тарі, поміщають в тару з матеріалів, стійких до дії даного реактиву. Наприклад, плавікову кислоту і луги зберігають в бутлях з поліетилену.

5.1.7 Реактиви, що розкладаються або змінюють свої властивості під дією світла (наприклад, діетиловий ефір, пероксиди, солі срібла), зберігають у склянках з темного або жовтого скла.

5.1.8 Гігроскопічні речовини і речовини, що окислюються при зіткненні з повітрям, повинні зберігатися в герметичній тарі. Для герметизації пробок використовують парафін.

5.1.9 Відпрацьовані реактиви необхідно зливати в окремій ємності для подальшої переробки або передачі в організації, що займаються утилізацією хімічних речовин [52].

5.2 Зберігання хімічних реактивів в лабораторії

5.2.1 У робочих приміщеннях допускається зберігати нелеткі, не пожежонебезпечні і малотоксичні тверді речовини і водні розчини, розбавлені кислоти і луги, в кількостях, необхідних для аналізів.

5.2.2. Концентровані кислоти в обсязі не більше 2 дм³ зберігаються в скляному посуді з притертою скляними кришками або пластмасовими пробками в ексикаторі або скляній ємності з кришкою в витяжній шафі. Для кращої герметичності надягають гумові ковпачки.

5.2.3 Концентровані розчини лугів зберігають у витяжній шафі, окремо від кислот, в поліетиленовій тарі. Разом з лугами зберігається аміак.

5.2.4. Зберігання легкозаймистих рідин (ЛЗР) допускається в товстостінних, забезпечених герметичними пробками бутлях, місткістю не більше 1 дм, особливо небезпечні ЛЗР (в обсязі не більше добової потреби). Бутлі з ЛЗР поміщають в спеціальні металеві ящики далеко від джерел тепла і окислювачів (хлоратів, нітратів, азотної кислоти, перекису водню, перманганатів). Допустимі обсяги (ЛЗР) дозволені до зберігання в робочих приміщеннях.

5.2.5 Органічні речовини з різким запахом дратівливим (піридин, ізоаміловий спирт і ін.) зберігаються в тарі, з добре закритими пробками та гумовими ковпачками.

5.2.6 Металева ртуть та інші отруйні речовини зберігаються в шафах, що замикаються (сейфах) в суворій відповідності з інструкціями по їх зберіганню.

5.2.7 Їдкі речовини (залізо трихлористе, йод, триетаноламін, валеріанова, пропіонова та ін. органічні кислоти), зберігаються в скляному посуді з пробками в металевому ящику під витяжною шафою. Для кращої герметичності на пробки надягають гумові ковпачки [55].

5.3 Правила зберігання пожежонебезпечних реактивів

5.3.1 Запаси пожежонебезпечних реактивів повинні зберігатися в ізольованих, добре вентильованих приміщеннях вдалині від опалювальних приладів і прямих променів сонця або в спеціалізованих шафах. Гасіння пожежі водою і повітряно-механічною піною неприпустимо!

5.3.2 У місцях зберігання пожежонебезпечних реактивів заборонено розміщувати сторонні предмети і меблі, які затуляють доступ до засобів пожежогасіння.

5.3.3 Зберігання пожежонебезпечних речовин допускається в строго відповідній тарі, яка має етикетки з точним найменуванням речовини і написом «Вогненебезпечно» ( «Вибухонебезпечно»).

5.3.4 Спільне зберігання в одному приміщенні самозаймистих, вогненебезпечних та вибухонебезпечних речовин не допускається. При відсутності окремих приміщень допускається зберігання невеликих кількостей (10-15 г) вищеназваних речовин в одному приміщенні, але в окремих, щільно закритих залізних шафах.

5.3.5 Забороняється також спільно зберігати речовини, які здатні при своїй взаємодії викликати утворення полум'я або виділяти велику кількість тепла [56].

6. Правила роботи з хімічними речовинами

6.1 Загальні положення При роботі в хімічній лабораторії необхідно дотримуватися вимог техніки безпеки по ГОСТ 12.1.007-76 «Шкідливі речовини. Класифікація і загальні вимоги безпеки.

6.1.1 При роботі з хімічними реактивами в лабораторії повинно знаходитися не менше двох співробітників.

