МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біології, географії і екології

Кафедра біології людини та імунології

ПАРАМЕТРИ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ТА БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ КУРЦІВ

Кваліфікаційна робота (проєкт)

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконала: студентка 211 М групи

Спеціальності 091 Біологія

Омел’яненко Іванна Андріївна

Керівник: к.б.н., доц. Шкуропат А. В.

Рецензент: к.б.н.,

Херсон – 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....3

РОЗДІЛ 1 ОПРАЦЮВАННЯ ЛІТЕРАТУРИ ТА ТЕОРЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ.....8

1.1. Історія паління, його проблема в Україні.....8

1.2. Хімічні компоненти тютюнового диму.....9

1.3. Шкода тютюнопаління людському організму.....12

1.4. Дія сигаретного диму на дихальну систему.....13

1.5. Вплив тютюнового диму на кровоносну систему та її органи.....15

1.6. Наслідки тютюнової залежності.....17

РОЗДІЛ 2 ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ КЛІТИН ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ТА БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ.....20

2.1. Характеристика зібраного контингенту.....20

2.2. Збір біоматеріалу та приготування мазків.....20

2.3. Використання програми ImageJ для дослідження морфологічних параметрів букального епітелію.....21

2.4 Збір периферійної крові для дослідження.....26

2.5. Техніка приготування мазків крові для подальшого дослідження 28

2.6. Застосування методу фарбування гістологічних препаратів за Романовським-Гімзою.....31

2.7. Підрахунок лейкоцитів та його значення у діагностиці.....32

2.8. Результати досліджень академії медичних наук Боснії та Герцеговини про вплив куріння сигарет на гематологічні параметри здорового населення.....36

РОЗДІЛ 3 ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....41

3.1. Результати дослідження клітинної морфології букального епітелію 41

3.2. Результати морфологічного дослідження формених елементів периферійної крові у курців. Підрахунок за лейкоцитарною формулою 45

ВИСНОВКИ.....48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....50

ВСТУП

Актуальність роботи. На сьогоднішній день тютюнопаління являє собою одну з найпоширеніших проблем людства. Хоч ми постійно стикаємось з інформацією про його згубний вплив на здоров'я, в Україні вже давно рівень паління набув маштабів пандемії. Кожного року залежними від сигарети стає 500 тис. людей молодого віку, почавши курити з 11 р. Паління має великий вплив на ступінь захворюваності людини. На протязі останніх років серцево-судинні хвороби (інфаркти, інсульти, гіпертонія) поміж населення виросли в три рази, а обсяг смертності через них збільшився на 45 %. Щороку приблизно 50 тис. осіб помирає від інфаркту міокарда. Було досліджено, що частота повторення інсультів в Україні перевищує в 11-13 разів аналогічний показник у розвинутих країнах Європи [1].

За відомостями Всесвітньої організації охорони здоров'я кожного року кількість завчасних смертей, спричинених тютюнопалінням, значно переважає над числом загиблих в автокатастрофах, померлих від вживання наркотиків, або померлих від СНІДу. [2].

На протязі багатьох століть люди курили тютюн. По території нашої країни тютюнопаління почало ширитись в кінці XVII– на початку XVIII століття. На даний момент у світі близько сотні мільйонів людей знаходяться під впливом цього виду токсикоманії.

Доказано, що шкідлива дія куріння розповсюджується не лише на самого курця, а також і на його оточення. В тютюновому димі є канцерогенні компоненти, через дію яких серед курців кількість хворих

на рак і людей з передраковими станами в 20 разів більша, ніж в інших [3].

У зв’язку з тим, що листки тютюну почали вбирати в себе з повітрям різні шкідливі елементи, за останні десятиріччя сам тютюн став набагато отруйнішим, ніж у XIX ст. І це при тому, що кількість цих шкідливих домішків і надалі збільшується
[4].

