

ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра фізіології, імунології і біохімії
з курсом цивільного захисту та медицини

Кваліфікаційна робота

Магістра

на тему: АКТИВАЦІЙНІ ЛЕКТИНЦИТОХІМІЧНІ МАРКЕРИ
ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ТА У ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ
ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0919-б

Напряму підготовки: 091 Біологія,
освітньої програми Біологія

Грома Н. В.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Керівник професор, професор Омелянчик Л. О.

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

Рецензент професор, доцент Єщенко Ю. В.

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

ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біологічний

Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри Бовт В.Д.

«10» вересня 2019 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Громі Наталії Володимирівні

1. Тема роботи (проекту) «Активаційні лектинцитохімічні маркери лімфоцитів периферичної крові та у гістологічних зразках при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій»

керівник роботи (проекту) проф., проф. Омелянчик Людмила Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом ЗНУ від «13»липня 2020 р. № 1027-с

2. Строк подання студентом роботи (проекту) Грудень 2020 р.

3. Вихідні дані до роботи курсора робота «Лектини як маркери лімфоцитів», кваліфікаційна робота бакалавра «Активаційні лектинцитохімічні маркери лімфоцитів периферичної крові жінок при ускладненнях допоміжних репродуктивних технологій»

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
1) отримати гістологічні зразки органів ссавців у моделі навантаження високими дозами гонадотропних гормонів; 2) підібрати лінійку лектинів для виявлення і опису клітин тканини яєчника, 3) встановити особливості розподілу активаційних лектинцитохімічних рецепторів лімфоцитів на гістологічних зрізах яєчників щурів; 4) дослідити лейкограму жінок при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників; 5) вивчити частоту активованих лімфоцитів периферичної крові у жінок при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників за допомогою лектинової цитохімії.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень):

Таблиця 1.1-1.2, Таблиця 3.1-3.6, Рисунок 2.1 – підрахунок клітинних структур за Автанділовим, Рисунок 3.1-3.6 – гістологічні зрізи.

6. Консультанти роботи з вказівкою розділу

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 4	Костюченко О. В., к. б. н., доцент		

7. Дата видачі завдання 19.09.2019 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

Назва етапів дипломного проекту (роботи)	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
Пошук літератури з теми дипломної роботи	листопад 2019	Виконано
Написання глави «Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях»	грудень 2019	Виконано
Підбір методів дослідження	січень 2020	Виконано
Написання глави «Матеріали та методи дослідження»	лютий 2020	Виконано
Проведення дослідів на щурах	березень 2020	Виконано
Фарбування та аналіз препаратів	квітень 2020	Виконано
Аналіз отриманих результатів	травень 2020	Виконано
Складання таблиць і рисунків	вересень 2020	Виконано
Написання глави «Експериментальна частина», висновків	жовтень 2020	Виконано
Підготовка доповіді і оформлення документів	листопад 2020	Виконано
Представлення роботи на захист	грудень 2020	Виконано

Студентка

_____ (підпис)

Н. В. Грома
(ініціали та прізвище)

Керівник роботи (проекту)

_____ (підпис)

Л. О. Омелянчик
(ініціали та прізвище)

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер

_____ (підпис)

Н. І. Костюченко
(ініціали та прізвище)

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 82 сторінках друкованого тексту, містить 8 таблиць. Список літератури включає 83 джерела, в тому числі 7 – іноземною мовою.

Метою роботи було вивчити частоту активаційних лектинцитохімічних маркерів лімфоцитів периферичної крові та у гістологічних зразках при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій

Дослідження проведено на базі лабораторії клітинних популяцій Запорізького національного університету. Гістологічні дослідження виконані спільно з науково-дослідною лабораторією кафедри анатомії Запорізького державного медичного університету. Дослідження периферичної крові обстежених жінок з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників виконувалось за договором з клініко-діагностичною лабораторією комунальної установи «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької міської ради.

У експериментальній моделі синдрому гіперстимуляції яєчників, отриманій на щурах молодого віку, у гістологічних зразках яєчників при збільшенні дози гонадотропних гормонів виявлено підвищення інфільтрації тканин яєчника Т-лімфоцитами, а саме Т-хелперами/індукторами та їх активованими формами, що може свідчити про активацію імунних процесів у організмі ссавців під впливом фолікулостимулюючого гормону.

У обстежених з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників порівняно з групою контролю (без ризику розвитку синдрому гіперстимуляції) виявлено статистично значиме ($p \leq 0,05$) підвищення загальної кількості вилучених ооцитів (фолікулів), лейкоцитів та абсолютного вмісту сегментоядерних нейтрофілів, що свідчить про активаційні процеси в організмі жінок після гормональної терапії.

**ЛЕКТИНИ, ЛІМФОЦИТИ, РЕЦЕПТОРИ, ПЕРИФЕРИЧНА КРОВ,
СИНДРОМ ГІПЕРСТИМУЛЯЦІЇ ЯЄЧНИКІВ.**

ABSTRACT

The work is presented on 82 pages of printed text, contains 8 tables. The list of literature includes 83 sources, including 7 - in a foreign language.

The aim of the study was to study the frequency of activation lectin cytochemical markers of peripheral blood lymphocytes and in histological samples using assisted reproductive technologies.

The study was conducted on the basis of the laboratory of cell populations of Zaporizhia National University. Histological examinations were performed jointly with the research laboratory of the Department of Anatomy of Zaporizhia State Medical University. The study of peripheral blood of the examined women at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome was performed under a contract with the clinical diagnostic laboratory of the municipal institution "Regional Medical Center for Human Reproduction" of Zaporizhia City Council.

In an experimental model of ovarian hyperstimulation syndrome obtained in young rats, histological samples of ovaries with increasing doses of gonadotropic hormones revealed an increase in ovarian tissue infiltration by T lymphocytes, namely T-helpers / inducers and their activated forms, which may indicate the formation of in mammals under the influence of follicle-stimulating hormone.

In those examined with the risk of ovarian hyperstimulation syndrome compared with the control group (without the risk of hyperstimulation syndrome) found a statistically significant ($p \leq 0.05$) increase in the total number of removed oocytes (follicles), leukocytes and the absolute content of segmental neutrophils, indicating activation in women after hormone therapy.

LECTINES, LYMPHOCYTES, RECEPTORS, PERIPHERAL BLOOD, OVARIAN HYPERSTIMULATION SYNDROME.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1 Загальні відомості про лектини	12
1.2 Класифікація лектинів	17
1.3 Лектини рослин, тварин, грибів та мікроорганізмів	19
1.4 Початок вивчення лектинів.....	22
1.5 Роль лектинів.....	25
1.6 Виділення та екстракція лектинів	26
1.7 Синдром гіперстимуляції яєчників	29
1.8 Класифікація СГЯ	30
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
2.1 Об'єкти і матеріали дослідження	33
2.2 Методи дослідження.....	35
2.2.1 Визначення кількості лейкоцитів за П'ятницьким.....	35
2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові	37
2.2.3 Виділення лімфоконцентрату	39
2.2.4 Визначення розмірів гістологічних зрізів за Автанділовим.....	40
2.3 Приготування мікропрепаратів для лектинової цитохімії.....	41
2.4 Постановка лектинцитохімічної реакції на гістологічних мікропрепаратах щурів.....	42
2.5 Статистична обробка отриманих результатів	43

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	45
3.1 Гістологічні дослідження яєчників та селезінки ссавців при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників.....	45
3.2 Особливості розподілу глікокон'югатів у селезінці щурів в нормі та після гормонального навантаження	46
3.3 Лектингістохімічні дослідження яєчників ссавців при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників	47
3.4 Кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові обстежених з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників	53
3.5 Фарбування мікропрепаратів з використанням лектинової цитохімії ...	58
3.6 Виявлення мембранних активаційних рецепторів лімфоцитів периферичної крові з використанням методу лектинової цитохімії	59
4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКИ В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ	63
ВИСНОВКИ.....	72
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	73
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	74

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АО – Акридиновий оранжевий

ІІ – Інтерлейкін

ЗФР – Забуферений фізіологічний розчин

МКАТ – Моноклональні антитіла

ФГА – Фітогемаглютинін

CD – Cluster of differentiation (Cluster Designation) – кластер диференціровки

Con A – Лектин конканаваліну А

НРА – Лектин виноградного слимака

LCA – Лектин сочевиці

PFA – Лектин ікри окуня

PNA – Лектин арахісу

SBA – Лектин сої

WGA – Лектин зародків пшениці

ВСТУП

Лектини – це група речовин білкової природи неімунного походження, які володіють властивостями зворотньо і вибірково зв'язувати вуглеводи і вуглеводні детермінанти біополімерів без змін їх ковалентної структури. Інтерес до лектинів з боку фармацевтичної науки проявлявся з моменту їх відкриття, так як вони мають ряд унікальних властивостей, які дозволяють вважати перспективним їх застосування у фармацевтичній та медичній практиці. Однак застосувати лектини у традиційних лікарських формах здебільшого неможливо. У настояях, відварах, настоянках з рослин, які найчастіше використовуються як лікарські форми, лектини не зберігаються. Тому на сьогодні вони знайшли практичне застосування лише у ряді вузькоспеціалізованих медичних галузей, таких як гістологія (виявлення вуглеводних структур на поверхні клітин і тканин), діагностика імунодефіцитних станів і виявлення хромосомних порушень, трансплантологія (розділення клітин крові та лімфоїдних клітин, відмінних за антигенними властивостями). Велика перспектива застосування лектинів у очищенні крові від вірусів, патологічно змінених глікопротеїнів, у цілеспрямованій доставці ліків до нормальних або патологічно змінених клітин і тканин організму або до інфекційних агентів [1].

У наш час із збільшенням генетичного тягара у популяції, зниженням рівня здоров'я сучасної людини, погіршенням екологічної ситуації актуальною також є проблема діїтонародження. Проте сучасні медичні технології не стоять на місці. Однією з таких технологій є отримання під впливом високих доз статевих гормонів одночасно значної кількості ооцитів та їх запліднення *in vitro*. Однак після введення високих доз гонадотропних препаратів існує високий ризик розвитку патологічних змін у організмі жінки. Одним з таких станів є ризик розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників, який характеризується системними зрушеннями в організмі, в тому

числі й значимими імунологічними активаційними реакціями. Під час розвитку такого стану ембріотрансфер вимушено відтермінують до відновлення організму. Проте консервація може впливати на якість ембріонів. Тому виявлення найбільш ранніх лабораторних маркерів розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників, ще до розвитку його клінічних ознак, є актуальною проблемою.

Метою роботи було вивчити частоту активаційних лектинцитохімічних маркерів лімфоцитів периферичної крові та у гістологічних зразках при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій

Для реалізації поставленої мети вирішувались такі завдання:

- 1) отримати гістологічні зразки органів ссавців у моделі навантаження високими дозами гонадотропних гормонів;
- 2) підібрати лінійку лектинів для виявлення і опису клітин тканини яєчника,
- 3) встановити особливості розподілу активаційних лектинцитохімічних рецепторів лімфоцитів на гістологічних зрізах яєчників щурів;
- 4) дослідити лейкограму жінок при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників;
- 5) вивчити частоту активованих лімфоцитів периферичної крові у жінок при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників за допомогою лектинової цитохімії.

Об'єкт дослідження: синдром гіперстимуляції яєчників при використанні допоміжних репродуктивних технологій.

Предмет дослідження: активаційні лектинцитохімічні маркери лімфоцитів.

Теоретичне значення роботи: отриманні результати поширюють уявлення про імунологічні показники при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників.

Практичне значення роботи: за вмістом активованих лімфоцитів формування груп ризику щодо реалізації синдрому гіперстимуляції яєчників.

Наукова новизна роботи: визначення вмісту активованих лімфоцитів при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників з використанням лектинової цитохімії.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальні відомості про лектини

З 1880-х років було відомо, що екстракти з деяких рослин можуть аглютинувати червоні кров'яні клітини, тобто викликати їх злипання. Перший лектин (рицин) був виділений Штильмарком з насіння рицини в 1888 р. У 1919 р. отримали перший кристалічний лектин – конканавалін А. У 40-х роках минулого століття речовини, які володіли здатністю вибірково приєднувати клітини в залежності від групи крові, викликаючи цим їх аглютинацію, отримали назву «аглютиніни».

Термін «лектин» (від латинського *legere* – вибирати, обирати) був введений Бойдом і Шарпле, щоб виділяти аглютиніни, які можуть розпізнавати типи червоних кров'яних клітин. Сьогодні термін «лектин» використовується у більш загальному сенсі та включає цукрозв'язуючі білки молекулярною масою 60 – 100 кДа з різних джерел, без урахування їх здатності аглютинувати клітини.

Лектини виявлені в рослинах, вірусах, мікроорганізмах і у тварин. Однак, незважаючи на широку поширеність лектинів в природі, їх функції до сих пір прийнято вважати не з'ясованими до кінця. У всіх лектинів існує загальна властивість – здатність зв'язуватися з певними цукрами, проте є дані, що їх роль в різних організмах неоднакова.

Більшість лектинів, відомих на даний момент, мультимерні, складаються з нековалентно зв'язаних субодиниць. Лектин може містити дві або більше однакові (конканавалін А) або ж різні (аглютинін квасолі звичайної) субодиниці.

Саме ця мультимерна структура надає лектинам здатність аглютинувати клітини або утворювати преципітати з глікокон'югатами по механізму, подібному з взаємодією антиген-антитіло. Хоча більшість лектинів можуть аглютинувати ті чи інші типи клітин, клітинна аглютинація

не є обов'язковою для всіх лектинів. деякі з них можуть зв'язуватися з клітинами і не викликати аглютинації (сукцинілірований конканавалін А), інші лектини можуть не зв'язуватися з клітинами взагалі. Остання властивість може бути наслідком особливої структури лектину або наслідком відсутності необхідного рецептора олігосахариду на поверхні клітини. Так як аглютинація клітин – спосіб, найбільш часто використовуваний для оцінки активності і кількості лектинів, багато неаглютинуючих лектинів можуть існувати в природі і при цьому не виявлятися стандартними методиками.

Деякі лектини виявляють токсичну активність. Це пов'язано з тим, що лектин може складатися з декількох субодиниць, частина може бути лектином, а інша частина при цьому є токсином.

Іноді такі лектини не виявляють аглютинуючу активність і, отже, не виявляються при стандартному аналізі. Відомі високотоксичні лектини, такі як лектин рицини Рицин, а також лектин Арбін з рослини *Arbus precatorius*, інші лектини мають низьку токсичність і небезпечні для життя людини і тварин тільки в значній кількості. Такий, наприклад, лектин конканавалін з рослини *Concanavalia ensiformis* [2].

Дослідження та застосування лектинів в Україні, започатковане в середині 70-х років, сьогодні продовжується в цілому ряді науково-дослідних та навчальних закладів медичного і біологічного профілю. Сильна біологічна активність ряду лектинів, зокрема селективна токсичність, протипухлинна, антивірусна та імуностимулююча дія, а також можливість використання лектинів для цілеспрямованої доставки лікарських засобів до тканин і клітин організму або для вилучення патологічно змінених глікопротеїнів з кровообігу є експериментальним підґрунтям у створенні лікарських засобів нового покоління. У зв'язку з цим лектинами все більше цікавляться науковці фармацевтичного профілю та фармацевтичні фірми розвинутих країн світу.

Тому дослідження сировинної бази лектинів, методи одержання чистих препаратів та дослідження різноманітних аспектів їх біологічної дії та застосування є сьогодні актуальною проблемою .

Для виявлення та ідентифікації вуглеводних детермінант на клітинній поверхні в якості зондів застосовують лектини і моноклональні антитіла. Існуючі методичні підходи для виявлення лектинів, пов'язаних з тканинними і клітинними структурами, можна розділити на дві групи: прямі методи, в яких використовують лектини, мічені флюорохромами, біотин, ферментами і т.п., і непрямі імунохімічні методи, в яких для виявлення зв'язаного лектина застосовують специфічні мічені антитіла або ліганди. Друга група методів видається більш раціональною, так як первинну обробку зразка проводять нативним лектином, що виключає можливість зміни його вуглеводної специфічності при синтезі мічених похідних.

Нові можливості цього підходу відкрилися при використанні колоїдного золота в якості мітки з наступним виявленням мікрочастинок золота за допомогою солей срібла (*immunogold silver staining, IGSS*), що дозволяє проводити дослідження за допомогою світлооптичної і електронної мікроскопії [3].

Одним із напрямків використання лектинів є лектинова гістохімія. В даний час являється перспективним напрямком у вивченні закономірностей гістогенеза і визначенні функціонального стану різних компонентів тканин.

Лектини – це група речовин білкової природи неімунного походження, які володіють властивостями зворотньо і вибірково зв'язувати вуглеводи і вуглеводні детермінанти біополімерів без змін їх ковалентної структури. Інтерес до лектинів з боку фармацевтичної науки проявлявся з моменту їх відкриття, так як вони мають ряд унікальних властивостей, які дозволяють вважати перспективним їх застосування у фармацевтичній та медичній практиці. Однак застосувати лектини у традиційних лікарських формах здебільшого неможливо. У настоях, відварах, настоянках з рослин, які найчастіше використовуються як лікарські форми, лектини не зберігаються.

Тому на сьогодні вони знайшли практичне застосування лише у ряді вузькоспеціалізованих медичних галузей, таких як гістологія (виявлення вуглеводних структур на поверхні клітин і тканин) [4], діагностика імунodefіцитних станів і виявлення хромосомних порушень трансплантологія (розділення клітин крові та лімфоїдних клітин, відмінних за антигенними властивостями) [5]. Велика перспектива застосування лектинів у очищенні крові від вірусів, патологічно змінених глікопротеїнів у цілеспрямованій доставці ліків до нормальних або патологічно змінених клітин і тканин організму або до інфекційних агентів.