6.1.2 Приступаючи до роботи, співробітники зобов'язані оглянути і привести в порядок своє робоче місце, звільнити його від непотрібних для роботи предметів.

6.1.3 Перед роботою необхідно перевірити справність обладнання, рубильників, наявність заземлення та ін.

6.1.4 Робота з їдкими і отруйними речовинами, а також з органічними розчинниками проводиться тільки в витяжних шафах.

6.1.5 Забороняється набирати реактиви в піпетки ротом, для цієї мети слід використовувати гумову грушу або інші пристрої.

6.1.6 При визначенні запаху хімічних речовин слід нюхати обережно, направляючи до себе пари або гази рухом руки.

6.1.7 Роботи, при яких можливе підвищення тиску, перегрів скляного приладу або його поломка з розбризкуванням гарячих або їдких продуктів, також виконуються в витяжних шафах. Виконавець роботи повинен надіти захисні окуляри (маску), рукавички і фартух.

6.1.8 Під час виконання робіт в витяжній шафі стулки шафи слід піднімати на висоту не більше 20-30 см так, щоб в шафі знаходилися тільки руки, а спостереження за ходом процесу вести через скло шафи.

6.1.9 При роботі з хімічними реактивами необхідно вмикати і вимикати витяжну вентиляцію не менше ніж за 30 хвилин до початку, і після закінчення робіт.

6.1.10 Змішування або розведення хімічних речовин, що супроводжується виділенням тепла, слід проводити в термостійкому або фарфоровому посуді.

6.1.11 При упарюванні в стаканах розчинів слід ретельно перемішувати їх, так як нижні і верхні шари розчинів мають різну щільність, внаслідок чого може статися викидання рідини.

6.1.12 Щоб уникнути опіків, уражень від бризок і викидів не можна нахилятися над посудом, в якій кипить якась рідина.

6.1.13 Нагрівання посуду зі звичайного скла на відкритому вогні без асбестірованной сітки заборонено.

6.1.14 При нагріванні рідини в пробірці тримати її слід отвором в сторону від себе і від інших співробітників.

6.1.15 За жодних обставин не можна допускати нагрівання рідин в колбах або приладах, що не сполучаються з атмосферою.

6.1.16 Нагріту посудину не можна закривати притертою пробкою доти, поки віна не охолоне до температури навколишнього середовища [49].

6.2 Робота з кислотами і лугами

6.2.1 Робота з концентрованими кислотами і лугами проводиться тільки в витяжній шафі і з використанням захисних засобів (рукавичок, окулярів). При роботі з димами азотної кислоти з питомою густиною 1,51-1,52 г / см³, а також з олеумом слід надягати також гумовий фартух.

6.2.2 Використовувані для роботи концентровані азотна, сірчана, соляна кислоти повинні зберігатися у витяжній шафі в скляному посуді ємністю не більше 2 дм³. У місцях зберігання кислот неприпустимо знаходження легкозаймистих речовин. Розбавлені розчини кислот (за винятком плавикової) також зберігають в скляному посуді, а лугів - в поліетиленовій тарі.

6.2.3 Для приготування розчинів сірчаної, азотної та інших кислот їх необхідно доливати у воду тонким струменем при безперервному помішуванні. Для цього використовують термостійкий посуд, так як процес розчинення супроводжується сильним розігріванням. Доливати воду в кислоти забороняється!

6.2.4 У разі попадання кислоти на шкіру уражене місце слід негайно промити протягом 10-15 хвилин швидкоплинним струменем води, а потім нейтралізувати 2-5% розчином карбонату натрію.

6.2.5 Пролиту кислоту слід засипати піском. Після прибирання піску місце, де була розлита кислота, посипають вапном або содою, а потім промивають водою [49-51].

* 1. Робота з легкозаймистими рідинами (ЛЗР)

До роботи з ЛЗР і іншими пожежонебезпечними речовинами допускаються співробітники, які вивчили інструкції з техніки пожежної безпеки та пройшли відповідний інструктаж.

Для роботи з ЛЗР треба виконувати наступні правила:

6.3.1 Перед роботою з ЛЗР слід перевірити наявність і підготувати до використання первинні засоби пожежогасіння.