13 березня 2012 року в Україні було остаточно прийнято закон, який повністю забороняє рекламу сигарет. Закон вступив в силу 17 вересня 2012 року. Окрім реклами заборона розповсюджується ще й на всі можливі способи заохочення до придбання тютюнових виробів і стимулювання до їхнього продажу

В Україні з 4 жовтня 2012 року на пачках сигарет почали друкувати різні застереження щодо хвороб, які можуть бути викликані тютюнопалінням, також, разом із тим, почали зображувати фото-ілюстрації.

За останні 5 років в країні значно зменшилась частота щоденного куріння. За статистикою в 2005 році щоденно палили 62 % чоловіків (від 15 років і старше), а в 2010 вже 45 %. Кількість жінок-курців скоротилася майже вдвічі — з 17 % до 9 % [5].

Якщо спиратися на результати глобального опитування GATS 2017 щодо тютюнопаління в Україні у 2017 році, то ми отримаємо 23,0% (8,2 млн) дорослого населення України , що повідомили про вживання тютюну в теперішній час (вживання тютюнових виробів щоденно або рідше, ніж щодня) у будь-якій формі (40,1% чоловіків та 8,9% жінок).

В цілому 22,8% дорослого населення на даний момент курять тютюнові вироби (39,7% серед чоловіків та 8,8% серед жінок). Загалом 20,1% (7,2 млн) дорослого населення курять щодня (35,9% серед

чоловіків та 7,0% серед жінок). Серед щоденних курців тютюну 69,2% повідомили про те, що викурюють першу сигарету протягом 30 хвилин після пробудження.

Середній вік початку куріння для осіб віком 18–34 роки, які курили щодня, становить 16,8 років. 60,4% курців почали курити до досягнення 18-річного віку. З дорослого населення курять сигарети наразі 22,8% (39,6% серед чоловіків та 8,8% серед жінок).

Середня кількість сигарет, викурених протягом дня, становить 17,1 серед щоденних курців сигарет (18,2 для чоловіків та 12,6 для жінок). Серед щоденних курців сигарет 90,5% викурювали 10 і більше сигарет [10].

Мета роботи: дослідити особливості впливу тютюнопаління на організм людини, зокрема на стан клітин букального епітелію та периферійної крові людини.

Об’єкт дослідження:функціональний стан організму курців.

Предмет дослідження: морфологічний стан букального епітелію та периферійної крові курців.

Завдання дослідження:

1. Розглянути вплив шкідливих звичок на організм людини, а саме: тютюнопаління.
2. З’ясувати методи морфологічних досліджень клітин за допомогою програм вимірювання та обчислення.
3. Дослідити морфологічний стан клітин букального епітелію та провести кількісний аналіз формених елементів периферійної крові курців.

Методи дослідження: теоретичний аналіз наукової літератури та узагальнення отриманої інформації, дослідження морфологічної

характеристики клітин букального епітелію та периферійної крові курців, порівняння стану клітин курців та не курящих людей.

Практичне значення роботи розроблено окремі розділи навчально-методичного комплексу дисципліни «Гістології та основ ембріології». Отримані результати зміни морфології букального епітелію курців та некурців використовуються під час навчальної підготовки студентів факультету біології, географії та екології у структурі теми «Багатошаровий епітелій». Складено окремі завдання для самостійної роботи студентів з теми «Диференціювання, ріст старіння та загибель клітин», «Життєвий цикл клітини», «Вікові зміни тканин людського організму».

Новизна одержаних результатів полягає у детальному дослідженні впливу тютюнового диму саме на морфологію клітин букального епітелію та периферійної крові курців. Та використання результатів дослідження у структурі теми «Багатошаровий епітелій» для підготовки студентів факультету біології, географії та екології у дисципліні «Гістологія з основами ембріології».

Апробація одержаних результатів. Результати дослідження були представлені на Міжнародній інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки» у 2019 році.

Публікація. За результатами дослідження надрукована стаття «Кореляція між змінами морфології букального епітелію курців» (Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки, XXVI Міжнародна науково-практична інтернет-конференція. – м. Вінниця, 21 січня 2019 року. – Ч.6, с. 38 – 41).

Впровадження результатів науково-дослідної роботи затверджено на засіданні кафедри біології людини і імунології протокол № 1 від 27.08.2018 р.