Використання методів лектинової гістохімії дозволяє специфічно виявляти певні типи клітин в тканинних зрізах, непомітні за допомогою стандартного гістохімічного забарвлення [6]. Аналізуючи динаміку експресії рецепторів до лектинів на мембранах клітин, можна судити не тільки про морфологію клітин, але і про рівень їхньої функціональної активності, здібності до міграції, фагоцитозу, початку дистрофічних змін і апоптоза . Виявлення рецепторів до лектинів дозволяє судити про ступінь диференціювання клітин. Специфічна гістотопографія рецепторів до лектинів обумовлює різну локалізацію і різноспрямований розвиток клітин [7].

Процес нормального росту і розвитку плоду, новонародженого, дитини знаходиться в центрі уваги фахівців різних областей, вивчаючих морфогенез, в рамках якого формується чітко детермінована просторова структура, характерна для даного віку. Перебіг проліферації, детермінації, дозрівання та апоптозу клітин здійснюється послідовно під контролем імунної системи. В результаті адгезії, взаємодії, зміщення, міграції клітин формуються тканини і органи. Відхилення від нормального процесу морфогенезу призводить до розвитку вісцеромегалії, яка розглядається як симптомокомплекс при різних спадкових, генетичних та ендокринних хворобах. Основна увага в розвитку вісцеромегалії надається функціонуванню генетичного апарату, а значення дії ендогенних та екзогенних факторів, які впливають на реалізацію

генетичного імпринтингу та ролі імунної системи в розвитку цього стану не вивчено.

З тимусу мігрують імунологічно незрілі лімфоцити, які заселяють периферичні лімфоїдні органи. Змінюється рецепторний репертуар як лімфоцитів – одного із основних факторів морфогенезу, так і клітин мікрооточення лімфоїдних та паренхіматозних органів. Змінюються константи співвідношення між лімфоцитами та клітинами паренхіми внутрішніх органів. Виходячи з концепції «лімфоцит-фактор морфогенезу» зміни співвідношення лімфоцит/клітини мікрооточення є основою гіперпластичних процесів в сполучній тканині, які протікають у внутрішніх органах, але не забезпечують їх якісного функціонального становлення.

Для вірної реалізації генетичної програми, формування цілісності організму та забезпечення контролю над процесами морфогенезу необхідна фіксована кількісно-детермінована наявність лімфоцитів, що являються одним із головних факторів морфогенезу. Їх роль в процесі становлення сполучнотканинного компоненту внутрішніх органів активно вивчається в останні роки.

Основними перевагами методу лектинової гістохімії, в порівнянні з традиційними гістохімічними методиками, є висока чутливість, селективність та інформативність в ідентифікації глікокол'югатів в клітинах і тканинах. Завдяки вибірковості зв'язування лектинів зі структурами різних типів клітин, можна диференціювати окремі субпопуляції морфологічно і імуногістохімічно однорідних клітин [8].

За даними Антонюка В. О. було виявлено, що:

- у насінні активність лектинів зростає в міру їх дозрівання;
- у корі деревних і кущових видів рослин активність лектинів непостійна і зростає під час весняного сокоруху, досягаючи максимуму в момент розпускання бруньок листків, або в деяких рослин в моменти максимального росту суцвіть. У літній період активність лектинів в корі є

найнижчою, а далі зростає до моменту дозрівання насіння, залишаючись на високому, відносно постійному рівні в зимовий період;

– з ростом листків активність лектинів у них знижується, а з початком їх повноцінного функціонування вона зростає, залишаючись на відносно постійному рівні протягом літа і знижується восени;

– різні вегетативні органи рослин можуть містити лектини неоднакової вуглеводної специфічності. Окрім того, один і той же орган рослини може містити декілька лектинів;

– у деяких рослин у різні періоди вегетації екстракти одного і того ж органу можуть проявляти різну вуглеводну специфічність [9].

1.2 Класифікація лектинів

Відомі різні класифікації лектинів, в основі яких лежать різні принципи:

- 1) співвідношення білка і вуглеводів в молекулі лектина;
- 2) біологічна активність;
- 3) походження;
- 4) валентність і число субодиниць;
- 5) специфічність до олігосахаридів [10].

Співвідношення білка і вуглеводів в молекулі лектина

а) не містять вуглеводів білки (агглютинін із зародків пшениці, лектини арахісу, гороху, а також отримані генно-інженерним шляхом з кишкової палички).

б) Глікопротеїни (переважна більшість лектинів, очищених з еукаріотів). Зазвичай вміст вуглеводів становить до 15 % за вагою.

в) Протеоглікани (лектин бульб картоплі та інші). Зміст вуглеводів перевищує 50-60 % за вагою [11].

Лектини мають певну біологічну активність. Вони можуть виступати як:

- гемаглютиніни;
- лейкоагглютиніни;
- міогени;
- бласттрансформанти;
- фузогени;
- токсини;
- статеві аглютиніни;
- адгезини;
- лектини-ферменти (біфункціональні, ферменти вуглеводного обміну;
- з незалежним розташуванням каталітичних і лектинового ділянок

зв'язування вуглеводів) і т.д. [11, 12].

Походження

- а) з рослин, тварин, мікроорганізмів;
- б) з органів, тканин, клітин;
- в) внутрішньо- і позаклітинні;
- г) пов'язані і не пов'язані з мембранами клітин [12, 13].

Валентність і число субодиниць

Практично всі лектини відносяться до олігомерних білків (найчастіше до тетрамера, рідше - до димеру). Більшість лектинів є полівалентними, за винятком рослинних і бактеріальних токсинів.

Ці класифікації є умовними, оскільки не враховують тонкої специфічності лектинів (здатності крім моносахаридів розрізняти деякі олігосахаридні структури), а також не дозволяє класифікувати лектини, які дізналися виключно олігосахаридні структури [11, 14].

Специфічність до олігосахаридів

Найбільш відома класифікація лектинів по специфічності до олігосахаридів. Лектини діляться по здатності інгібуватися моносахаридами (ізолектини) і олігосахариди (ендолектини). У свою чергу, ізолектини підрозділяються далі на облігатні (інгібуються тільки моносахаридами) і факультативні (інгібуються також і олігосахаридами). Ендолектини підрозділяються на гомотипічні (інгібуються олігосахаридами, побудованими з одного типу моносахарида) і гетеротипічні (інгібуються олігосахаридами, побудованими з різних моносахаридних ланок).

Існує також безліч класифікацій, що охоплюють більш приватні випадки.

1.3 Лектини рослин, тварин, грибів та мікроорганізмів

Рослини є найдоступнішим джерелом одержання лектинів, хоча вони знайдені у тварин, мікроорганізмів і вірусів. Теоретично лектини можуть міститись у всіх рослинах і у всіх родинях рослинного світу. Однак є родини, де лектини знайдені у великих кількостях, і родини, де вони не знайдені. Сьогодні виділяють декілька груп еволюційно споріднених лектинів рослин, відокремлених за структурою і функціями. Це лектини бобових, хітинозв'язуючі лектини, які вміщують «гевейнові» домени, рибосомоінактивуючі білки типу 2 та манозоспецифічні лектини однодольних. Лектини бобових обмежені родиною *Leguminosae*, в той час як хітинозв'язуючі лектини та рибосомоінактивуючі білки типу 2 знайдені в декількох таксономічно незв'язаних родинях рослин. Лектини можуть міститись в усіх органах рослинного організму, проте найчастіше лектини одержують із насіння. В дозрілому насінні вміст лектинів знаходиться на постійному рівні, воно добре зберігається, а методи очистки лектинів з насіння сьогодні добре

розроблені. Перші дослідники лектинів вважали, що лектини знаходяться майже виключно в насіннях і відсутні (або містяться в незначній кількості) в інших органах рослин [11]. Дійсно, в насінні рицини, абруса, канавалії мечоподібної, квасолі, гороху активність лектинів у насінні є значно вищою, ніж в інших органах цих рослин. У деяких рослин лектини є головним білком підземних органів, наприклад, у рослин родини ароїдних або у бульбах важливої сільськогосподарської культури тропіків – таро (*Colocasia esculenta*).

Лектин зародків пшениці є доступним і одним з найдешевших лектинів, хоча самі зародки становлять лише 1/20 зернівки пшениці і вміст у зародках заледве сягає 1 %. Це пояснюється головним чином добре розробленою в мукомольному виробництві технологією відокремлення зародків пшениці в промислових масштабах. У деяких рослин спостерігається значно вища активність лектинів в інших органах. У насінні активність лектинів зростає в міру їх дозрівання; у корі деревних і кущових видів рослин активність лектинів не постійна і зростає під час весняного сокоруху, досягаючи максимуму в момент розпускання бруньок листків або в деяких рослин в моменти максимального росту суцвіть; з ростом листків активність лектинів у них знижується, а з початком їхнього повноцінного функціонування вона зростає, залишаючись на відносно постійному рівні протягом літа і знижується восени; Окрім того, один і той же орган рослини може містити декілька лектинів або ізолектинів різної вуглеводної специфічності [12].

Лектини справжніх грибів

Справжні гриби хоча часто і містять лектини у значній кількості, рідко служать джерелом їхнього одержання. Головною причиною є непостійність сировинної бази та складність їхньої переробки. Лише окремі з них, які легко піддаються промислового вирощуванню, служать джерелом одержання лектинів. Наприклад, лектини одержують з плодових тіл печериці та алеврії – грибів, які можна легко вирощувати. Останній гриб легко сушити, причому

активність лектинів після сушки не знижується. Водночас гриби, які мають масивні плодові тіла, при висушуванні можуть втрачати значну кількість лектинів [13].

Лектини тваринних організмів

Поряд з рослинами лектини знайдені і у тваринному матеріалі. Прикладами таких лектинів є лектини морських безхребетних, ікри риби, отрути змій. Деякі з них є доволі доступними, випускаються світовими фірмами і є добре дослідженими. Їх концентрація у відповідних органах тіла тварин часто є доволі високою. Лектини також містяться у багатьох органах ссавців (в т.ч. і людини), як правило, у клітинах імунних органів або клітинах імунного генезу. Через необхідність сепарації таких клітин та їх незначну кількість одержання таких лектинів часто становить значні труднощі. У зв'язку з їх важливою фізіологічною роллю лектини ссавців представляють значний науковий інтерес і сьогодні інтенсивно вивчаються. Наприклад, «асіалоглікопротеїновий рецептор» – мембранний білковий комплекс клітин Купфера, що специфічно розпізнає термінальні β -галактозильні залишки, відіграє дуже важливу роль у процесах специфічної елімінації патологічно змінених клітин (зокрема, пухлинних) та циркулюючих глікопротеїнів у ссавців. Одним з найвідоміших і найдоступніших тваринних лектинів є лектин виноградного равлика (*Helix pomatia* L.). Цей високоспецифічний до A1 -групоспецифічної речовини крові людини та N-ацетил-D-галактозаміну лектин міститься у високій концентрації у статевій залозі равлика, але його кількість змінюється в різні періоди його життя. Кількість лектину є максимальною весною до відкладання яєць і мінімальною восени. У більш високоорганізованих тварин – слизнів лектини містяться як у внутрішніх органах (печінці), так і у шкірі. Однак нічого невідомо про фізіологічну функцію лектинів шкіри та можливі зміни в активності лектину у різні періоди життя слизнів. Багатим джерелом лектинів є ікра прісноводних і морських риби. Серед них зустрічаються лектини з рідкісною специфічністю. Наприклад, з ікри річкового окуня (*Perca fluviatilis* L.) та судака (*Lucioperca*

lucioperca) можна одержати лектини з рідкісною специфічністю до L-фукози. Дуже цікавим фактом є те, що у двох екологічних підвидів окуня – трав'яного і глибинного ікра відрізняється ізолектиновим складом. У трав'яного окуня у складі ікри є ізоформи лектину, які реагують з целобіозою та з целюлозою з високою афінністю. Лектини ікри риб за фізико-хімічними властивостями не відрізняються від більшості відомих лектинів. Як правило, вони достатньо стійкі до змін рН (4-10) і нагрівання до +60°C, а іноді і вище. Лектини містяться в отруті змій часто у високій концентрації. Вони відносяться до так званих С-типу лектинів і чинять геморагічний ефект. Значна кількість С-типу лектинів з отрути змій відзначається впливом на фактори коагуляції або на тромбоцити. Діючи на тромбоцити, вони їх пригнічують або активізують, зв'язуючись із специфічними тромбоцитарними рецепторами GPIb, $\alpha 2\beta 1$, і GPVI. Були спроби використання лектинів С-типу з отрути змій в якості антитромботичних речовин, так як здатні блокувати взаємодію між фактором Віллебранда і тромбоцитами. Однак, коли есхіцетин (С-типу лектин) з отрути піщаної ефи (*Echis carinatus*) чи інші подібні лектини отрути змій вводились лабораторним тваринам для вивчення їх ефекту *in vivo*, часто спостерігалась значна тромбоцитопенія. Це явище залишилось нез'ясованим [14].

1.4 Початок вивчення лектинів

Лектини містять як мінімум дві ділянки, які реагують з вільними моно- і олігосахаридами, а також із залишками сахарів у складі полісахаридів, глікопротеїнів, гліколіпідів. У найпростішій формі взаємодія лектинів з вуглеводами проявляється у вигляді реакції аглютинації часток і клітин, наприклад еритроцитів або преципітації полісахаридів і глікопротеїнів.

Відкриттю лектинів сприяла проблема токсичності рицинової олії (*Oleum Ricini*), що не давала спокою багатьом фармакологам і токсикологам кінця XIX ст. Початок вивчення лектинів був покладений роботами П. Г. Штильмарка, який встановив, що отруйна речовина насіння рицини – лектин рицин викликає аглютинацію та гемоліз еритроцитів. Саме цю подію в історії науки вважають днем зародження нової галузі – лектинології [15].

Сучасний розвиток вчення про лектини

Сучасний етап розвитку вчення про лектини почався після 1945 р., коли У. Бойд виявив аглютиніни, специфічні до груп крові. У нашій країні значний внесок у дослідження лектинів внесли українські вчені М. Д. Луцик та Є. М. Панасюк. Тепер центр дослідження лектинів знаходиться в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України. Дослідження лектинів пов'язані з отриманням чистих препаратів і встановленням їх вуглеводної специфічності. До 1965 р. було відомо лише три кристалічні лектини (фітогемаглютинін, конканавалін А і рицин). Тепер кількість їх перевищує 100 [16].

Нова структура лектинів

Небілковими компонентами лектинів є вуглеводи та іони двовалентних металів Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} та ін. Для більшості лектинів іони металів обумовлюють специфічність взаємодії з вуглеводами. Видалення металів з молекули призводить до зниження або навіть втрати їх біологічної активності. Разом з тим для деяких лектинів метали не є обов'язковими компонентами, наприклад аглютиніни зародків пшениці, лектини тварин.

Кількість вуглеводів у різних лектинах коливається в широких межах – від 3 до 80 %, але в типових випадках становить 3–10 %.

Серед моносахаридів, які утворюють основний ланцюг, як правило присутні N-ацетилглюкозаміні маноза. Вуглеводний компонент не завжди має значення для біологічної активності лектинів.

З відомих лектинів конканавалін А і лектин гороху взагалі не містять сахарів.

Амінокислотний склад лектинів еволюційно віддалених організмів істотно розрізняється, тому говорити про єдиний характерний тип будови первинної структури неправомірно.

Молекули відомих лектинів, за винятком незначної кількості, побудовані з декількох поліпептидних ланцюгів, або субодиниць, тобто мають четвертинну структуру. Субодиниці можуть бути однаковими або різними. Серед рослинних лектинів спостерігаються ди- та тетрамірні форми. Лектини тварин частіш за все є полімерами вищого порядку. Поліпептидні ланцюги в молекулах лектинів можуть з'єднуватись як нековалентними зв'язками (гідрофобні, водневі і сольові), так і дисульфідними. Різноманітні варіанти комбінації поліпептидних ланцюгів у молекулах зумовлюють існування ізоформ лектинів. Специфічність ізоформ до вуглеводів може бути різною.

Одна з перших класифікацій лектинів, яка збереглася до теперішнього часу, була запропонована О. Мьокелом.

Згідно з нею специфічність взаємодії лектинів з вуглеводами визначається положенням гідроксилу при C3 і C4 та D- чи L-формами сахару. Виходячи з цього всі лектини розділяють на чотири групи, специфічні до таких сахарів:

- 1) 3,4-ОН цис, L-форма (L-фукоза, L-галактоза);
- 2) 3,4-ОН цис, D-форма (D-галактоза);
- 3) 3,4-ОН транс, D-форма (D-глюкоза, D-маноза);
- 4) 3,4-ОН транс, L-форма (L-глюкоза, L-гулоза).

Лектини, які взаємодіють з вуглеводами четвертої групи, невідомі.

Інша класифікація включає 9 груп лектинів за їх специфічним ставленням до таких моносахаридів як L-фукоза, D-галактоза, D-глюкоза, D-маноза, N-ацетил-D-глюкозамін, N-ацетил-D-галактозамін, N-ацетил-D-галактозамін разом з галактозою, N-ацетил-D-глюкозамін разом

Поширення лектинів

Лектини характерні для організмів будь-якого рівня організації – від вірусів та бактерій до ссавців. Перші очищені лектини мікроорганізмів були одержані в кінці 70-х рр. – токсини бактерій *Pseudomonas aeruginosa* і грибів *Streptomyces sp.* Докладно вивчено структуру аглютиніну вірусу грипу. Лектини виявлені у лишайниках. Відомості про лектини папоротей і соснових відсутні. Найбільша кількість лектинів знайдена в квіткових рослинах, серед яких досліджено декілька тисяч видів. Лектини виявлені в багатьох представників безхребетних і хребетних тварин. Лектиноподібні білки знайдені на поверхні тромбоцитів, у тканинах печінки, легенів, серця, плаценти, селезінки людини.