6.3.2 Забороняється проводити будь-які роботи з ЛЗР поза витяжної шафи!

6.3.3 Перегонку і нагрівання низькокип`ящих легкозаймистих рідин слід проводити в колодонних колбах, встановлених на банях, заповнених відповідним теплоносієм (вода, масло, пісок). Для нагрівання лазень слід користуватися електроплитками тільки з закритими нагрівальними елементами. Проводити перегонку ЛЗР на хустках з відкритою спіраллю забороняється!

6.3.4 При перегонці ЛЗР слід постійно стежити за роботою холодильника.

6.3.5 Забороняється нагрівати на водяних банях речовини, які можуть вступати в реакцію з водою з вибухом або виділенням газів.

6.3.6 Лабораторні установки, в яких проводилося нагрівання ЛЗР, дозволяється розбирати тільки після охолодження їх до кімнатної температури.

6.3.7 У разі протоки або займання ЛЗР слід вимкнути всі електронагрівальні прилади, а при необхідності знеструмити лабораторію відключенням загального рубильника. Місце протоки ЛЗР слід засипати сухим піском, а потім зібрати його дерев'яним або пластиковим совком. Застосування металевих совків забороняється.

6.3.8 Необхідно суворо стежити за тим, щоб ємкості з ЛЗР не опинилися поруч з нагрітими предметами і не освітлювалися прямими сонячними променями, тому що всередині герметично закритій ємності створюється тиск, що може викликати руйнування скляної пляшки.

6.3.9 При заповненні скляних пляшок ЛЗР «під пробку» при підвищенні температури на 5-10 градусів може відбутися руйнування бутля. Для запобігання цьому ЛЗР не доливають в бутлі приблизно на 10 мл.

6.3.10 Перекисні сполуки вимагають такої ж обережності в поводженні, як і інші пожежонебезпечні речовини. У процесі роботи з ними неприпустимо розігрівання перекисів вище температури їх розкладання.

6.3.11 Обов'язковою умовою роботи з перекисними сполуками є дотримання чистоти робочого місця, приладів і посуду.

6.3.12 Для гасіння органічних перекисів слід застосовувати воду, для неорганічних [55].

6.4 Робота з твердими речовинами

6.4.1 Всі сухі реактиви необхідно брати порцеляновими ложками, шпателями. Брати реактиви незахищеними руками забороняється!

6.4.2 При зважуванні твердих речовин завжди треба користуватися будьякої тарою. Неприпустимо насипати речовини безпосередньо на чашку ваг.

6.4.3 Роботи з отруйними та шкідливими твердими речовинами слід проводити тільки у витяжній шафі і з усіма запобіжними заходами.

6.4.4 Необхідно проявляти обережність при змішуванні твердих речовин (особливо органічних), тому що утворюється пил може бути вибухової. Забороняється змішувати сухі реактиви поблизу включених електронагрівальних приладів.

6.4.5 Роботу з порошкоподібними речовинами для запобігання їх розпилення потрібно проводити в таких місцях, де немає протягів або сильного руху повітря.

6.4.6 Випадково розсипаний на стіл реактив не можна всипати назад в ту ж банку, де він зберігається.

6.4.7 Роботи з лужними металами слід проводити в витяжній шафі на чистому і сухому місці, застосовуючи мінімальні їх кількості і користуючись захисними окулярами і гумовими рукавичками. Щоб уникнути займання лужних металів, не можна допускати попадання на них води.

6.4.8 З пожежонебезпечними реактивами слід працювати далеко від вогню і працюючими нагрівальними приладами [49-51].

6.5 Робота з отруйними газоподібними речовинами

6.5.1 Роботу з отруйними газоподібними речовинами проводять обов'язково у витяжній шафі.

6.5.2 Перед роботою необхідно перевірити силу тяги у витяжній шафі. При поганій або недостатній тязі працювати з отруйними газоподібними речовинами заборонено.

6.5.3 Під час виконання робіт з отруйними газоподібними речовинами необхідно мати напоготові протигаз [49-51].

7. Експлуатація балонів і посудин, що працюють під тиском і вакуумом

7.1 При роботі із стисненими та зрідженими газами необхідно строго слідувати інструкції з безпечної експлуатації балонів та посудин, що працюють під тиском і вакуумом. Інструкція повинна бути вивішена на робочому місці.