Структура роботи. Робота складається із вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел. У роботі є 4 таблиці та 7 рисунків.

Список використаної літератури включає 55 найменувань.

РОЗДІЛ 1 ОПРАЦЮВАННЯ ЛІТЕРАТУРИ ТА ТЕОРЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Історія паління, його проблема в Україні

Історія паління тютюну почалась близько 500 років тому, коли Христофор Колумб ще у 1492 році відкрив Америку. Подальшому відкриттю європейцями багатьох нових рослин і в тому числі цього шкідливого зілля посприяла команда мореплавців, яка попри всі заборони капітана все ж провезла тютюн у Європу. У XVIII столітті вживання цього виду курива стало більш популярним.

Через деякий час матроси самі навчилися палити. Найперші плантації виникли саме в Іспанії. До певного моменту європейські країни гадали, що паління тютюну корисне, в результаті чого й почали застосовувати його у лікувальних цілях, а саме лікуванні зубних та головних болей. Але тоді ще ніхто не знав, що саме ці речовини тютюнового диму пошкоджують зубну емаль та викликають карієс. Під час лікування тютюном траплялись випадки отруєння. Були засвідчені навіть літальні наслідки. Саме це стало причиною відмови від нього, як лікувального засобу Хоч після невдалих експериментів у лікувальних властивостях тютюну досить швидко розчарувалися, його вживання не припиняється по сьогоднішній день [4].

У другій половині XVII століття замість того, щоб нюхати тютюн, його почали курити. Людовік XIII у 1680 році дозволяв продаж тютюну тільки аптекарям. [5].

Наприкінці XIV століття в Англії курців карали жорстокою смертю, напоказ виставляючи їхні голови з люлькою в роті. Але і такого роду розправи не завадили європейському населенню продовжувати палити [6].

В царській Росії тютюн з’явився ще за царювання Івана Грозного. Англійські купці, не зважаючи на існючу заборону, контрабандою

завозили його через Архангельськ та інші російські міста. А вже за царювання Петра I закон про заборону тютюнокуріння був скасований, оскільки він сам часто палив під час перебування у Західній Європі. Внаслідок цього паління стало ще більш розповсюдженим явищем по всій країні [5].

1.2. Хімічні компоненти тютюнового диму

Під час однієї затяжки відбувається неповне згорання та суха дистиляція висушеного листя тютюну в натуральному вигляді в незалежності від того, яким чином він викурюється – сигаретою, чи трубкою. [7].

Сигаретний дим за своїм складом та фізико-хімічними властивостями є аерозолем, який являє собою дисперсну систему, що складається з мілких, дрібних частинок (дисперсна фаза), зважених в газовому середовищі (дисперсійне середовище). Саме цей вільно-дисперсний аерозоль вважають одним із стійких . Проблема забруднення атмосфери тютюновим димом стоїть на рівні з іншими забруднювачами довкілля, так як з кожним роком його питома вага продовжує зростати. [8].

Сигаретний дим містить близько 4000 різних складників, із яких 40 є канцерогенами. Ще більша небезпека куріння полягає в тому, що в тютюновому димі також містяться радіоактивні елементи. З них особливо небезпечними є полоній-210 210 Po. Саме він має здатність накопичуватись у печінці, нирках, легенях та бронхах. Також радіоактивні елементи відкладаються у ендокринних залозах, лімфатичних вузлах і кістковому мозку. Частинки такого роду

затримуються в організмі роками і поступово завдають йому непоправну шкоду [9].

Існує 4 групи шкідливих речовин, які містяться у тютюновому димі та негативно впливають на організм курця:

- канцерогенні речовини;
- подразливі речовини;
- отруйні гази;
- отруйні алкалоїди.

Канцерогенні речовини: ароматичні вуглеводні, бензопірен, феноли, органічні сполуки (нітроза мін, гідразин, вінілхлорид, толуїдин та ні.), неорганічні сполуки миш'яку та кадмію, радіоактивні (полоній), олово та вісмут.

Подразливі речовини: ненасичений альдегід – пропеналь (акролеїн), олово та вісмут.