Наявність лектинів у живих об'єктах різних еволюційних рівнів свідчить про їх важливе біологічне значення, але універсальна функція цих білків до кінця ще не розкрита [18].

1.5 Роль лектинів

Найаргументованішими є положення про роль лектинів:

- 1) як факторів «впізнавання» молекул і клітин у процесах міжклітинних взаємодій;
- 2) у видаленні ушкоджених глікопротеїнів і клітин з кровообігу у ссавців;
- 3) у агрегації клітин у нижчих рослин і тварин.

Безперечно, цікава гіпотеза про участь лектинів у транспортуванні, накопиченні та іммобілізації вуглеводів.

У рослин захисна функція лектинів проявляється в запобіганні поїданню їх тваринами, а також у пригніченні росту інфекційних бактерій і грибів.

Дослідження показують, що, можливо, лектини забезпечують специфічність взаємодії пилку і маточки при заплідненні рослин. Припускають, що лектини насіння рослин завдяки своїй мітогенній дії стимулюють ріст і розвиток зародків [19].

1.6 Виділення та екстракція лектинів

Екстракцію лектинів з сировини звичайно проводять 0,9 % розчином натрію хлориду. Якщо сировина містить значну кількість ліпідів, її попередньо знежирюють петролейним ефіром. Екстракт просвітлюють ультра-центрифугуванням. Концентрують лектини осадженням їх з екстракту солями (амонію сульфат) або органічними розчинниками (ацетон, етанол). Отриманий концентрат лектину далі очищають шляхом афінної техніки або іншими методами. Іонообмінну хроматографію, гельфільтрацію і електрофорез використовують для остаточного очищення лектинів, а також для розподілу суміші ізоформ.

Найраціональнішим способом отримання чистих лектинів є афінна хроматографія. Суть методу полягає у зворотній взаємодії лектинів із залишками вуглеводів, які входять до складу сорбентів. Використовують сорбенти природні – сефадекс (на основі декстранів), сефарозу (на основі агарози), хітин, а також штучні. Десорбцію лектинів проводять розчином специфічного вуглеводу, який блокує активність лектину або зниженням рН до 3,0, що веде до дисоціації комплексу лектин – ліганд.

Дослідження лектинів базується на специфічності їх взаємодії з вуглеводами. Для виявлення лектинів використовують реакцію гемаглютинації у різних варіантах і модифікаціях. Результати її реєструються суб'єктивно (візуально) або об'єктивно (спектрофотометрично). Принцип полягає у тому, що до серії послідовних розведень лектину додають

суспензію еритроцитів і після інкубації відзначають аглютинацію. Титр лектину виражають найбільшим розведенням розчину, який дає аглютинацію. Для підвищення чутливості реакції еритроцити можуть бути оброблені протеолітичними ферментами.

Крім реакції аглютинації, для виявлення лектинів використовують реакцію преципітації з глікопротеїдами і полісахаридами, але вона більш вибіркова і придатна для визначення вуглеводної специфічності лектинів. Взагалі вуглеводна спорідненість лектинів виявляється методом пригнічення активності лектину відповідним сахаром. Як тест-систему використовують реакцію преципітації або гемаглютинації. Негативний ефект цих реакцій свідчить про взаємодію лектину з певним вуглеводом. Кількісну характеристику вуглеводної специфічності дає мінімальна концентрація вуглеводу, яка пригнічує активність лектину [20].

Використання лектинів

Специфічність взаємодії лектинів з вуглеводами лежить в основі їх практичного використання як реагентів:

- 1) удослідженні структури та функції клітинних мембран як у нормальних, так і в патологічних умовах (наприклад, злоякісно трансформовані клітини);
- 2) при дослідженні впливу взаємодії лектину з мембраною клітини на клітинний метаболізм, включаючи мітогенну та антимітогенну дію лектинів на Т- і В-лімфоцити;
- 3) для швидкого визначення груп крові; для очищення глікопротеїнів у рамках афінної хроматографії на іммобілізованих лектинах;
- 4) для ідентифікації бактерій і вірусів.

Крім того, лектини знайшли застосування в судово-медичній експертизі для ідентифікації об'єктів і речових доказів.

Встановлено протипухлинну активність деяких токсичних лектинів, здатних блокувати синтез білка, в першу чергу в пухлинних клітинах, які чутливіші до їхньої дії, ніж нормальні. До таких лектинів належать рицин,

абрин, токсин дифтерії, лектин білої поганки, омели та ін. Деякі лектини, наприклад конканавалін А, виявляють імуносупресивну дію, яка знайшла використання при трансплантації органів. Як хіміотерапевтичний препарат запропоновано лектин з гемолімфи жука *Allomyria dichotoma*. Він справляє мітогенну дію на Т-лімфоцити, стимулює продукування інтерлейкіну-2, активізує природні кілери.

Використання лектинів для діагностики на живих об'єктах, а також як лікарські засоби обмежується їхньою високою токсичністю, кумуляцією в організмі, невеликою терапевтичною широтою, а також складністю визначення концентрації цих речовин у крові.

В наш час відбувається відновлення наукового інтересу до лектинів у зв'язку з дослідженням всіх вуглеводів які є в організмі, що дозволить розв'язати багато проблем різного науково напрямку, таких як: глікомікронабіопроекти; будова і функціонування біосенсорів; структура лектинів пробіотичних організмів; лектини, як новий клас деструкторів біоплівки патогенів; фізіологічно активні харчові лектини. В Україні лектинологія є пріоритетний науковим напрямком в роботі Запорізької школи морфологів, яку очолює Заслужений діяч науки та техніки, професор М. А. Волошин. Лектингістохімічний метод широко застосовують в професійній діяльності науковці під керівництвом професорів Луцика О. Д., Шепітько В. І., Шаповалової, О. Ю. Черкасова В. Г. В глікоімунології актуальною проблемою є вивчення механізмів конститутивного або вродженого імунітету і набутого або адаптивного імунітету. Детекція, контроль, захист і корекція взаємовідношень між гліканзв'язуючими білками, полісахаридами і глікокон'югантами відбувається при всіх біологічних процесах, таких як: запліднення, розвиток, міграція клітин, апоптоз та інше, тобто забезпечується цілісне існування багатоклітинного організму. Кожна наука, в тому числі і лектинологія починається з класифікації і номенклатури. В наш час відкривається і описується все більш нових лектинів, про що свідчать роботи вчених Львівської школи морфологів [15,

16]. В той же час лектинова характеристика визначає різні функції одного і того ж лектина або системи лектинів із одного і того ж джерела або однакові функції лектинів різного походження. Проте дослідження структурно-функціональних ознак подібностей і відмінностей лектинів поки ще не дозволяє створити чітку і ясну їх класифікацію. Зазвичай, найбільш не складною є класифікація лектинів за походженням. В залежності від джерела отримання розрізняють: вірусолектини, бактолектини, міколектини, фітолектини та зоолектини [17, 21].

1.7 Синдром гіперстимуляції яєчників

Синдром гіперстимуляції яєчників – надмірна системна реакція на стимуляцію яєчників, що розвивається в результаті активації продукції вазоактивних медіаторів.

За даними інших авторів частота СГЯ варіює від 0,5 % до 33 % [14].

Найважчі форми ускладнення виникають на фоні вагітності. При цьому можливі летальні випадки від тромбоемболії, гострої ниркової недостатності, респіраторного дистрес-синдрому та інших причин [15, 16].

Діагноз СГЯ встановлюють на підставі клінічних даних. Типові симптоми представлені здуттям живота і дискомфортом, які виникають після ін'єкції тригера овуляції [17]. В анамнезі у пацієток може спостерігатися надмірна реакція яєчників на стимуляцію, однак відсутність такої історії не виключає діагноз СГЯ. Час виникнення симптомів після ін'єкції тригера ділить пацієток на дві групи: ранній і пізній СГЯ. «Ранній» СГЯ зазвичай виникає протягом 7 днів після ін'єкції ХГЧ і пов'язаний з надмірною відповіддю яєчників. «Пізній» СГЯ виникає на 10-й день або пізніше після ін'єкції ХГЧ і, як правило, є результатом дії ендогенного ХГЧ [18, 19].

Історія попередніх стимуляцій у таких пацієнток може бути нічим не примітною. Пізній СГЯ має тенденцію до більш тривалого і важкого протікання, ніж рання форма [20, 21].

За біохімічними показниками крові спостерігається: порушення електролітного балансу, включаючи гіперкаліємію і гіпонатріємію, що призводить до зниження осмолярності плазми. Гіпопротеїнемія, гіпоальбумінемія, високий рівень С-реактивного білка, підвищення рівня печінкових трансаміназ, або лужної фосфатази, у частини хворих – збільшення креатиніну і сечовини [22].

Клінічний аналіз крові:

гемоконцентрація: гематокрит $> 45\%$, гемоглобін > 14 г/л, тромбоцитоз до 500×10^9 /л – 600×10^9 /л вказують на розвиток СГЯ важкого ступеня. Гематокрит $> 55\%$ свідчить про потенційну загрозу для життя! Лейкоцитоз відображає вираженість системної запальної реакції і гемоконцентрації: в деяких випадках досягає 50×10^9 /л без зсуву вліво [23, 24]. Зсув лейкоцитарної формули вліво демонструє наростання запальної реакції, яка може бути обумовлена загостренням хронічних захворювань (наприклад пієлонефриту), активацією умовно-патогенної флори з розвитком пневмонії або приєднанням ускладнень, що вимагають хірургічного втручання (перекрут придатків матки, гострий апендицит, пельвіоперитоніт, перитоніт) [25, 26].

1.8 Класифікація СГЯ

Класифікація СГЯ була запропонована Rabau E. в 1967 році. Він виділяв три клінічних категорії СГЯ (легкий, середньої тяжкості, важкий) і шість ступенів тяжкості, виділених на підставі клінічних та лабораторних ознак (табл. 1. 1).

Таблиця 1.1 – Класифікація СГЯ

Легкий СГЯ	здуття живота; слабо виражена біль в животі; збільшення яєчників до < 8 см
СГЯ середньої тяжкості	помірно виражена біль в животі; нудота +/- блювота; збільшення яєчників до 8-12 см; наявність ознак асцити за даними УЗД
СГЯ важкого ступеня	клінічно виражений асцит (в ряді випадків плевральний випіт); гемоконцентрація (гематокрит > 45 %); гіпопротеїнемія; збільшення яєчників > 12 см
Критичний СГЯ	напружений асцит або масивний плевральний випіт; гемоконцентрація (гематокрит > 55 %); лейкоцитоз > 25000; олігурія / анурія; тромбоемболічні ускладнення; гострий респіраторний дистрес-синдром

СГЯ зазвичай розвивається приблизно через 20 днів (в період від 5 до 45 днів) після індукції овуляції. Виділяють ранній початок синдрому – через 3-5 днів призначення овуляторних доз ХГЧ, і пізніше початок СГЯ. Останнє буває обумовлено наростанням ХГЧ в умовах вагітності і клінічно є більш важкою формою.

Таблиця 1.2 – Критерії тяжкості СГЯ.

Важкий СГЯ	Життєзагрожуючий СГЯ
Збільшення розміру яєчників; Асцит, гідроторакс, анасарка; Гематокрит > 45 %; Лейкоцитоз > 15 000; Олігурія; Креатинін до 1,6 мг / дл; Швидкість клубочкової фільтрації > 50 мл / хв; дисфункція печінки.	Збільшення розміру яєчників; Напружений асцит, гідроторакс, анасарка; Гематокрит > 55 %; Лейкоцитоз > 25 000; Креатинін > 1,6 мг / мл; Швидкість клубочкової фільтрації < 50 мл / хв; тромбоемболічні ускладнення; Гострий респіраторний дистрес-синдром.

Критеріями тяжкості СГЯ є порушення функції печінки, гемоконцентрація, лейкоцитоз, ниркова недостатність. Виділяють також життєзагрожуючий або критичний СГЯ, який включає в себе збільшення розміру яєчників, розвиток гострого респіраторного дистрес-синдрому, напруженого асциту, гідроторакс, тяжку ниркову недостатність і тромбоемболічні ускладнення (табл. 1. 2).

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти і матеріали дослідження

Дослідження проведено на базі лабораторії клітинних популяцій Запорізького національного університету. Гістологічні дослідження виконані спільно з науково-дослідною лабораторією кафедри анатомії Запорізького державного медичного університету. Дослідження периферичної крові обстежених жінок з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників виконувалось за договором з клініко-діагностичною лабораторією комунальної установи «Обласний медичний центр репродукції людини» Запорізької міської ради.

Матеріалом дослідження були: у першому випадку зразки органів – яєчники та селезінка щурів молодого віку (6 місяців) лінії Вістар, які утримувались у віварії біологічного факультету ЗНУ; у другій частині дослідження – венозна гепаринізована кров 41 особи жіночої статі середнього віку (23-35 років), які отримували високі дози гонадотропних препаратів за коротким протоколом для отримання значної кількості ооцитів. Обстежені були розподілені на 2 групи. Першу групу склали 25 жінок, у яких після гормональної терапії був відсутній ризик розвитку СГЯ (група контролю). Другу групу склали 16 осіб з ризиком СГЯ.

Для отримання моделі синдрому гіпестимуляції яєчників самкам щурів молодого віку вводили різні дози фолікулостимулюючого гормону.

У експерименті було використано 4 групи щурів статевозрілого віку лінії Wistar. Група I (контрольна група) – вводилось 10 мкл фізіологічного розчину; група II (1 дослідна група) – вводилось 10 мкл (0,75 МО) фолікулостимулюючого гормону (Гонал-Ф); група III (2 дослідна група) – вводилось 15 мкл (1,25 МО) фолікулостимулюючого гормону (Гонал-Ф); група IV (3 дослідна група) – вводилось 130 мкл (10 МО) фолікулостимулюючого гормону (Гонал-Ф).

На 5 день експерименту кожній групі щурів ввели: група I (контрольна група) – 10 мкл фізіологічного розчину; група II (1 дослідна група) – 2 МО ХГЛ (Прегніл); група III (2 дослідна група) – 4 МО ХГЛ (Прегніл); група IV (3 дослідна група) – 30 МО ХГЛ (Прегніл).

Через 48 годин проводили облік результатів апробованої моделі щодо прояву ознак СГЯ. Для дослідження відбирали зразки органів: яєчники та селезінку.

Визначення морфометричних характеристик гістологічних препаратів проводили за Автандиловим [60].

Для проведення гістохімічних досліджень рецепторного апарату лімфоцитів у яєчниках та селезінці використовували таку панель лектинів:

1) для визначення вмісту Т-лімфоцитів $CD3^+$ – моноклональні антитіла LT3 («Сорбент Лтд.», Москва, РФ), обрахування результатів яких основане на використанні пероксидази хрону;

2) для визначення вмісту Т-хелперів/індукторів $CD4^+$ – моноклональні антитіла LT4 («Сорбент Лтд.», Москва, РФ), обрахування результатів яких основане на використанні пероксидази хрону;

3) для визначення вмісту Т-кілерів/ефекторів $CD8^+$ – лектин віки посівної (*VSA*– *Vicia sativa*);

4) для проведення цитохімічних досліджень щодо виявлення активаційних рецепторів лімфоцитів за допомогою лектину арахісу (*PNA* – *Peanut agglutinin*).

У зразках периферичної крові (41 обстежених осіб) визначали загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові обстежених. Для цитохімічних досліджень у обох групах обстежених фарбували по 10 мікропрепаратів.

При виконанні другої частини експерименту дотримувались такої схеми: із зразка крові виділяли на градієнті щільності фікол-верографін лімфоконцентрат, готували суспензію з концентрацією клітин 2 млн/мл. З отриманої суспензії мононуклеарів готували «лімфоцитарні відбитки»

(предметні скельця з лунками з Parafilm M) для проведення цитохімічних досліджень щодо виявлення активаційних рецепторів лімфоцитів за допомогою лектину арахісу (*PNA – Peanut agglutinin*). Також у дослідженні використовували:

1) для визначення вмісту Т-лімфоцитів $CD3^+$ -лектин лімської квасолі (*PLA– Phaseolus lunatus (lima) Lectin*) + лектин віки посівної (*VSA– Viciasativa*);

2) для визначення вмісту Т-хелперів/індукторів $CD4^+$ - лектин лімської квасолі (*PLA– Phaseolus lunatus (lima) Lectin*);

3) для визначення вмісту Т-кілерів/ефекторів $CD8^+$ - лектин віки посівної (*VSA– Viciasativa*).

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Визначення кількості лейкоцитів за П'ятницьким

У лунці планшета для серологічних досліджень дозованою варіпіпеткою відміряють 0,38 мл 3 % розчину оцтової кислоти. Узятую для дослідження кров видувають з капіляра на чисті знежирені скельця і відміряють дозованою мікропіпеткою 0,02 мл (20 мкл) крові, яку вносять в лунку з 0,38 мл 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 є скляною пластинкою, 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 формених елементів крові на камеру обережно кладуть знежирене покривне скло і притирають його до країв камери шляхом

притиснення великими пальцями обох рук і легкими зсувами покривного скла вгору і вниз. Доказом щільності прилягання покривного скла є поява веселкових ліній, так званих кілець Ньютона, по притертим його краям. Оскільки покривне скло накладають на бічні пластинки рахункової камери, цим створюється поглиблення, яке закрито з двох сторін (притертих) і відкрите з двох зовнішніх сторін у вигляді щілин. Через ці щілини рахункова камера заповнюється суспензією лейкоцитів. Для заповнення камери суспензією 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 [27, 28].