7.2 По лабораторії призначається спеціально підготовлений співробітник, відповідальний за справний стан посудин, що працюють під тиском.

7.3 Обслуговування посудин і балонів, що працюють під тиском допускаються співробітники, які пройшли інструктаж і співбесіду з питань безпечної роботи з судинами високого тиску. Періодична перевірка знань персоналу здійснюється не рідше одного разу на рік.

7.4 Балони, що містять стислі гази (аргон, водень, метан, кисень) допускається встановлювати в спеціально відведеному місці, що виключає скупчення людей, надійно укріпивши в вертикальному положенні на відстані не менше 1 м від опалювальних приладів і не менше 5 м від джерела тепла з відкритим полум'ям. У приміщенні лабораторії допускається встановлювати балони з інертними газами (гелій, азот, аргон).

7.5 Газ з балона повинен витрачатися через повірений редуктор, призначений для даного газу. Камера низького тиску редуктора повинна мати манометр і пружинний запобіжний клапан, відрегульований на дозволений тиск в ємності, в яку перепускается газ. Відбір газу з балона без редуктора забороняється!

7.6 Перед приєднанням редуктора слід переконається у відсутності на всіх деталях слідів жиру і бруду, а також в наявності справної прокладки під накидною гайкою.

7.7 Забороняється потягувати будь-які деталі, заздалегідь не скинувши тиск газу в редукторі. Не дозволяється ремонтувати редуктор, встановлений на балоні, і вентиль.

7.8 Забороняється залишати без нагляду балон з незакритим вентилем або з непослабленим регулювальним гвинтом редуктора.

7.9 При досягненні в балоні залишкового тиску 0,1-0,15 мПа необхідно припинити роботу, закрити вентиль, зняти редуктор, навернути заглушку на штуцер вентиля. Випускати газ із балона забороняється.

7.10 При наявності пошкоджень корпусу (тріщин, вм'ятин, опуклостей) або вентиля, запотівання в зварних швах, течі в заклепувальних і болтових з'єднаннях, розриву прокладок або після закінчення терміну чергового огляду користуватися балоном забороняється.

7.11 При транспортуванні і установці балонів слід оберігати їх від нагрівання, поштовхів, ударів, падінь. Транспортують балони тільки на візках або носилках.

7.12 У разі замерзання слід відігрівати вентиль або редуктор гарячою чистою водою, поливаючи нею тканину, обгорнутими навколо вентиля. Застосовувати для відігрівання відкрите полум'я, пар забороняється!

7.13 Експлуатацію балонів слід негайно припинити при: підвищенні тиску в посудині вище дозволеного; -виявлення пошкоджень корпусу і з'єднань; -несправність манометра і неможливості визначити тиск іншими приладами; виникнення пожежі.

7.14 При обслуговуванні лабораторних приладів та посудин, що працюють підтиском, необхідно користуватися запобіжними масками, окулярами або іншими пристосуваннями [49-51].

8. Утилізація хімічних реактивів

8.1.1 Відпрацьовані розчини в лабораторіях збирають і закриваються в ємкості місткістю не менше 5 л. Обов'язково проводити розподіл відходів: органічні сполуки (збирати тільки в пластикових ємкостях), неорганічна (якщо кількість невеликого, то можна збирати в скляних пляшках, з щільною кришкою), галоген- органічні розчинники (хлороформ і хлоровмісні). Після того як вона наповниться на 4/5, перевіряють рН і нейтралізують при необхідності рідина до рН = 7-7,5 твердими карбонатами або гідроксидами натрію або калію. По можливості зважити відходи.

8.1.2 Щомісячно до 20-го числа кожного місяця відповідальні за лабораторії, за збір відходів зобов'язані повідомляти координаторів про кількість накопичених відходів.

8.1.3. Координатор заздалегідь повідомляє в відділі постачання і інженер з охорони праці про необхідність утилізації і заміні заповнених ємкостей.

8.2. Реактиви з вичерпаним терміном придатності або ті, які втратили властивості з інших причин (порушення умов зберігання реактиву, герметичності його упаковки), підлягають утилізації, списуються з складанням акту, упаковується в окремій тарі по групах зберігання і передаються до централізованої утилізації відповідальному в інституту. Підготовлені до утилізації реактиви зберігають в спеціальній тарі в спеціально відведеному місці [49-51].

# ВИСНОВКИ

1. Загальна кількість лейкоцитів у жінок із ризиком розвитку СГЯ підвищувалася на 18,8%, а із клінічними ознаками гіперстимуляції на 36,4% відносно групи без ознак СГЯ. Збільшення кількості лейкоцитів відбувалося за рахунок абсолютної кількості сегментоядерних нейтрофілів, які підвищувалися в 1,5 рази в обох групах жінок.
2. У жінок із ризиком розвитку СГЯ знижуються на 36 % та на 80 % відповідно показники загальної РБТ та РБТЛ, що свідчить про зниження проліферативної здатності клітин. У жінок з ознаками СГЯ зниження РБТ та РБТЛ було більш суттєвим – у 1,8 та 2,2 рази відповідно, що вказує на виснаження імунної системи.

## У жінок із клінічними ознаками гіперстимуляції яєчників після гормональної стимуляції відбувається збільшення у 4,5 разів кількості фолікулів порівняно із жінками без ознак СГЯ та у 1,5 разів порівняно із жінками з ризиком розвитку СГЯ. Це дозволяє вважати даний критерій прогностичним при розвитку СГЯ.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

До прогностичних лабораторних критеріїв ризику розвитку ранньої форми СГЯ, за нашими даними, можна віднести підвищення кількості фолікулів (>10), загальної кількості лейкоцитів та зниження показника загальної та лімфоцитарної реакції баластної трансформації. Ці лабораторні показники можуть надати додаткову інформацію для підтвердження СГЯ на практиці.

Результати даної кваліфікаційної роботи можуть бути впроваджені на біологічному факультеті при викладанні навчального курсу «Загальна імунологія» в розділі «Імунологія репродукції».

# ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Башмакова Н. В., Дубровина О. С., Лисовская Т. В., Резажкин А. В. Способ прогнозирования синдрома гиперстимуляции яичников в случае применения вспомогательных репродуктивных технологий. *European patent office*, 2017. 143 с.
2. Семинский И. Ж. Экстракорпоральное оплодотворение: медицинские и социальные аспекты (Лекция 7). *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2015. Т. 31, № 2. С. 75-79.
3. Корнеева И. Е., Веряева Н. А., Гельфанд Б. Р. Синдром гиперстимуляции яичников: проблема интенсивной терапии. *Анестезиология и реаниматология*. 2015. № 6. С. 59-63.
4. Маршалов Д. В., Салов И. А., Шифман Е. М. Роль внутрибрюшной гипертензии в развитии и исходах синдрома гиперстимуляции яичников. *Анестезиология и реаниматология*. 2013. № 6. С. 41-46.
5. Smith V. Prevention of Ovarian Hyperstimulation Syndrome: *Obstetrics and Gynecology International*. Vol. 2015, Р. 1-10.
6. Егорова Е. А., Е. А. Терентьева А. П. Синдром гиперстимуляции яичников. *Радиология – практика.* 2015. № 3 (51). С. 29-36.
7. Корнеева И. Е. Сароян Т. Т. Калинина Е. А Синдром гиперстимуляции яичников: этиопатогенез, клиника, диагностика. *Акушерство и гинекология.* 2013. № 7. С. 8-13.
8. Бицадзе В. О., Акиньшина С. В., Андреева М. Д. Тромбоэмболические осложнения, связанные с использованием вспомогательных репродуктивных технологий. Синдром гиперстимуляции яичников. *Акушерство. Гинекология. Эндокринология*. 2013. № 7 (76). С. 20-31.
9. Сафронова Е. В., Сафронова Е. В., Кудрявцева Л. И., Пастухова Е. А. Профилактика синдрома гиперстимуляции яичников в програмах вспомагательных репродуктивних технологий. *Вестник* СамГУ ─ Естественнонаучная серия. 2017. № 9/1 (59). С.384-390.
10. Ashrafi M., Akhoond M., Bahmanabadi A., Arabipoor A. Predictive factors of early moderate/severe ovarian hyperstimulation syndrome in non-polycystic ovarian syndrome patients: a statistical model *Archives of gynecology and obstetrics.* 2015. Vol. 292, № 5. P. 1145-1152.
11. Веропотвелян П. Н., Гужевская И. В., Веропотвелян Н. П. Синдром гиперстимуляции яичников: роль иммунных факторов. *Медицинские аспекты здоровья женщины*. 2013. № 1 (64). С. 34-42.
12. Куликов А. В., Шифман Е. М., Портнов И. Г. Интенсивная терапия синдрома гиперстимуляции яичников (клинические рекомендации). *Анестезиология и реаниматология*. 2015. № 1. С. 73-76.
13. La Marca A., Grisendi V., Giulini S. Individualization of the FSH starting dose in IVF/ICSIcycles using the antral follicle count. *J. of ovarian research.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 11.
14. Булычева Т. И. Анализ пролиферативной активности клеток с помощью новых моноклональных антител к ядрышковому белку В23/нуклеофозмину. *Цитология*. 2016. Т. 42(10), № 3. С. 944-954.
15. Prakash A., Mathur R. Ovarian hyperstimulation syndrome. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2013. Vol. 15. P. 31-35.
16. Стрельченко Д. А., Перминова С. Г., Донников А. Е., Абрамов Д. Д. Способ прогнозирования синдрома гиперстимуляциияичников в программе ЭКО на основании опеределения полиморфизмов генов VEGFA и TSHR. *Europeanpatent office*. 2016. 156 с.
17. Булычева Т. И., Дейнеко Н. Л., Артеменко Е. Г., Самойлова Р. С. Диагностическое значение ядрышкового белка В23-нуклеофозмина при хронических лимфопролиферативных заболеваниях. *Лабораторная диагностика.* 2016. Т. 10, №2. С. 16-21.
18. Ugurlucan F. G., Karamustafaoglu B., Lyibozkurt A. G. Nephrotic sydrome developing in severe ovarian hyperstimulation syndrome*. International J. of Fertility & Sterility.* 2014. Vol. 7, № 4. Р. 345-348.
19. Булычева Т. И. Особенности иммунной системы у больных лейкозами после трансплантации аллогенного костного мозга. *Иммунология.* 2018. №5. С. 46-52.
20. Tehrani, H., Mostajeran, F. & Shahsavari, S. The effect of calcium and Vitamin D supplementation on menstrual cycle, body mass index and hyper and rogenism state of women with polycysticovarian syndrome: a clinical trial study. *J. Res. Med. Sci.* 2014, № 19. P. 875-880.
21. Григорьев А. А., Жарская О. О., Булычева Т. И., Зацепина О. В. Изменения состояния ядрышка при длительном культивировании культуры клеток человека HeLa. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т. 144, №9. С. 321-325.
22. Brien T. J. O., Kalmin M. M., Harrison A. F. Association between the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) rs4073366 polymorphism and ovarian hyperstimulation syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Reproductive biology and endocrinology*. 2013. Vol. 11, № 1. С. 67-71.
23. Драник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология. Москва : Медицинское информационное агентство, 2013. 180 с.
24. Лебедев К. А., Понякина И. Д. Иммунная недостаточность. Москва : Медицинская книга, 2013. 146 с.