Після того, як рахункова камера заповниться суспензією клітин, приступають до підрахунку лейкоцитів. Для цього 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 16 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 $0,0025 \text{ мм}^2$; глибина рахункової камери рівна 0,1 мм, тому об'єм малого квадрата рівний $0,00025 \text{ мм}^3$. Великий квадрат сітки Горяєва складається з 16 малих квадратів, отже має $S=0,04 \text{ мм}^2$, а $V=0,004 \text{ мм}^3$ [28].

Лейкоцити підраховують у 100 великих порожніх квадратах (20x5), площа яких дорівнює 4 мм^2 (площа одного великого квадрата дорівнює $0,04 \text{ мм}^2$). Кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих порожніх квадратах, ділять на 4 і перемножують на 200, одержують кількість лейкоцитів в 1 мм^3 крові. Ділять на 4 із розрахунку загальної площі 100 великих порожніх квадратів, рівної 4 мм^2 . Перемножують з розрахунку, що ступінь розведення крові дорівнює 20 (0,38 мл 13 % розчину оцтової кислоти і 0,02 мл 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: $200:4=50$).

$$\text{Кількість лейкоцитів (тис/мм}^3\text{)} = \frac{n \times 20}{0,04 \times 100 \times 0,1} = n \times 50, \quad (2.1)$$

де n – кількість лейкоцитів, підрахована у 100 великих квадратах камери Горяєва;

20 – розведення;

0,04 – площа одного великого квадрата (мм^2);

0,1 – глибина камери.

Для того, щоб повторно не підраховувати 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 [29-31].

2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові

Одночасно з підрахунком кількості лейкоцитів з того ж зразка крові готували мазки для вивчення лейкоцитарної формули. Для цього на предметне скло наносили 10-20 мкл крові та за допомогою шліфувального скла, встановленого під кутом $40-45^\circ$ робили мазок стандартним для гематологічних досліджень методом. Після висушування, фіксування протягом 5 хвилин в метанолі та фарбування мазків за Паппенгеймом .

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 і лейкоцитарного лічильника. Після закінчення перегляду 200 лейкоцитів, визначають відсотковий вміст кожного з видів лейкоцитів за формулою:

$$\text{Відносна кількість лейкоцитів} = \frac{\text{кільк. лімфоцитів (шт} \times 100\%)}{200} \quad (2.2)$$

Окрім процентного вмісту лейкоцитів велике значення має абсолютна кількість окремих видів лейкоцитів. Вона визначається з урахуванням загальної кількості лейкоцитів. Абсолютна кількість будь-якого виду лейкоцитів характеризує їх реальну участь в імунних реакціях. Таким чином, при характеристиці імунного статусу дуже важливо аналізувати не тільки відносний вміст лейкоцитів, але й їх абсолютне співвідношення, так як процентний вміст лімфоцитів може бути нормальним або навіть підвищеним. Проте у випадку лейкопенії (знижений вміст лейкоцитів) у організмі має місце дефіцит абсолютної кількості лімфоцитів. Обчислення абсолютного

вмісту кожного виду лейкоцитів здійснюється після з'ясування процентного складу білої крові та загального числа лейкоцитів за такою формулою:

$$\text{Абсолютна кільк. лейкоцитів (Г/л)} = \frac{\text{кільк. лейкоцитів} \times \% \text{ лімфоцитів}}{100 \%} \quad (2.3)$$

Відносну і абсолютну кількість лейкоцитів враховують у клінічній практиці [27, 32].

2.2.3 Виділення лімфоцентрату

Лімфоцентрат виділяли з цільної крові на градієнті щільності фікол – верографіні (1,078 г/мл), розробленому А. Беюмом. Цю кров розводили в співвідношенні 1: 3 розчином Хенкса без іонів кальцію і магнію. Розведену кров обережно нашаровували на 3 мл розчину фікол-верографінового градієнта з щільністю 1,078 г/мл, добиваючись, щоб межа розділу фаз кров/градієнт була не порушена. Відношення розведеної крові і розчину фікол-верографіну дорівнювала 3:1. Врівноважені пробірки центрифугували в горизонтальному роторі протягом 35-40 хвилин при прискоренні 400 g (1500 об/хв).

Після цього вилучали 2/3 (по висоті над фазою) рідини, а залишену 1/3 збирали разом з кільцем мононуклеарних клітин в інтерфазі. Зібрану суспензію переносили в силіковані центрифужні пробірки, додавали надлишок (6-8 мл) ФСБ і проводили два послідовних центрифугування (10 хв., 1500 об/хв) із зміною відмиваючого розчину. Після другого центрифугування супернатант відкидали, а осад клітин ресуспендували в 1 мл середовища 199 і підраховували кількість мононуклеарів. Суспензію

розводили культуральною сумішшю (середовище 199, 20 % ембріональної телячої сироватки) до концентрації клітин 2 млн/мл [27, 34].

2.2.4 Визначення розмірів гістологічних зрізів за Автанділовим

Гістологічний препарат, забарвлений гематоксилином і еозином, поміщається на предметний столик, після чого проводиться дослідження. Знаходиться острівець в поле зору і переміщенням предметного столика, розміщується в центрі кіл, що дозволяє провести напівкількісну оцінку його діаметра.

Якщо острівець не виступає за кордон внутрішньому колу (1), то він має розміри менше 100 мкм (малий острівець), якщо приблизно відповідає діаметру внутрішньому колу або незначно виступає за її межі, не досягаючи межі зовнішнього кола (2), то діаметр цього острівця більше 100 мкм (великий острівець), якщо острівець виходить за межі зовнішнього кола, то можна з упевненістю говорити про його збільшення (гіпертрофії або гіперплазії) [60].

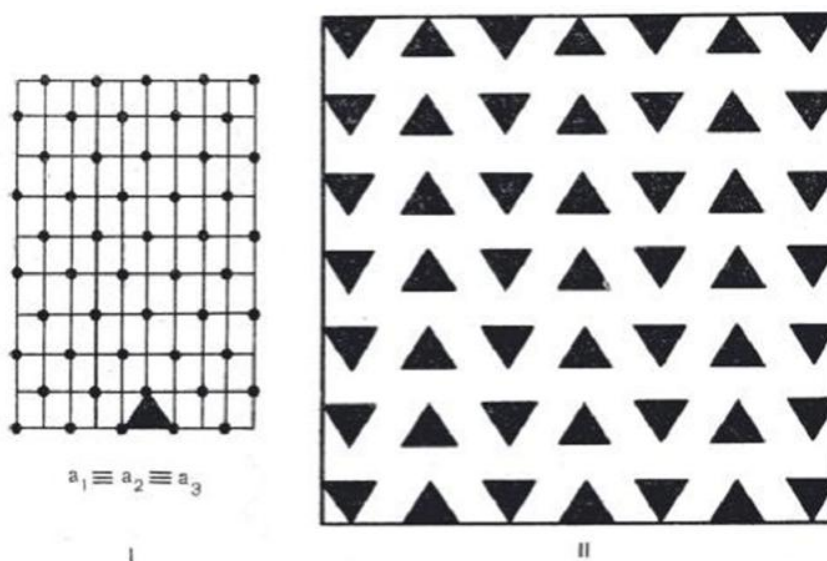


Рисунок 2.1 – Сітки з рівномірно віддаленими один від одного крапками для макро- і мікроскопічного стереометричного аналізу.

2.3 Приготування мікропрепаратів для лектинової цитохімії

Підготовка скла.

1) в предметних скельцях, ті, що вже використовувалися і що стикалися з імерсійним маслом, останнє видаляли толуолом або ксилолом. Потім скельця кип'ятили без мила і соди протягом 15-20 хв, промивали чистою водою і занурювали на 1 год. в насичений розчин двухромовокислого калію в сірчаній кислоті. Оброблені таким чином скельця промивали протягом не менше 1 год під струменем водопровідної води і насухо витирали чистим рушником.

2) при відсутності двухромовокислого калію і сірчаної кислоти скельця, що вже використовувалися, клали у мильний розчин і витримували у ньому 8-10 год, а потім в тому ж розчині кип'ятили їх 5-10 хв. Від більш тривалого кип'ятіння скельця робляться каламутними. Після кип'ятіння скельця виймали і ретельно промивали під струменем водопровідної води, а потім насухо витирали.

3) не використане скло промивали у гарячій воді і насухо витирали. Зберігали скельця в скляній широкогорлій банці з кришкою.

Для приготування предметних скелець із лунками використовували парафінову стрічку та предметні скельця із лунками.

Виготовлення предметних скелець з лунками.

Предметні скельця у яких лунки виготовляли за допомогою парафінової стрічки робили за такою схемою: спочатку брали парафінові стрічки, на яких вирізали по дві однакові лунки за допомогою пробійника однакового діаметру, який становив 5 мм, після чого накладали на предметні скельця стрічки, а з іншої сторони прогрівали скельця за допомогою звичайної праски для фіксації стрічки до них.

Охайно розправляли лунки та використовували їх для досліджень.

Фіксація лунок. Принцип. Обробку лунок фіксували рідинами, що додають форменим елементам стійкості стосовно вмісту у фарбах води, яка без фіксації, змінює будову лейкоцитів. Крім того, фіксація, викликаючи коагуляцію білка, прикріплювала препарат до скла.

Посуд та апаратура. 1). пінцет. 2). спеціальний посуд для фіксації або склянки, обрізані до висоти 6-6,5 см. 3). штатив для сушки лунок на повітрі. 4). предметні скельця.

Реактиви. 96°% етиловий спирт.

Методика. Лунки, складали попарно (стрічками назовні), опускали пінцетом в спеціальний посуд для фіксації або у звичайні скляні стакани, обрізані до 6 – 6,5 см і наповнені до певної висоти фіксуючою рідиною. В останньому випадку для забезпечення вільного дотику сторін з мікропрепаратом з фіксатором зверху, між попарно складеними мазками, прокладали предметні скельця, що спиралися своїми ребрами на верхню частину склянки. У етиловому і денатурованому спирті мазки витримують – не менше 30 хв.

Після закінчення терміну фіксації препарати виймали пінцетом, сушили на повітрі або споліскували в банці з нейтралізованою дистильованою водою і укладали мазками догори на скляний місток для фарбування.

2.4 Постановка лектинцитохімічної реакції на гістологічних мікропрепаратах щурів

Методика проведення реакції.

Депарафінація:

1. Ксилол -15 хв.

2. Спирт-15 хв

3. Метанол + H_2O_2 3 %- 20 хв(135 метанола+15 мл H_2O_2 3 %)
4. Спирт 60 % - 8 хв.
5. Спирт 30 % - 8 хв.
6. Трис буфер(ЗФР)- 2 шт по 30 сек.
7. Експозиція лектином (лектин = ЗФР в розведенні 1: 50,
8. 0,2 мл лектину + 10 мл ЗФР)-1 год – при температурі 37°C .
9. ЗФР – 2 порції по 30 сек
10. 3,3`- діамінобензидин (20 мг бензидину + 2 мл абсолютного спирту + 5 мл дистильованої води + 0,2 мл трис буфер + 5 капель 3 % перекису водню, профільтрувати, та залишити на зрізах до 30 хв. при температурі 37°C .
11. Гематоксилін Маєра - 2 хв.
12. Ам'ячна вода – 3 хв.
13. Спирти – 70, 90, 96 % по 5хв.
14. Ксилол – 3 по 5 хв.
15. Заключення в канадський бальзам.

2.5 Статистична обробка отриманих результатів

Отримані експериментальні дані піддали статичній обробці за допомогою пакету статистичних програм Statistica 6.0. Перевірку розподілу показників вибірок проводили за критерієм Шапіро-Уїлка. Враховуючи, що більшість розподілів медико-біологічних показників, особливо показників у малих вибірках, не є параметричними, для статистичної обробки результатів були використані непараметричні методи варіаційної статистики: медіана, квартилі (25, 75), мінімальне та максимальне значення показників, критерій Манна-Уїтні (показник U) для порівняння двох незалежних вибірок.

Статистична значущість відмінностей оцінювалася при вірогідності справедливості нульової гіпотези менше 5 % ($p \leq 0,05$) [35, 59].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Гістологічні дослідження яєчників та селезінки ссавців при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

Після введення щурам різних доз фолікулостимулюючого гормону були отримані наступні результати (рис. 3.1).

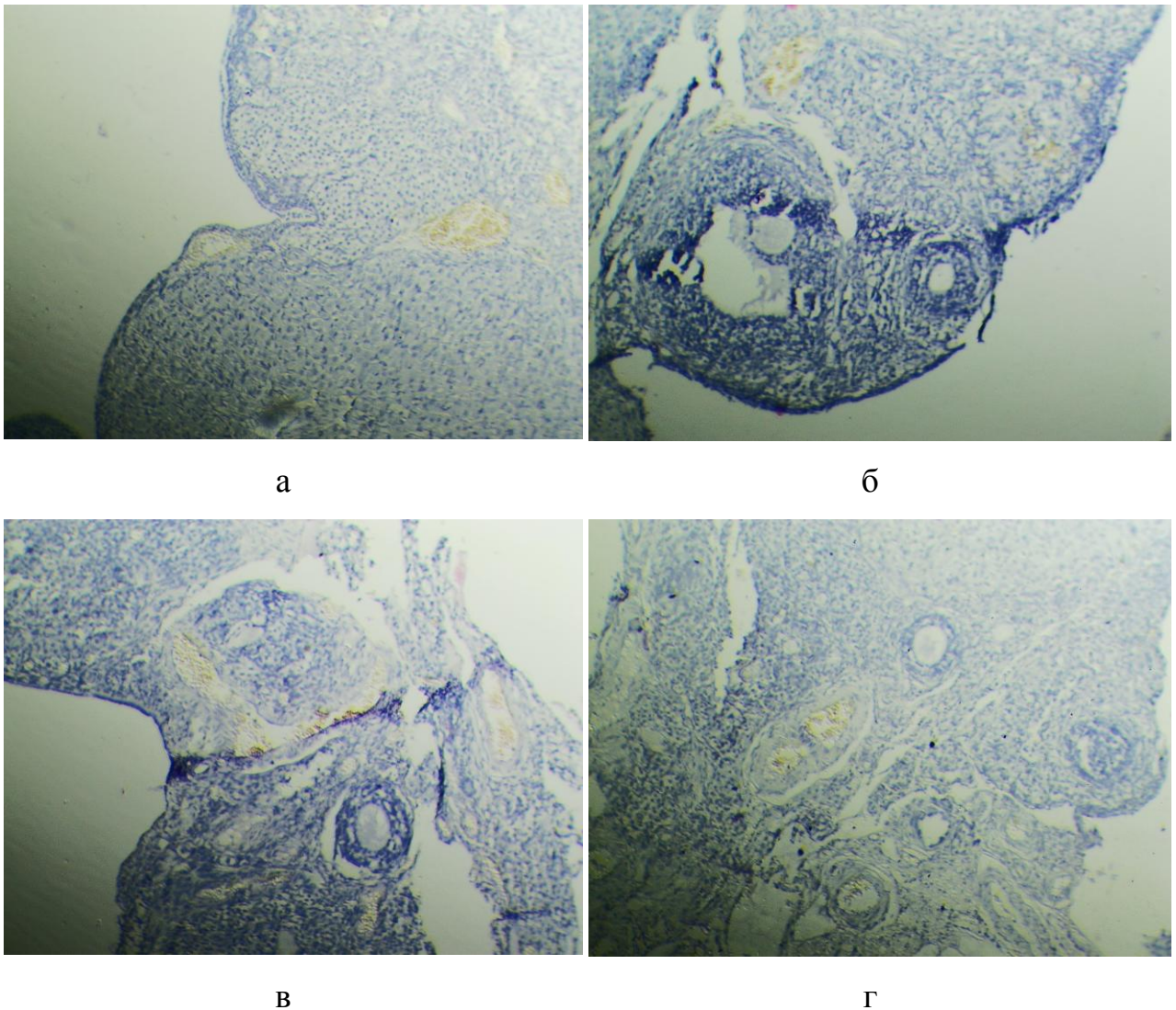


Рисунок 3.1 – Яєчник щура (а – без ризику СГЯ; б – при введенні 10 мкг/мл ФСГ; в – при введенні 15 мкг/мл ФСГ; г – при введенні 130 мкг/мл ФСГ).

При введенні ФСГ порівняно з контролем кількість дозріваючих яйцеклітин збільшилась у 2 рази. Відмінностей між введенням концентрації ФСГ 10 мкг/мл та 15 мкг/мл не виявлено; але при концентрації 130 мкг/мл відбувається значний приріст зріючих яйцеклітин (порівняно з дозуванням у 15 мкг/мл ФСГ їх кількість збільшилась мінімум ще у 2 рази).

3.2 Особливості розподілу глікокон'югатів у селезінці щурів в нормі та після гормонального навантаження

Селезінка – це периферійний орган імунної системи, який є найбільшим колектором лімфоїдної тканини в організмі. Структура функціональних зон селезінки в більшій мірі залежить від функціонального стану імунної та кровотворної систем, які визначають стан гемопоезу, інтенсивність імунної відповіді та індивідуальну реактивність. [61-64].



1 – капсула; 2 – трабекула; 3 – лімфоїдний вузлик білої пульпи;
4 – червона пульпа

Рисунок 3.2 – Гістологічна будова селезінки щура (фарбування гематоксилін-еозином).

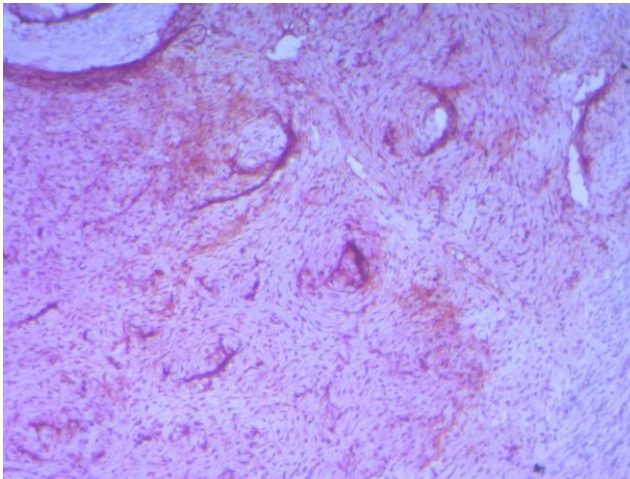
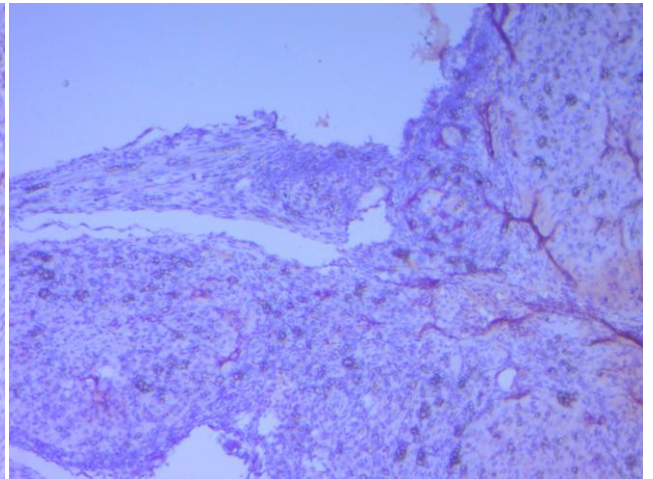
У щурів захисна функція селезінки відіграє вирішальну роль, і видалення її призводить до загибелі тварин. Селезінка дорослих щурів зберігає також функцію еритропоезу протягом всього життя. Тому для визначення токсичного впливу високих доз гонадотропних гормонів селезінка також була обрана до гістологічного дослідження[65-67].

Гістологічна структура селезінки щурів при введенні фізіологічного розчину (контроль, без ризику СГЯ) та при введенні різних доз гонадотропних гормонів (10 мкг/мл ФСГ, 15 мкг/мл ФСГ, 130 мкг/мл ФСГ) не відрізнялась. Тобто імунокомпетентні органи при введенні високих доз ФСГ не піддаються структурним змінам порівняно з контролем (рисунок 3.2).

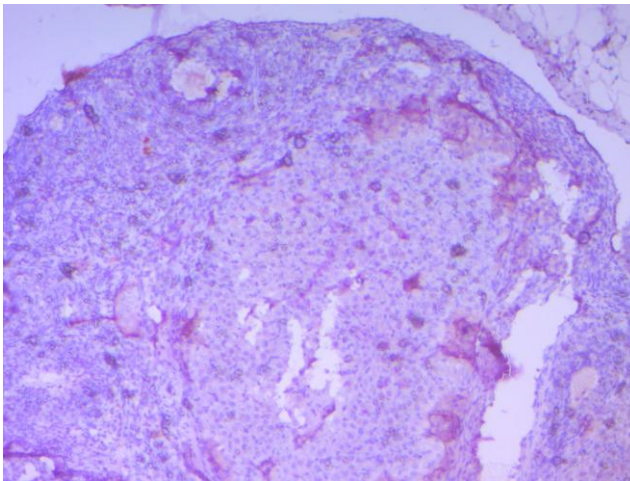
3.3 Лектингістохімічні дослідження яєчників ссавців при ризику розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

Результати фарбування гістологічних зрізів яєчника LT3 предствлені на рисунку 3.3.

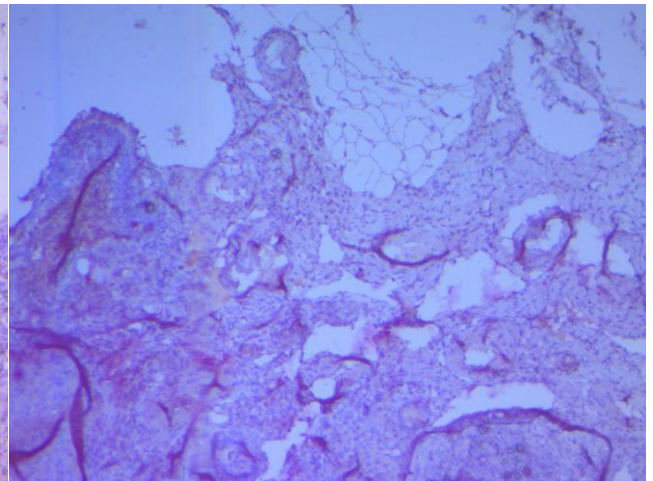
При ризику розвитку СГЯ у гістологічних зразках яєчників порівняно з контролем (введення фізіологічного розчину замість ФСГ) було відмічено тенденцію розширення площі фарбування (наявність Т-лімфоцитів CD3⁺) по всьому гістологічному зразку яєчника відповідно до підвищення дози введеного гормону. Це може свідчити про інфільтрацію Т-лімфоцитами органу при збільшенні доз гонадотропних гормонів.

а (контроль) CD3⁺

б



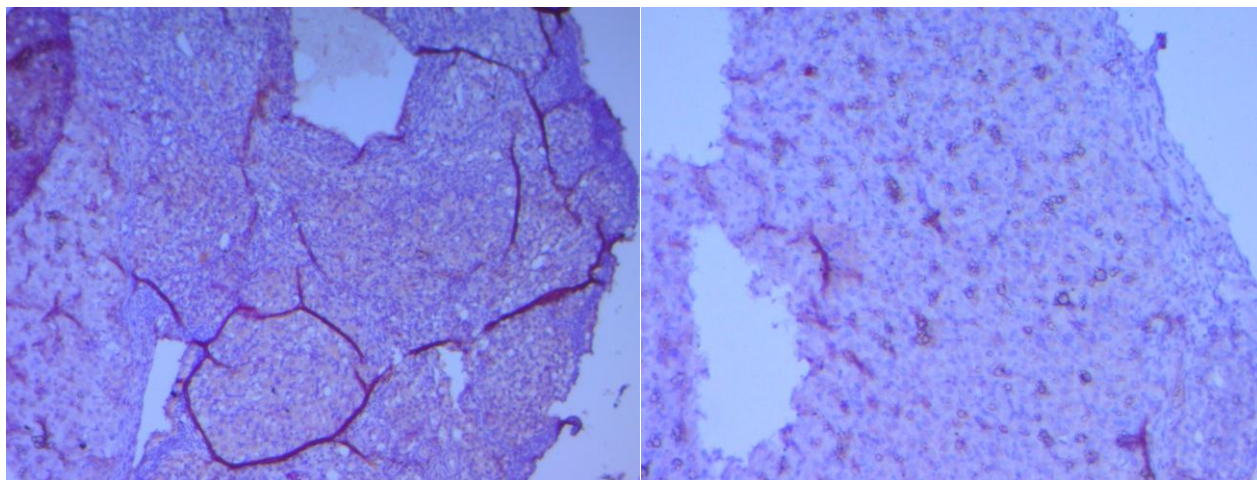
в



г

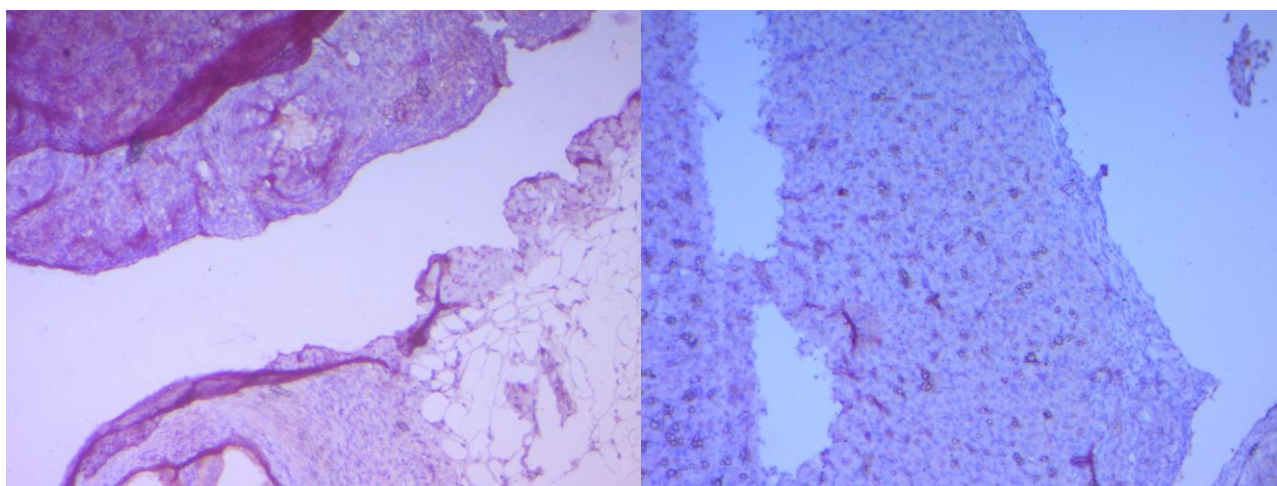
Рисунок 3.3 – Яєчник щура (а – без ризику СГЯ; б – при введенні 10 мкг/мл ФСГ; в – при введенні 15 мкг/мл ФСГ; г – при введенні 130 мкг/мл ФСГ).

Результати фарбування гістологічних зрізів яєчника LT4 зображені на рисунку 3.4.



а (контроль) CD4⁺

б



в

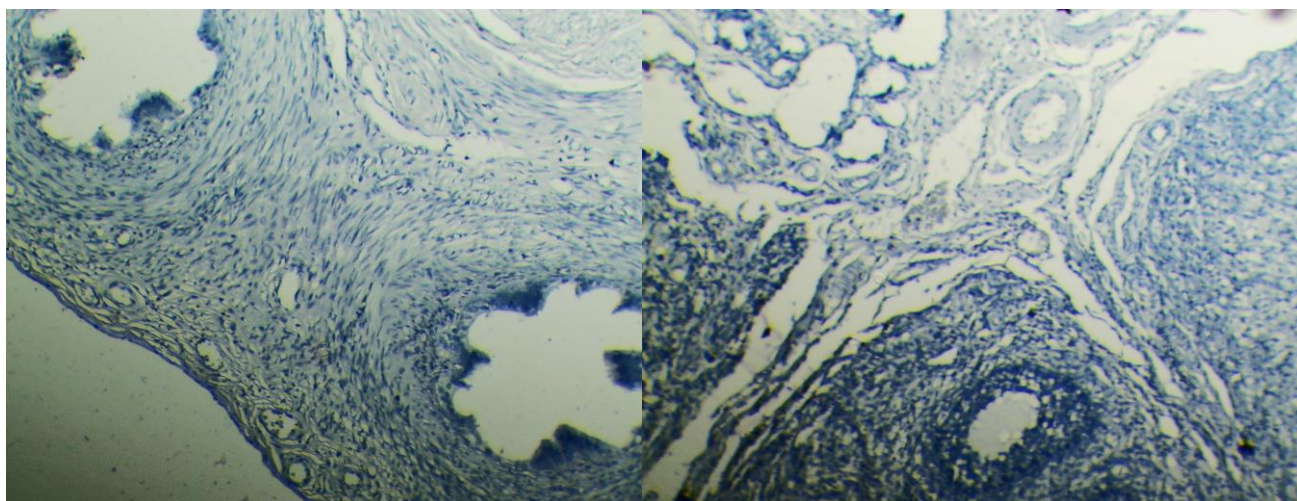
г

Рисунок 3.4 – Яєчник щура (а – без ризику СГЯ; б – при введенні 10 мкг/мл ФСГ; в – при введенні 15 мкг/мл ФСГ; г – при введенні 130 мкг/мл ФСГ).

У гістологічних зразках яєчників при ризику розвитку СГЯ порівняно з контролем виявлена тенденція, як і в попередніх зразках (рисунок 3.3) розширення площі фарбування (наявність Т-лімфоцитів CD4⁺) від окремих острівців фарбування (Т-хелпери/індуктори) по препарату до їх виявлення по всьому гістологічному зразку яєчника, що також свідчить про підвищення

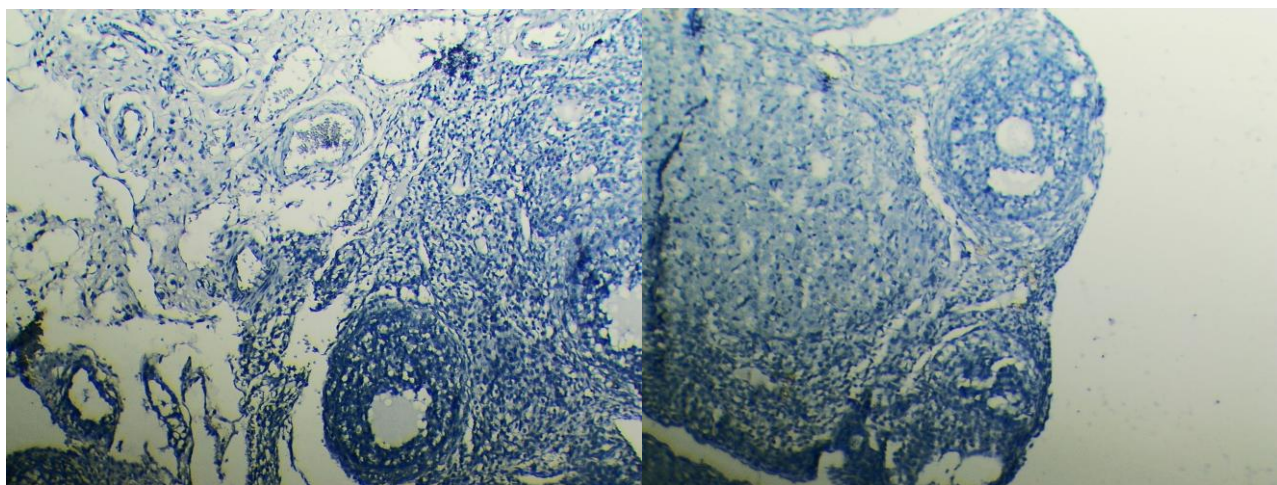
інфільтрації Т-хелперів/індукторів органу при високих дозах ФСГ. Причому розширення площі фарбування (наявність Т-лімфоцитів $CD4^+$) у зразках відбувалось відповідно до підвищення дози введеного гормону.

Результати фарбування гістологічних зрізів яєчника лектином Вікі посівної представлені на рисунку 3.5.



а (контроль) $CD8^+$

б



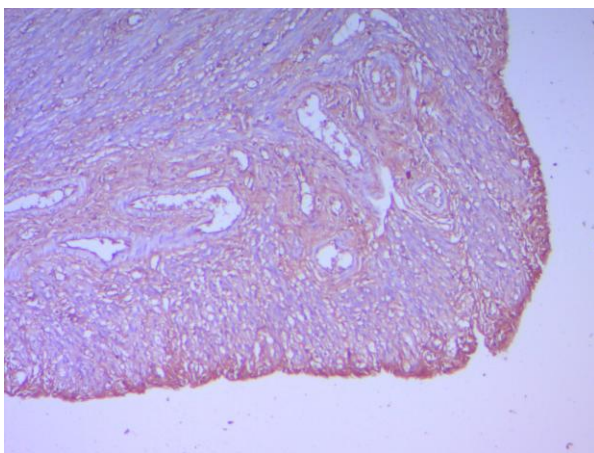
в

г

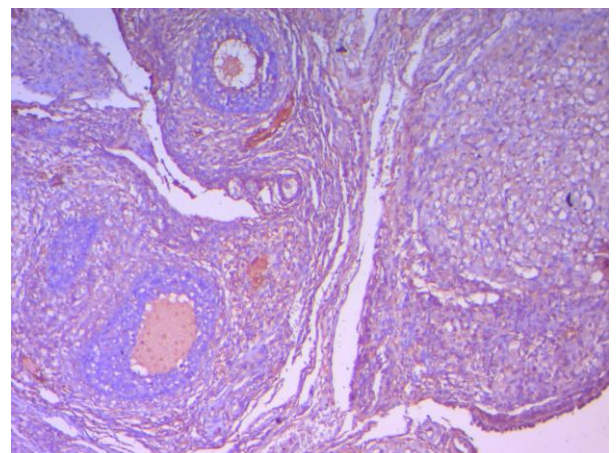
Рисунок 3.5 – Яєчник щура (а – без ризику СГЯ; б – при введенні 10 мкг/мл ФСГ; в – при введенні 15 мкг/мл ФСГ; г – при введенні 130 мкг/мл ФСГ).

У гістологічних зразках яєчників при різних дозах введеного гормону ФСГ порівняно з контролем розширення площі фарбування (цитотоксичні Т-лімфоцити CD8⁺) не виявлено. Проте чітко ідентифікується збільшення числа дозріваючих ооцитів, що співпадає з даними гістологічних зразків, представлених на попередніх рисунках 3.1, 3.3.