25. Малышева М. В. Содержание ключевых белков ядрышка в лимфоидных клетках здоровых лиц и больных с лимфопролиферативными заболеваниями. *Клиническая лабораторная діагностика.* 2010. №12. С. 35-39.
26. Малышева М. В., Дейнеко Н. Л., Булычева Т. И., Зацепина О. В. Сравнительный анализ экспрессии ключевых белков ядрышка в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров, активированных к пролиферации in vitro. *Иммунология.* 2010. Т. 31, №1. С. 13-17.
27. Новиков Д. К., Новикова В. И. Оценка иммунного статуса. Москва : Медицина, 1995. 23 с.
28. Hamdine O., Eijkemans M. J., Lehtjes E. W. Ovarian response prediction in GnRH antagonist treatment for IVF using anti-Müllerian hormone. *Human Reproduction*. 2014. Vol. 30, № 1. С. 170-178.
29. Самойлова Р. С., Булычева Т. И. Иммунофенотипирование в диагностике хронических лимфоидных заболеваний. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013. № 11. С. 35-39.
30. La Marca A., Sunkara S. K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Human reproduction update*. 2013. Vol. 20, № 1. Р. 124-140.
31. Каширин В. А., Томашевский А. В. Основы компьютерных технологий статистического анализа медицинской информации. Запорожье : ЗМАПО, 2014. 196 с.
32. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Практикум з імунології. Методологія імунної системи ссавців : навчально-методичний посібник. Запоріжжя : Copy art, 2012. 152 с.
33. Ashwood P. Altered Т cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun*. 2011. Vol. 25(5). P. 840-849.
34. Baish G., Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateu phase cells with the proliferation associated antibody Ki 67 and propidium iodide: Analysis by flow cytometry. *Cell tissue Kinet.* 2018. Vol. 20. P. 387-391.
35. Beresford M. J., Wilson G. D., Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications*. Breast Cancer Res*. 2016. Vol. 8(6). P. 216.
36. Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human Т cells. / Chien C. H. et al. *Hum Reprod*. 2014. Vol. 24(8). P. 1968-1975.
37. Dabrowski M. P., Stankiewicz W., Plusa T. Competition of IL-1 and IL-1ra determines lymphocyte response to delayed stimulation with PHA. *Mediators Inflamm*. 2001. Vol. 10, No 3. P. 101-107.
38. Regulatory NK cells suppress antigen-specific Т cell responses. / Deniz G. at all *J. Immunol*. 2008. Vol. 180. No 2. P. 850-857.
39. A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes. / N. N Dergunova et al. *Immunology Letters*. 2002. Vol. 83. P. 67-72.
40. Шушкевич Н. И. Практикум по дисциплине «Иммунология». Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2007. 56 с.
41. Н. М. Подзолкова. Современные представления о синдроме поликистозных яичников. *Фарматека*. 2016. № 3. 8–15 с.
42. Селиванов Е. В. Красители в биологии и медицине: справочник. Барнаул : Азбука, 2003. 40 с.
43. Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К., Вихоть Н. Е. Иммунология. Практикум: учебн. пособие для биол. спец. вузов. 1989. 34 с.
44. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа: практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и EXCEL: учебное пособие. Москва : ФОРУМ, 2008. 464 с.
45. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Москва : Медисфера, 2006. 312 с.
46. Вдовиченко Ю. П., Вітюк А. Д., Грищенко М. Г., Паращу В. Ю. Синдром гіперстимуляції яєчників: прогнозування, профілактика та оптимізація лікування : метод. рек. Український центр наукової медичної інформації та патентноліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ : Карат Лтд, 2016.
38 с.
47. Bulavenko O., Konkov D., Burtyak N. Ovarian hyperstimulation syndrome. The new approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Вісник морфології*. 2015. Т. 21 № 2, С. 525-531.
48. Аншина М. Б., Исакова Э. В., Калинина Е. А. Синдром гиперстимуляции яичников клинические рекомендации. *В помощь практикующему врачу.* 2013. № 2 (15). С. 39-44.
49. Трахтенберг І. М. Гігієна праці і виробнича санітарія: підручник. Київ видавництво. 1997. 464 с.
50. Кудрієв Ю. І., Яворовський О. П., Шевченко А. М. Гігієна праці: підручник / за ред. НАН України, НАМН України. Київ : ВСВ, 2011. 904 с.
51. Шевченко A. M., Яворівський О. П. Гігієна праці. Вінниця : Нова книга, 2005. 840 с.
52. Савчук О. М. Основи охорони праці : конспект лекцій в 2-х ч. Запоріжжя : Просвіта, 2000. 124 с.
53. ГОСТ 12.1.030-81. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление. Система стандартов безопасности труда. [Чинний від 1982-07-01]. Изд. офиц. Москва : Издательство стандартов, 1982. 35 с.
54. ГОСТ 12.2.007.0-75. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности. [Чинний від 1978-01-01]. Изд. офиц. Москва : Государственный стандарт Союза ССР, 1978. 70 с.
55. Семенов А. С. Охрана труда и техника безопасности по химии : учебное пособие для пед. вузов. Москва : Просвещение, 1981. 142 с.
56. ДСП 9.9.5-080-02. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю. [Чинний від 2002-01-28]. Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2002. 39 с.