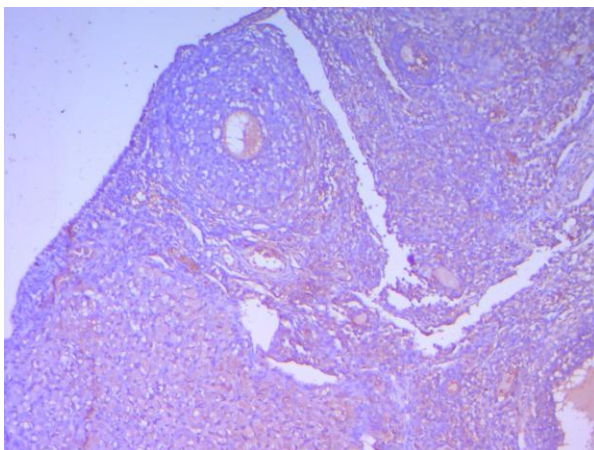
Результати фарбування гістологічних зрізів яєчника лектином зародків пшениці зображені на рисунку 3.6



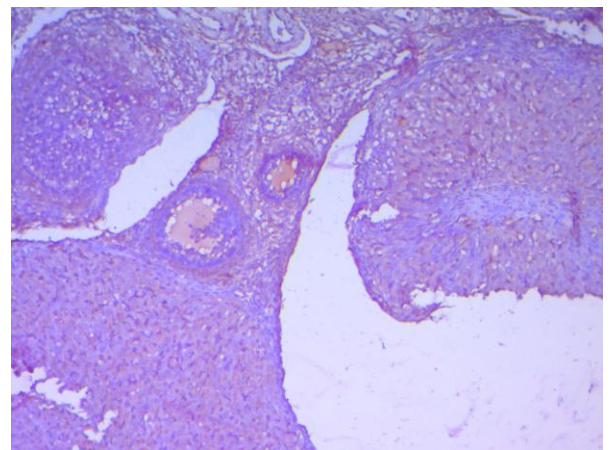
а (контроль) CD16⁺



б



в

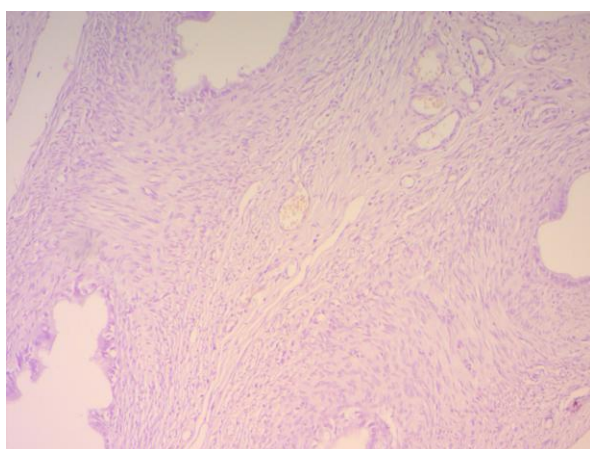


г

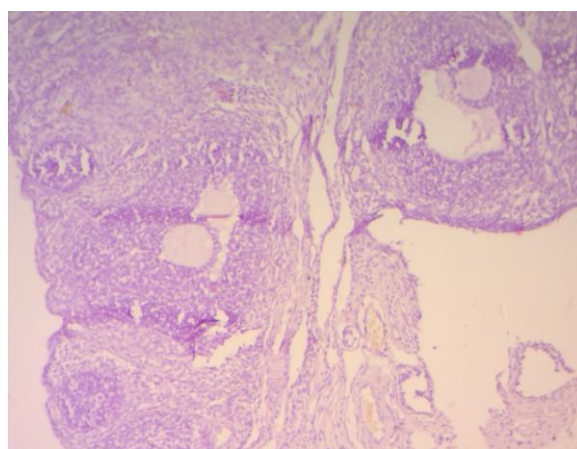
Рисунок 3.6 – Яєчник щура (а – без ризику СГЯ; б – при введенні 10 мкг/мл ФСГ; в – при введенні 15 мкг/мл ФСГ; г – при введенні 130 мкг/мл ФСГ).

У гістологічних зразках яєчників, пофарбованих лектином зародків пшениці, які виявляють CD16⁺, у мікропрепаратах з різною дозою введеного ФСГ та у контролі площі фарбування (натуральні кілерні клітини) не відрізнялись. Як і у попередніх зразках (рисунок 3.1, рисунок 3.3, рисунок 3.5) видно збільшення числа дозріваючих яйцеклітин.

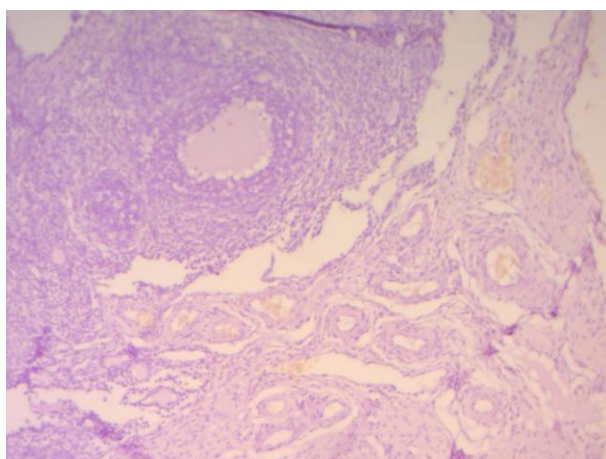
Результати фарбування гістологічних зрізів яєчника лектином арахісу, який виявляє активовані форми лімфоцитів (а саме імунологічно незрілі, що виявляють активні проліферативні процеси), представлені на рисунку 3.7.



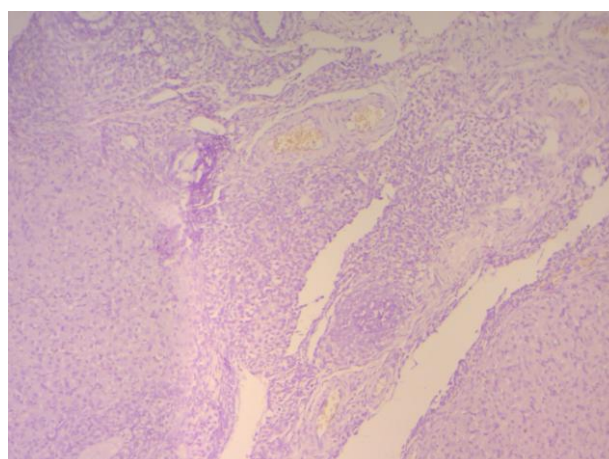
а (контроль) активовані



б



в



г

Рисунок 3.7 – Яєчник щура (а – без ризику СГЯ; б – при введенні 10 мкг/мл ФСГ; в – при введенні 15 мкг/мл ФСГ; г – при введенні 130 мкг/мл ФСГ).

У гістологічних мікропрепаратах яєчників відповідно до збільшення дози введеного ФСГ (ризик розвитку СГЯ) порівняно з контролем виявлена тенденція, як для Т-лімфоцитів ($CD3^+$) та Т-хелперів/індукторів ($CD4^+$), до збільшення частоти виявлення активованих форм лімфоцитів.

Таким чином, у яєчниках щурів молодого віку при ризику розвитку СГЯ під впливом високих доз гонадотропних гормонів, відбувається підвищення інфільтрації тканин яєчника Т-лімфоцитами, а саме Т-хелперами/індукторами та їх активованими формами, що може свідчити про активаційні імунні процеси у організмі ссавців під впливом ФСГ.

3.4 Кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові обстежених з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників

Показник загального вмісту лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові жінок без ризику та з ризиком розвитку СГЯ представлені у таблицях 3.1 та 3.2.

За даними нашого аналізу (таблиця 3.1) всі показники жінок без ризику розвитку СГЯ були в межах фізіологічної норми. Кількість отриманих при пункції фолікулів складала 6,00 (4,00-7,00) шт., що відповідає рівню відсутності ризику розвитку СГЯ (до 10 фолікулів).

У обстежених групи ризику виникнення СГЯ (таблиця 3.2) відносно показників норми підвищеними виявилися кількість лейкоцитів (9,55 (8,60-11,28) Г/л), фолікулів (16,50 (13,5-20,00 шт.) та абсолютний вміст сегментоядерних нейтрофілів (5,94 (5,04-6,97) Г/л). Підвищення загальної кількості лейкоцитів та вмісту клітин окремої ланки імунітету свідчить про наявність активаційних процесів у імунній системі обстежених при ризику розвитку СГЯ.

При порівняльній характеристиці показників лейкограми груп без ризику (1 група) та з ризиком розвитку СГЯ (2 група) було виявлено (таблиця 3.3) статистично значиме ($p \leq 0,05$) підвищення у групі з ризиком СГЯ за кількістю фолікулів ($p=0,00$), вмістом лейкоцитів ($p=0,03$) та рівнем сегментоядерних нейтрофілів ($p=0,01$).

Таблиця 3.1 – Описова характеристика показників лейкограми периферичної крові жінок без ризику розвитку СГЯ.

Показник		п спостережень	Середнє	Медіана	Мінімум	Максимум	Процентиль (25,00)	Процентиль (75,00)
Фолікули, шт.		25	5,20	6,00	0,00	9,00	4,00	7,00
К-сть лейкоц., Г/л		25	8,10	7,65	4,90	12,65	6,70	9,95
Еозинофіли	%	25	1,16	1,00	0,00	3,70	0,50	1,50
	Г/л	25	0,09	0,10	0,00	0,44	0,03	0,11
Паличкоядерні нейтрофіли	%	25	3,70	3,00	1,30	11,50	2,00	4,50
	Г/л	25	0,29	0,25	0,09	0,94	0,18	0,34
Сегментоядерні нейтрофіли	%	25	58,08	56,50	36,50	73,90	54,00	64,50
	Г/л	25	4,71	4,39	2,30	7,94	3,66	5,47
Моноцити	%	25	5,77	5,50	1,00	10,00	5,00	7,90
	Г/л	25	0,47	0,41	0,07	1,00	0,36	0,65
Лімфоцити	%	25	31,34	32,50	13,00	51,50	23,00	39,50
	Г/л	25	2,50	2,31	0,81	4,41	1,69	3,23

Таблиця 3.2 – Описова характеристика показників лейкограми периферичної крові жінок з ризиком розвитку СГЯ.

Показник		п спостережень	Середнє	Медіана	Мінімум	Максимум	Процентиль (25,00)	Процентиль (75,00)
Фолікули, шт.		16	17,06	16,50	9,00	35,00	13,50	20,00
К-сть лейкоц., Г/л		16	10,08	9,55	4,75	20,40	8,60	11,28
Еозинофіли	%	16	1,30	0,95	0,00	5,10	0,20	1,60
	Г/л	16	0,13	0,08	0,00	0,54	0,02	0,16
Паличкоядерні нейтрофіли	%	16	3,25	3,20	0,87	8,20	1,40	4,65
	Г/л	16	0,31	0,26	0,09	0,95	0,17	0,38
Сегментоядерні нейтрофіли	%	16	61,74	61,45	49,50	75,90	55,65	65,70
	Г/л	16	6,16	5,94	2,99	10,73	5,04	6,97
Моноцити	%	16	5,73	5,45	2,40	10,30	4,40	6,95
	Г/л	16	0,59	0,60	0,20	1,33	0,25	0,75
Лімфоцити	%	16	27,98	28,25	15,30	41,10	21,20	32,60
	Г/л	16	2,88	2,64	1,21	8,08	1,86	3,42

Таблиця 3.3 – Порівняльний аналіз показників лейкограми у жінок без ризику (1 група) та з ризиком розвитку СГЯ (2 група).

Показник		Сум.ранг (Група 1)	Сум.ранг (Група 2)	U	Z	p-рів.	Z (скор.)	p-рів.	N (Група 1)	N (Група 2)	2-х стор (точ. p)
Фолікули, шт.		326,00	535,00	1,00	-5,31	0,00*	-5,32	0,00*	25	16	0,00*
К-сть лейкоц., Г/л		442,50	418,50	117,50	-2,19	0,03*	-2,19	0,03*	25	16	0,03*
Еозинофіли	%	528,00	333,00	197,00	0,07	0,95	0,07	0,95	25	16	0,95
	Г/л	510,50	350,50	185,50	-0,37	0,71	-0,38	0,71	25	16	0,70
Паличкоядерні нейтрофіли	%	551,00	310,00	174,00	0,68	0,50	0,68	0,49	25	16	0,50
	Г/л	527,00	334,00	198,00	0,04	0,97	0,04	0,97	25	16	0,97
Сегментоядерні нейтрофіли	%	488,00	373,00	163,00	-0,98	0,33	-0,98	0,33	25	16	0,33
	Г/л	432,00	429,00	107,00	-2,47	0,01*	-2,47	0,01*	25	16	0,01*
Моноцити	%	532,50	328,50	192,50	0,19	0,85	0,19	0,85	25	16	0,84
	Г/л	480,00	381,00	155,00	-1,19	0,23	-1,19	0,23	25	16	0,24
Лімфоцити	%	570,00	291,00	155,00	1,19	0,23	1,19	0,23	25	16	0,24
	Г/л	503,00	358,00	178,00	-0,57	0,57	-0,57	0,57	25	16	0,57

Примітка. * - показники статистично значимо відрізняються між 1-ю та 2-ю групами ($p \leq 0,05$).

3.5 Фарбування мікропрепаратів з використанням лектинової цитохімії

Для приготування предметних скелець із лунками використовували, по-перше, парафінову стрічку та, по-друге, предметні скельця із 8 лунками (СП 7104 EximLab) без використання стрічки Parafilm M.

При апробації цих двох методів та матеріалу результати були різні. Відпрацювання методики імунофенотипування лімфоцитів а допомогою лектинової цитохімії виконувалось спільно з співавторами: к. б. н., доц. Копійкою В. В., студенткою Риженьких Т.

Так, на предметних скельцях із лунками, які були виготовлені за допомогою парафінової стрічки, зручніше фарбувалися досліджені зразки, ніж при використанні скелець із 8 лунками без стрічки. Скельця з 8 лунками використовували для можливості одночасного використання у фарбуванні декількох лектинів для одного зразка крові. Однак при використанні такого скельця з 8 лунками при нанесенні розчину лектину та проявника через низькі бортики лунки розчини з різними лектинами можуть переливатись у іншу лунку та змішуватись. А при використанні лунок, виготовлених за допомогою стрічки Parafilm M різні лектини між собою не контактували, що дозволило більш якісно профарбувати препарати лектинами та точніше аналізувати досліджені зразки. Тому у подальших дослідах використовували лише мікропрепарати, приготовлені за допомогою стрічки Parafilm M.

Наступним етапом роботи було відпрацювання схеми фарбування лектинами цитологічних мікропрепаратів лейкоконцентрату периферичної крові.

1. Розведення 96 % спирту до 60 % і 30 %.

Опустити препарати в 3 склянки з 96 % спиртом на 5 хвилин або в 2 склянки з 96 % спиртом на 7 хвилин.

2. Потім помістити в метанол на 20 хвилин.

Розведення метанолу:

135 мл метанолу + 15 мл перекисю водню (3%).

3. Помістити препарати в спирт 60%, на 8 хвилин.
4. Потім, помістити препарати в спирт 30% на 8 хвилин.
5. В ЗФР від 30 секунд до 1 хвилини.
6. Наступним етапом є експозиція лектином (1:50), лектин : ЗФР.

Проводиться фарбування 1 годину в термостаті при температурі 37°С.

Розведення:

0,2 мл лектину + 10 мл ЗФР.

7. Потім препарат занурюють в ЗФР на 30 секунд – 1 хвилину, 2 рази.
8. Наступним етапом є нанесення на препарати бензидину від 15-30 хвилин. Препарати ставлять в термостат при температурі 37°С.

Розведення бензидину:

20 мг бензидину + 2 мл абсолютного спирту + 5 мл H₂O + 0,2 мл трис буферу – добре перемішати відфільтрувати, процедура відбудеться під витяжною шафою. Після фільтрації додають 5 крапель 3 %-го перекису водню.

9. Останнім етапом є відмивання препаратів в спирті 70 % і 96 %, по 30 секунд (можна 1 хвилину).

10. Сушка і мікроскопування препаратів.

3.6 Виявлення мембранних активаційних рецепторів лімфоцитів периферичної крові з використанням методу лектинової цитохімії

Для виявлення рецепторів активації лімфоцитів периферичної крові був використаний лектин арахісу підземного.

Отримані дані щодо вмісту основних популяцій та субпопуляцій Т-лімфоцитів крові обстежених осіб, виявлених за допомогою лектинів, представлені у таблицях 3.4 – 3.6.

Таблиця 3.4 – Вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові жінок без ризику розвитку СГЯ, %.

Лектин	N спост.	Середнє	Медіана	Нижня	Верхня	Процентиль	Процентиль
PLA+ VSA (CD3 ⁺)	9	66,67	68	66,5	68,5	66,5	68,5
PLA (CD4 ⁺)	9	45,67	46,5	45,5	47,5	45,5	47,5
VSA (CD8 ⁺)	9	21,00	20,5	18,5	21	18,5	21
PNA (активовані)	9	0,6	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0

За даними таблиці 3.4 всі отримані показники імунофенотипування лімфоцитів обстежених групи контролю відповідали референтним віковим нормам.

Показники лектинцитохімічного імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові жінок з ризиком розвитку СГЯ представлені у таблиці 3.5.

При аналізі описової статистики даних імунофенотипування осіб з групи ризику розвитку СГЯ (таблиця 3.5), крім перерозподілу в бік збільшення вмісту Т-хелперів/індукторів, також було виявлено перевищення більше, ніж у 4 рази вмісту активованих форм лімфоцитів.

Таблиця 3.5 – Вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові жінок з ризиком розвитку СГЯ, %.

МКАТ	N спост.	Середнє	Медіана	Нижня	Верхня	Процентиль	Процентиль
PLA+ VSA (CD3 ⁺)	7	69,07	68,5	65,5	72,5	65,5	72,5
PLA (CD4 ⁺)	7	54,71	56	52	57	52	57
VSA (CD8 ⁺)	7	14,36	15	11,5	16	11,5	16
PNA (активовані)	7	3,0	2,5	2,5	4,0	2,5	4,0

Це підтверджує дані інших авторів про активне залучення імунних механізмів до розвитку клінічних симптомів синдрому гіперстимуляції яєчників. Цей напрям є актуальним для подальшого дослідження щодо виявлення найбільш ранніх лабораторних маркерів виявлення осіб, у яких до появи клінічних симптомів синдрому можна діагностувати початок розгортання механізмів даного патологічного стану.

Для порівняння отриманих даних щодо імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові у жінок без ризику (табл. 3.4) та з ризиком розвитку СГЯ (табл. 3.5) був проведений порівняльний аналіз, дані якого представлені у таблиці 3.6.

За результатами аналізу таблиці 3.6 виявлено статистично значиме підвищення вмісту CD4⁺ (Т-хелперів/індукторів) у осіб з ризиком розвитку СГЯ порівняно з групою контролю (без ризику СГЯ). Такий підвищений вміст

T-хелперів/індукторів може бути пов'язаним з активацією імунних механізмів, які беруть участь у розвитку клінічних симптомів СГЯ.

Таблиця 3.6 – Порівняльний аналіз імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові лектинами у жінок без ризику (1 група) та з ризиком розвитку СГЯ (2 група).

Лектин / МКАТ	Сум.ранг	Сум.ранг	U	N	N	p 2-х стор
PLA+ VSA (CD3 ⁺)	68,50	67,50	23,50	9	7	0,41
PLA (CD4 ⁺)	46,00	90,00	1,00	9	7	0,00*
VSA (CD8 ⁺)	107,50	28,50	0,50	9	7	0,00*
PNA (активовані)	45,00	91,00	0	9	7	0,00*

Примітка. * - показники статистично значимо відрізняються між 1-ю та 2-ю групами ($p \leq 0,05$).

Виявлене підвищення відносного вмісту активованих клітин у периферичній крові осіб з групи ризику розвитку СГЯ також підтвердилось при проведенні порівняльного статистичного аналізу показників ($p \leq 0,05$) між групою контролю та експериментальною (з ризиком розвитку СГЯ).

4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКИ В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

Мета даного розділу показати практичні вміння, застосовувати теоретичне знання при виконанні кваліфікаційної роботи.

Експериментальна робота проводилась в клінічній лабораторії, де були чітко дотримані всі вимоги по охороні праці. В процесі написання своєї кваліфікаційної роботи зі мною був проведений інструктаж з протипожежної безпеки (інструкція № 62) та з охорони праці (інструкція № 296). Проведення робіт у лабораторії відповідало вимогам ДСТУ 2293-99 та інших діючих нормативних актів. Оптимальні умови роботи створювалися завдяки підтримці санітарно-гігієнічного режиму лабораторії. Так, параметри температури, вологості, освітленості, швидкості переміщення повітря майже протягом усього експерименту, відповідали вимогам ДСН 3.36.042 99 [68]. Повітря робочої зони відповідало ДСТУ 12.1.005-88 [69]. Повітря в лабораторних кімнатах забруднюється виділеннями шкідливих речовин. Згідно БНіП 2.04.05-91 кожна лабораторія обладнана системою природної і припливної вентиляції. Припливні системи забезпечують поновлення повітря, що видаляється системою вентиляції, місцеві системи забезпечують технологічні потреби. Попередження застою повітря досягалося шляхом відчиняння вікон лабораторії ще до початку досліду, а у разі використання отруйних речовин та речовин, що неприємно пахнуть - роботою примусово - витяжної вентиляції, що відповідала БНіП 2.04.05-91 [70] і ДСН 3.36.042 99 [71]. Для дезінфекції приміщень використовують бактерицидні лампи. Лампи встановлюють на висоті 1,5 – 2 м від підлоги з розрахунку одна лампа на 1 м² приміщення. Стерилізацію здійснюють протягом 2 годин. При роботі з включеною бактерицидною лампою працівник може одержати опіки очей і ділянок шкіри, незахищених одягом. Довжина хвилі ультрафіолетового випромінювання складає 200 – 280 нм. Дане випромінювання надає сильну руйнівну дію на клітки живих організмів. Озон, який утворюється під дією УФ

випромінювання, окисляє органічні речовини. Основними заходами захисту від ультрафіолетового випромінювання служать екранування джерел випромінювання (стіни забарвлені цинковими білилами в сірий колір) і використання засобів індивідуального захисту (спецодяг з тканин, що є не проникним для ультрафіолетового випромінювання – льон; фартух; захисні окуляри).

При виконанні досліджень важливу роль грає освітлення робочого місця. Освітленість створюється сонцем і за допомогою ламп накаливання і люмінесцентних ламп, яке може бути природним та штучним. Природне і штучне освітлення лабораторії повинне відповідати вимогам ДБН В.2.5-28-2006. Природне освітлення створювалось під час роботи боковим світлом, а штучне – за допомогою ламп розжарювання та люмінесцентних ламп. Для умов, які роздивляються в проекті, нормоване значення освітлення 750 лк, що відповідають умовам в лабораторії.

Для забезпечення нормального значення передбачено: 1) захист від сліпучої дії прямих сонячних променів за допомогою штор, жалюзі; 2) покриття столу повинно бути матовим з коефіцієнтом відображення 0,25 – 0,4; 3) стіни та стеля повинні бути пофарбовані світлою фарбою [72].

Важливе значення має мікроклімат робочої зони лабораторії. Згідно СніП 2.04.85-86 та ДеСТу 12.4.021-75 для забезпечення оптимальних параметрів мікроклімату передбачено: природня вентиляція; водяне опалення; вологе прибирання один раз на день [73].

Працівники лабораторії забезпечуються засобами індивідуального захисту. В процесі біохімічного дослідження використовувалося чимало хімічних реактивів, при роботі з якими, згідно ст. 163 Кодексу законів про працю України і ДНАОП 0.00-4.26-96, обов'язково користуватися спецодягом (халат з бавовняної тканини) [74]. Для захисту особистих органів зору застосовуються герметичні окуляри, захисні окуляри і маска. Для захисту рук використовують гумові рукавички. Для запобігання попадання різних речовин на одяг робочого слід надягати білий халат. У тканині не повинно бути

домішок синтетичних волокон, тому що у випадку загоряння підпалені частини халата важко видалити з одягу. Протягом усього експерименту я працювала у халаті, гумових рукавичках, та у ватно-марлевій пов'язці, щоб уникнути потрапляння на шкіру та слизові оболонки крові або реактивів. Взагалі робота з кров'ю ведеться за допомогою спеціальних інструментів і допоміжних матеріалів (дозаторів медичних лабораторних, наконечники дозаторів).

Безпека у лабораторіях повинна забезпечуватися відповідно до вимог ДСТ 12.3.002-75 та інших діючих нормативних актів.

На всі види робіт, що являють собою потенційну небезпеку повинна бути підготовлена документація, що узгоджується з керівником робіт. Для запобігання виникнення нещасних випадків, пожеж і вибухів слід чітко виконувати правила з техніки безпеки. Експерименти треба проводити акуратно, уважно та з достатнім знайомством із приладами, інструментами, властивостями речовин і правилами безпеки робіт [75].

Перед початком роботи треба: переодягти спеціальний одяг і отримати дозвіл на виконання роботи, ознайомитись із правилами безпеки робіт, обладнанням, матеріалами та інструментами. Необхідно перевірити на справність прилади: цілісність дротів, заземлення (занулення) приладів. Упевнитись в наявності засобів гасіння вогню і надання першої долікарської допомоги. Не дозволяється заходити у лабораторію у верхньому одязі .

При роботі з хімічними реактивами обов'язковий спецодяг (халат з бавовняної тканини) згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і ДНАОП 0.00-4.26-96 [76]. У тканині не повинно бути добавок синтетичних волокон, тому що у випадку займання оплавлені частини халату важко видалити з одягу.

При проведенні дослідів у лабораторії застосовуються одноразові пробірки. Неприпустимо, щоб пробірка була наповнена до країв, щоб уникнути вихлюпування і попадання рідин на шкіру експериментатора. У раковину не можна виливати і викидати концентровані розчини кислот і лугів,

що сильно пахнуть, та отруйні речовини, і т.п. При виливанні в раковину таких речовин можливе їхнє випаровування й отруєння повітря лабораторії. Концентровані кислоти і луги необхідно попередньо сильно розбавити чи нейтралізувати, щоб уникнути руйнування каналізаційної мережі (відповідно до ДСТ 12.1.007-76) [77].

При написанні цієї роботи мені довелося працювати із електроприладами. Усі мої дії підпорядковувалися вимогам ДНАОП 0.00-1.21-98 «Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів». Санітарні норми щодо вібрації та шуму дотримані згідно ДНАОП 0.03-3.12-84 та ДНАОП 0.03-3.14-85. З усіма приладами я працювала у присутності лаборанта та чітко дотримуючись їх інструкцій та паспортів заводу-виробника. Після закінчення дослідів, а також коли прилад був тимчасово не потрібен, він був відключений від електромережі. Використовувалася лише діючі прилади, що пройшли обов'язковий профілактичний огляд та перевірку.

Вимоги безпеки перед початком роботи:

- 1) перед початком роботи лаборант зобов'язаний перевірити та одягти спеціальний одяг та засоби індивідуального захисту;
- 2) підготувати до роботи робоче місце;
- 3) перевірити цілісність заземлення електрообладнання;
- 4) перевірити наявність первинних засобів пожежогасіння;
- 5) при виявлених несправностях обладнання та засобів колективного захисту сповістити завідувача відділу та не приступати до роботи до усунення виявлених несправностей.

Вимоги безпеки під час роботи:

- 1) при роботі з кров'ю:
 - суворо дотримуватися інструкції з охорони праці при роботі з кров'ю, та правил особистої гігієни;
 - користуватися засобами індивідуального захисту;
- 2) при роботі зі скляним посудом необхідно стежити за його цілісністю;
- 3) вимоги безпеки при роботі з їдкими та отруйними речовинами:

– луги, кислоти та інші їдкі й отруйні речовини необхідно набирати у дозатор медичний лабораторний.

– усі роботи слід виконувати у гумових рукавичках;

4) роботи у відділі повинні проводитися тільки на справному електрообладнанні;

5) у випадках припинення подачі електроенергії всі електроприлади повинні бути знеструмлені;

б) для обробки столів використовуються пожежобезпечні синтетичні миючі засоби;

7) не піднімати вагу вище допущеної норми;

8) при виявленні під час роботи несправностей на робочому місці, в обладнанні та засобах колективного захисту зупинити роботу, вимкнути обладнання. Повідомити про це завідувача лабораторії.

Вимоги безпеки після закінчення роботи:

1) вимкнути обладнання, електроприлади, вимкнути електроенергію;

2) прибрати посуд, вогнебезпечні речовини у відповідне для них місце;

3) прибрати робоче місце;

4) обробити руки дезінфікуючим розчином і вимити водою з милом;

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях:

1) при виявленні аварійної ситуації, або ситуації, яка може привести до аварії, або нещасного випадку, треба негайно припинити роботу і повідомити завідувача відділу;

2) у випадку припинення подачі струму треба негайно вимкнути головний рубильник;

3) у випадку травмування, лаборант повинен вжити заходів до надання необхідної допомоги потерпілому.

Дуже важливим аспектом реалізації безпечної роботи в лабораторії є дотримання правил пожежної безпеки. Пожежна безпека регламентується Законом України «Про пожежну безпеку» від 17.12.93 року, Правилами

пожежної безпеки України, затвердженими 14.06.1995 року наказом №400 МВС України та даною інструкцією. У разі виникнення пожежі та її ознак (запах горіння, замкнення, тління різних матеріалів), згідно посадової інструкції лаборант повинен:

- негайно припинити роботу;
 - знеструмити електрообладнання;
 - негайно розпочати гасіння наявними засобами пожежогасіння
- повідомити за телефоном 101 у пожежну охорону і сповістити про місце пожеги, його характер, наявність людей у приміщенні і хто зателефонував;
- доповісти про те, що трапилось, завідувачу лабораторії.

При неможливості здійснення даних дій, вийти з приміщення, щільно зачинити за собою двері та вікна, щоб запобігти приливу свіжого повітря, яке сприятиме швидкому поширенню вогню. Негайно викликати пожежну охорону [78].

При роботі з кров'ю я дотримувалась інструкції № 76, яка складена на основі «Інструкції по організації роботи лабораторій діагностики ВІЛ-інфекцій» (Наказ МОЗ України від 22.02.02 №71) та Наказу МОЗ України від 25.05.2000 №120 «Про вдосконалення організації допомоги хворим на ВІЛ-інфекцію та СНІД». Всі працівники лабораторії мають знати безпечні прийоми роботи з кров'ю на своєму робочому місці і обов'язково виконувати, відносячись до крові як до потенційно зараженої вірусом СНІД та снідасоційованих інфекцій (гепатитів А, В, С), сифілісом.

При роботі з кров'ю, можливе її потрапляння на шкіру, одяг, слизові оболонки. Перед тим як приступити до роботи, необхідно всі пошкодження шкіри на руках закрити лейкопластирем або напальником. У разі попадання під час роботи біоматеріалу на одяг: одяг зняти і замочити в одному з дезрозчинів (0,5 % дезактин, 0,5 % сульфохлорантин, 3 % хлорамін, 6 % розчин перекису водню); шкіру рук та інших ділянок тіла при їх забрудненні через одяг протерти 70 % спиртом, а потім промити водою з милом і повторно протерти спиртом; забруднене взуття дворазово протерти ганчіркою,

змоченою у розчині одного з дозволених для використання дезінфікуючих засобів. У випадку забруднення біоматеріалом без ушкодження шкіри: 1) обробити місце забруднення одним із дезінфектантів (70 % спирт, 3 % перекис водню); 2) промити водою з милом і вдруге обробити спиртом ;

При контакті з біоматеріалом, що супроводжується порушенням цілісності шкіри (укол, поріз) потерпілий повинен: 1) зняти рукавички робочою поверхнею усередину; 2) видавити кров із рани; 3) ушкоджене місце обробити одним із дезінфектантів (70 % спирт, 5 % настойка йоду при порізах, 3% перекис водню); 4) ретельно вимити руки з милом під проточною водою, а потім протерти їх 70 % спиртом; 5) на рану накласти пластир, надіти напальник; 6) припинити роботу з кров'ю; 7) повідомити завідувача лабораторії.

У разі потрапляння біоматеріалу на слизові оболонки:

- ротова порожнина - прополоскати 70 % спиртом;
- порожнини носа – закапати 30 % р-ном альбуциду;
- очі – промити водою, закапати 30 % р-ном альбуциду.

В лабораторії, для дотримання правил безпеки, ніколи не повинна залишатися працювати одна людина, так як обов'язкова присутність іншої людини необхідна для того, щоб можливо було своєчасно надати першу домедичну допомогу в разі нещасного випадку. Усі роботи в лабораторії проводилися при справному стані електроприладів, електропроводок та захисного заземлення. На підлозі перед кожним приладом лежить гумовий килимок. Я чітко дотримувалась інструкцій до кожного електроприладу в лабораторії.

Електроприлади вмикаються в мережу з відповідною приладу напругою. Використовуючи електроприлади, дотримуючись правил безпеки, так як можливі випадки враження людей електричним струмом та виникнення пожеж.

При впливі на людський організм електричної напруги 220 В та більше може виникнути електротравма – ураження електричним струмом.

Ознаки ураження електричним струмом:

- 1) постраждалий лежить, схопившись за розетку, електричний прилад або інструмент, підключений до електричної мережі;
- 2) поруч з постраждалим знаходиться електричний прилад підключений до розетки, або оголений електропровід;
- 3) постраждалий блідий, на шкірі можуть бути почервоніння, набряки, опіки, обвуглення;
- 4) постраждалий несвідомий, може спостерігатися зупинка дихання і серцевої діяльності.

Для надання першої допомоги постраждалому при ураженні електричним струмом необхідно: 1) припинити доступ електричного струму до постраждалого – відкинути від нього провід. Для цього використовується будь-який сухий неметалічний предмет, що не є провідником електричного струму; 2) якщо постраждалий у стані коми, перевернути його на живіт; 3) при раптовій зупинці серця приступити до реанімації (непрямого масажу серця і штучного дихання); 4) надати допомогу у такому порядку: зупинити кровотечу, накласти стерильні пов'язки на рани й опіки, накласти шини на кінцівки при переломах [79].

На випадок ліквідації наслідків аварії в лабораторії є аптечка, яка містить: 70° етиловий спирт, нашатирний спирт, альбуцид, перекис водню, йод, перманганат калію (3 наважки по 0,05 г), наважки деззасобіб, стерильна вата, стерильна дистильована вода, набір антибіотиків спеціальної дії, очні піпетки, ножиці, напальчники (2 на кожного працівника), лейкопластир, перев'язувальний матеріал. Комплектність аптечки та терміни зберігання перевіряє та поповнює старший лаборант.

Загальні правила роботи з реактивами повинні відповідати ДСТУ 12.1.007-76 [80] і ДСТУ 12.1.010-76 [81]. Хімічні реакції виконуються з такою кількістю та концентрацією, в такому посуді та приладах і в таких умовах, як це вказано в відповідних інструкціях. Враховуючи вивчені основи охорони праці, проводила дослідження, додержуючись правил безпеки в роботі з

агресивними речовинами, кислотами та лугами. Хімічні опіки виникають при потраплянні на шкіру розчинів кислот і солей важких металів (характеризуються невеликою глибиною), а також лугів (глибокі опіки). Надання першої допомоги при хімічних опіках починається з рясного промивання ураженої ділянки водою (за винятком опіків, отриманих при потраплянні на шкіру негашеного вапна). Згодом речовини, що залишилися на поверхні шкіри, варто нейтралізувати. Для нейтралізації кислот використовують 2 %-й розчин питної соди, для нейтралізації лугів – 2 %-й розчин борної, оцтової або лимонної кислот. Потім на опік накладається стерильна пов'язка. Опіки дуже болючі і небезпечні, тому що при опіках ушкоджується один з головних органів людини – шкіра, що виконує захисну функцію. Необхідно якнайшвидше надати першу медичну допомогу, щоб уникнути больового шоку і проникнення інфекції крізь обпалену поверхню [82].

Проведення експерименту супроводжувалось одержанням великої кількості інформації, обробити яку швидко можливо тільки з використанням комп'ютерної техніки. Для запобігання шкідливому впливу на зоровий апарат при роботі я дотримувалась правила – не сиділа ближче до екрану ніж 50-70 см.

Робота у лабораторії при виконанні експериментальних досліджень з теми кваліфікаційної роботи була безпечною, оскільки були враховані і виконувались вимоги з техніки безпеки, також застосовували теоретичне знання з охорони праці, що мало велике значення для успішного завершення виконуваної мною роботи [83].

ВИСНОВКИ

1. Для гісто- та цитохімічного виявлення основних субпопуляцій лімфоцитів рекомендується використовувати лектин лімської квасолі ($CD4^+$) та лектин Віки посівної ($CD8^+$); для виявлення активованих (імунологічно незрілих новоутворених) лімфоцитів рекомендується лектин арахісу (PNA).

2. У експериментальній моделі синдрому гіперстимуляції яєчників, отриманій на щурах молодого віку, у гістологічних зразках яєчників при збільшенні дози гонадотропних гормонів виявлено підвищення інфільтрації тканин яєчника Т-лімфоцитами, а саме Т-хелперами/індукторами та їх активованими формами, що може свідчити про активацію імунних процесів у організмі ссавців під впливом фолікулостимулюючого гормону.

3. У обстежених з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції яєчників порівняно з групою контролю (без ризику розвитку синдрому гіперстимуляції) виявлено статистично значиме ($p \leq 0,05$) підвищення загальної кількості вилучених ооцитів (фолікулів), лейкоцитів та абсолютного вмісту сегментоядерних нейтрофілів, що свідчить про активаційні процеси в організмі жінок після гормональної терапії.

4. У осіб з групи ризику розвитку СГЯ порівняно з групою контролю (без ризику СГЯ) на фоні підвищення вмісту $CD4^+$ (Т-хелперів/індукторів) виявлено статистично значиме ($p \leq 0,05$) збільшення відносного вмісту активованих (PNA+) клітин у периферичній крові, що може бути пов'язаним з активацією імунних механізмів, які беруть участь у розвитку клінічних симптомів СГЯ.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для гістохімічного та цитохімічного виявлення основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів, їх активованих форм рекомендується використовувати не лише лектини, але й широко представлені на лабораторному ринку моноклональні антитіла. Ці реагенти можуть бути мічені як флуорохромами, так і виявлятися на основі пероксидази хрому; візуалізація останніх є дуже подібною до лектинової гістохімії.

2. У групі дослідження з ризиком розвитку синдрому гіперстимуляції доцільно проводити імунофенотипування лімфоцитів, в тому числі частоту активованих клітин, для своєчасного виявлення запуску активаційних процесів лімфоцитарної клітинної ланки імунітету.

3. Результати досліджень можуть бути використані при викладанні дисциплін «Імунологія», великий практикум «Методологія імунної системи ссавців», «Імунологічні методи лабораторних досліджень».

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Антонюк В. О. Лектини: поширення і функція в живих організмах та особливості заготівлі сировини. *Український біофармацевтичний журнал*. 2013. № 6. С. 4-7.
2. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. Харків: Прапор НФАУ, 2000. 703 с.
3. Куц О.Г. Лектини в імуноморфології. *Світ медицини та біології*. 2014. № 4 (47). С. 150-155.
4. Пащенко С.М. Застосування лектинів в онкології. *Онкологія*. 2011. № 3. С. 188-190.
5. Павловська Н.Е., Гагаріна І.Н. Функціональна роль лектинів рослин як передумова для їх застосування в біотехнології. *Хімія рослинної сировини*. Росія: ФГБОУ ВО Орловский ГАУ ім. Н.В.Парахіна, 2017. С. 21-35.
6. Лисяний Н.И., Гнедкова И.А., Гнедкова М.А. Вивчення протипухлинної дії рослинних лектинів на клітини гліом. *Український нейрохірургічний журнал*. 2009. № 2. С. 30-38.
7. Ружейников С.Н. Структурні аспекти вуглеводної специфічності лектинів: дис. канд. фіз.-мат. наук: 01.04.18. Москва, 1999. 117 с.
8. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: ПП «Кварт», 2005. 554 с.
9. Волошин М.А. Лімфоїдна тканина, асоційована з плацентою. *Таврический медико-биологический вестник*. 2008. № 8. С. 24-27.
10. Волошин Н.А. Динаміка лимфоцитів с рецепторами к лектину арахіса в органах новороджених белых крыс послевнутриутробного введения антигена. *International journal on immunorehabilitation*. 1999. № 6. С. 126.
11. Crocker P. R., Paulson J. C., Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Rev. Immunol.* 2007. № 2. С. 255-266.

12. Курмышкина О.В., Раппопорт Е.М., Пазынина Г.В., Бовин Н.В. Галектины как мишень при лечении рака молочной железы. *Мед. иммунология*. 2006. № 2-3. С. 343.
13. Лисяный Н.И., Гнедкова И.А., Бычкова С.А. Особенности иммунологических нарушений при глиомах головного мозга в период ремиссии. *Укр. нейрохірург. журн.* 2004. № 3. С. 55–61.
14. F.-l. Zhang, L.-L. Fu & Y. Yang. Both thromboembolic stroke and cerebral venous thrombosis resulting from Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS). *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2015. Vol. 5. P. 267-268.
15. Doron Shmorgun, Paul Claman The Diagnosis and Management of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. Joint SOGC-CFAS Clinical practice guideline. 2011. Vol. 3. P. 1156-1162.
16. Z.-J. Chen., Y. Shi, Y. Sun, et al. Fresh versus Frozen Embryos for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome / *The new england journal of medicine*. 2016. Vol. 5. P. 523-533.
17. Zhang F. The Management of Ovarian Hyperstimulation Syndrom. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, Green-top Guideline. 2016. Vol. 7. P. 1123-1128.
18. Aboulghar M. A. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Human Reproduction*. 2003. Vol.9. P. 275-289.
19. Humaidan P. Ovarian hyperstimulation syndrome: review and new classification criteria for reporting in clinical trials. *Human Reproduction*. 2016. Vol.31. P. 1997-2004.
20. Чистякова Г. Н. Особенности состояния иммунной системы у женщин в ранние сроки беременности, наступившей в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2014. № 5. С. 9-12.
21. Артифексова А. А. Морфология синдрома гиперстимуляции яичников. *Медицинская иммунология*. 2017. № 16. С. 1-15.

22. М. Б. Аншина, Э. В. Исакова, Е. А. Калинина Синдром гиперстимуляции яичников. *Российская Ассоциация Репродукции Человека*. 2013. № 7. С. 1-14.
23. Воропаева Е. Е. Особенности системного иммунного статуса у пациенток после самопроизвольного прерывания беременности. *Методы диагностики и технологии*. 2011. № 3. С. 103-109.
24. Рудакова Е. Б. Триггеры финального созревания ооцитов в программах ЭКО (клиническая лекция). *Медицинский совет*. 2016. № 12. С. 80-86.
25. Линников В. И. Клиническое значение выявления тромбофилии у пациенток с бесплодием и неудачами экстракорпорального оплодотворения. *Здоровье женщины*. 2015. № 3 (99). С. 175-181.
26. Е. Б. Дружинина, Ю. В. Мыльникова, Н. А. Болдонова Факторы риска и критерии прогнозирования синдрома гиперстимуляции яичников. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2011. № 5 (81). С. 31-36.
27. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Практикум з імунології «Методологія імунної системи ссавців»: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Запоріжжя: Сору Art, 2012. 152с.
28. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. Москва: Медицина, 1987. 368 с.
29. Берегова О. Г. Клінічна лабораторна діагностика. Ч. 1. Лабораторна гематологія : підручник. Запоріжжя: Агенство Орбіта-ЮГ, 2014. 400 с.
30. Клиническая лабораторная диагностика / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 928 с.
31. Волошин М. А., Чайковський Ю. Б., Куц О. Г. Основи імунології та імуноморфології: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2010. 170 с.
32. Лисяный Н. И., Гнедкова И. А., Гнедкова М. А. Влияние лектинов на цитотоксическую активность лимфоцитов по отношению к клеткам глиом

различной степени анаплазии. *Имунологія та алергологія*. 2008. № 2. С. 83-88.

33. Шегедін А. Ю., Яценко А. М., Луцик О. Д. Експонування глікокон'югатів у постнатальному морфогенезі яєчка щура за даними реакції та лектинової гістохімії. *Світ медицини та біології*. 2017. № 2(60). С. 174-178.

34. Галектин-1-опосредованная экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла и ростовых факторов при раке желудка Колобовникова Ю. В., Дмитриева А.И., Янкович К.И. та ін. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017. № 16 (4). С. 165-172.

35. Лахтин М. В., Лахтин В. М., Афанасьев С. С. Кандидные маркеры болезней урогенитальных биотопов: реактивность к лектинам пробиотиков. *Acta biomedica scientifica*. 2018. № 1. С. 49-53.

36. Чердынцева Н. В., Митрофанова И. В. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017. № 16 (4). С. 61-74.

37. Согомоян Є. А., Луцик О. Д. Особливості гістоструктури та лектинової гістохімії яєчників самок щура при експериментальному гіпо- та гіпертироїдизмі. *Світ медицини та біології*. 2009. № 2. С. 117-124.

38. Щур М. Б., Струс Х. І., Яценко А. М., Луцик О. Д. Особливості глікому очного яблука на тлі мерказоліл-індукованого гіпотирозу за даними лектинової гістохімії. *Світ медицини та біології*. 2017. № 1(59). С. 156-163.

39. Васильчук Н. Г., Куц О. Г. Особливості розподілу рецепторів до лектинів арахісу та ікри окуня в капсулі медіастенального лімфатичного вузла. *Світ медицини та біології*. 2015. № 4(53). С. 15-18.

40. Безмельцева О. М., Циркин В. И., Дмитриева С. Л. Оценка серотонинореактивности эритроцитов беременных женщин и рожениц по изменению времени начала агглютинации, индуцированной моноклональными антителами или фитогемагглютинином фасоли, и влияние на нее дигидрогестерона. *Медицинский Альманах*. 2017. № 6(51). С. 40-44.

41. Куц О. Г. Виявлення *PLA+*-лімфоцитів-хелперів в децидуальній оболонці матки у II-триместрі при самовільному викидні і у породіль. *Вісник проблем біології і медицини* № 3. С. 218 -222.

42. Сырцов В. К. Лектин-гистохимическое исследование периферических органов иммунной системы человека в пренатальном периоде онтогенеза. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2011. Випуск XXIV, № 1. С. 42 – 44.

43. Кошарний В. В. Використання лектинів в дослідженнях кардіогенезу щурів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2010. Вип. 2. С. 160-163.

44. Луцик М. М. Гетерогенность популяции клеток лимфомы NK/Ly и лейкоза L-1210 по углеводной структуре клеточной поверхности: иммуноцитохимический анализ связывания лектинов. *Цитология и генетика*. 2011. № 2. С. 3 -9.

45. Волошин Н. А., Григорьева Е. А., Довбыш М. А. Использование методов лектиновой гистохимии в морфологии. *Таврический медико-биологический вестник*. 2004. Т. 7, № 4. С. 40 -41.

46. Куц О. Г. Лектини в імуноморфології. *Світ медицини та біології*. 2014. № 4 (47). С. 150-157.

47. Григорьева Е. А., Волошин Н. А. Использование методов лектиновой гистохимии для оценки динамики дендритных клеток тимуса. *Український морфологічний альманах*. 2011. Т. 9, № 3. С. 80-81.

48. Алешин В. Н., Лобанов В. Г., Минакова А. Д. Лектины: свойства, сферы применения и перспективы исследования. *Известия вузов. Пищевая технология*. 2005. № 1. С. 5 -7.

49. Григорьева Е. А., Волошин Н. А. Использование методов лектиновой гистохимии для оценки динамики дендритных клеток тимуса. *Український морфологічний альманах*. 2011. Т. 9, № 3. С. 80–81.

50. Луцик А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д. Лектины в гистохимии. Львов : Вища школа, 1989. 520 с.

51. Пошук продуцентів лектинів серед представників деяких родів дріжджів / Бабіч Т. В., Коваленко Е. О., Нагорна С. С. та ін. *Мікробіологічний журнал*. 2002 Т. 64, № 6. С. 41-45.

52. Поиск продуцентов лектинов среди дрожжей рода *Pichia* / Подгорский В. С., Коваленко П. А., Нагорная С. С. и др. *Мікробіологічний журнал*. 2002. Т. 64, № 3. С. 12-19.

53. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка, А. А. Тотолян, В. А. Черешнев. *Медицинская иммунология*. 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238.

54. Хайдуков С. В., Зурочка А. В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине. *Медицинская иммунология*. 2007. Т. 9, № 4-5. С. 373 - 378.

55. Хайдуков С. В., Зурочка А. В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные). *Медицинская иммунология*. 2011. Т. 13, № 1. С. 7-16.

56. Пат. UA 13282 U Спосіб виявлення В-лімфоцитів в гістологічних препаратах М. А. Волошин, О. Г. Куц; заявник і патентовласник ДВНЗ «Запорізький державний медичний університет» Міністерства освіти і науки України; заявка у 2005 09959; опубл. 15.03.2006.

57. Особенности иммунологических нарушений при глиомах головного мозга в период ремиссии / Лисяный Н. И., Гнедкова И. А., Бычкова С. А. и др. *Український нейрохірургічний журнал*. 2004. № 2. С. 55 - 63.

58. Пат. UA 44725 U Спосіб виявлення цитотоксичних лімфоцитів в гістологічних препаратах / М. А. Волошин, О. Г. Куц; заявник і патентовласник ДВНЗ «Запорізький державний медичний університет» Міністерства освіти і науки України; заявка у 2009 04890; опубл. 12.10.2009.

59. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.

60. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия Москва.: Медицина, 1990. 380 с.
61. Барановский Ю. Г. Современный метод определения гистотопографии галактоконъюгатов с помощью лектинов в раннем эмбриогенезе кожи человека *Буковинський медичний вісник*. 2003. № 3-4. С. 259-261.
62. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела . Львів : ПП «Кварт», 2005. 554 с.
63. Волошин Н. А. Использование методов лектиновой гистохимии в морфологии . *Таврический медико-биологический вестник*. 2004. Т. 7, № 4. С. 40-41.
64. Луцик А. Д. Лектины в гистохимии Львов : Вища школа, 1989. 140 с.
65. Карзов М. В. Развитие лимфоидных органов новорожденных после внутриутробного введения антигена *Проблемы аллергии*. Львов, 1983. С. 9-10.
66. Казначеев В. П. Соединительная ткань и стромально-паренхиматозные взаимоотношения при патологии. *Патология, физиология и экспериментальная терапия*. 1988. № 4. С. 79-83.
67. Волошин М. А. Лімфоцит – фактор морфогенезу. *Запорожский медицинский журнал*. 2005. № 2. С. 122.
68. Охорона праці. Терміни та визначення: ДСТУ 2293-99. [Чинний від 2000-01-01]. К.: Держспоживстандарт України, 1999. 21 с. (Національні стандарти України).
69. Стандартні норми мікроклімату виробничих приміщень: ДСН 3.36.042 99. [Чинний від 1999-12-01]. К.: МОЗ України, 1999. 10 с.
70. Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони: ГОСТ 12.1.005-88. [Чинний від 1989-01-01]. М.: ИПК Видавництво стандартів, 1988. 70 с.
71. Опалення, вентиляція і кондиціонування: СНіП2.04.05-91 [Чинний від 1996-06-27]. К.: ЗНІЕП, 1996. 89 с.

72. Природне і штучне освітлення: ДБНВ.2.5-28-2006., 2006-10-01. К.: МінБудУкраїни, 2006. 128 с.
73. Кодекс законів про працю України. Стаття 163 – Зі змінами, внесеними відповідно до закону № 3694-12 від 22.04.2008. Видача спеціального одягу й інших засобів індивідуального захисту. 62 с.
74. Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту: ДНАОП 0.00-4.26-96. [Чинний від 1996-10-18]. К.: Держнагляд охорон праці України, 1996 11 с.
75. Савчук О. М. Основи охорони праці: конспект лекцій в 2-х ч. Запоріжжя: Просвіта, 2000. 124 с.
76. Кудрієв Ю. І., Яворовський О. П., Шевченко А. М Гігієна праці: підручник ,за ред. НАН України, НАМН України, проф. Яворовського О. П. К: ВСВ «Медицина», 2011. 904 с.
77. Основні напрями державної політики України в галузі охорони навколишнього природного середовища, використання природних ресурсів та забезпечення екологічної безпеки: Постанова Верховної Ради України від 5 березня 1998 р. *Відомості Верховної Ради України*. 1998. № 38, 39. С. 248.
78. Шкідливі речовини. Класифікація і загальні вимоги безпеки: ДСТУ 12.1.007-76 [Чинний від 1977-01-01]. М.: ІПК Видавництво стандартів, 1976. 4 с.
79. Правила пожежної безпеки в Україні. Державний реєстр нормативних актів з питань пожежної безпеки (Реєстр НАПБ). Київ : Пожежінформтехніка, 2001. 238 с.
80. Шевченко А. М., Яворівський О. П. Гігієна праці. Вінниця: Нова книга, 2005. 840 с.
81. Правила пожежної безпеки України: ДНАОП 001-1.01-95. К.: МВС України, 1995. 167с.
82. Денисенко Г. Ф. Охрана труда : учебное пособие : Москва Высш. шк., 1985. 319 с.

83. ДСанПН 5.2.2.008-01 «Державні санітарні правила і норми влаштування, утримання загальноосвітніх навчальних закладів та організацій навчально-виховного процесу», затверджені постановою головного санітарного лікаря України від 14.08.2001 № 63. 49 с.