Отруйні гази: оксид вуглецю (II), сірководень, ціаністий водень та ін..

Отруйні алкалоїди: всього 12 (нікотин, норнікотин, нікотирин, нікотеїн, нікотимін та ін.) [10].

Таблиця 1.1

Перелік основних компонентів сигаретного диму

Речовина	**Кількість у димі однієї цигарки**
Монооксид вуглецю	10−23 мг
Нікотин	1−5 мг

оцтовий альдегід	0,5−1,2 мг
Ціановодень	150−300 мкг
Ацетон	100−250 мкг
Аміак	50−170 мкг
Акролеїн	50−100 мкг
Бензол	20−50 мкг
Формальдегід	5−100 мкг
2нітропропан	0,2−2,2 мкг
Гідразин	24−45 нг

Приблизно третину загальної токсичності тютюнового диму складає саме нікотин. Знаючи його фізичні властивості, нікотин можна назвати маслянистою прозорою рідиною з гірким смаком і неприємним запахом [11].

(доповнити тему з нікотином. Як саме він викликає звикання до куріння) Нікотин відноситься до наркотичних речовин, саме він викликає звикання до куріння і є одним із найнебезпечніших рослинних алкалоїдів.

Смертельна доза нікотину для дорослої людини становить 50-100 мг, а це – 2-3 краплі. Така кількість потрапляє у кров після викурювання 20-25 сигарет. Але курець не помирає, оскільки в організм вона надходить не відразу, а поступово.

Тютюновий дьоготь являється сильним канцерогеном. Ця смоляниста речовина має темно-коричневий наліт. Міцність сигарети залежить в основному від типу фільтру, а саме від щільності його волокон. Це пояснюється тим, що сорт тютюну один і вміст алкалоїдів в кожній сигареті однаковий. На відмінну від людей, які не палять, курці у

80 разів частіше хворіють на рак губи. В них у 12 разів частіше знаходять симптоми раку шлунку. І їм у 67 разів частіше діагностують рак легень ніж некурящим. Тютюновий дьоготь згубно впливає на структуру і функціональність піднебінних мигдаликів. Також він спонукає до розвитку тонзиліту і різних видів ангіни [40].

1.3. Шкода тютюнопаління людському організму

Тютюнопаління – це набута шкідлива звичка, в процесі якої відбувається вдихання диму тліючого, висушеного листя тютюну. Основний компонент тютюну – це нікотин, алкалоїд, який продукують рослини з родини пасльонових.

Хімічні речовини, що містяться в тютюновому димі, є небезпечними для здоров'я і життя людини. В цьому і заключається сенс негативного впливу куріння. Із п'ятидесяти речовин найбільш шкідливими є: нікотин, бензопірен, радіоактивний полоній-210, чадний газ, та висока температура самого тютюнового диму.

Кілька отруйних елементів шкодять організму на клітинному рівні. 43 компоненти викликають в людини рак [12].

Смертність від захворювання дихальних шляхів серед курців у 5 разів більша, порівняно із некурящими.

Велику шкоду тютюнове куриво несе саме маленьким дітям та підліткам. Не повністю сформований організм дитини потерпає від диму набагато більше на відмінну від організму дорослої особи. Діти, які проживають у постійно прокурених помешканнях, більш неспокійні, примхливі. Ці маленькі пасивні курці зазвичай втрачають апетит і погано сплять.

Найбільш трагічними жертвами сигарет є новонароджені малюки. Вагітні матері, що курять, частіше народжують дітей із фізіологічними вадами. Такі діти можуть появитись на світ з недостатньою масою тіла, чи взагалі померти при народженні, або в перші місяці життя [13].

1.4. Дія сигаретного диму на дихальну систему

При попаданні тютюнового диму до ротової порожнини курця присутні в ньому шкідливі речовини постійно відкладаються на поверхні зубної емалі. В першу чергу це стосується дьогтю. Внаслідок цього емаль жовтіє та руйнується. Крім того від куріння подразнюються слизові рецептори. Рефлекторним захистом організму від потрапляння диму є стимулювання цих рецепторів до вироблення слини. Ці частки розчиняються в слині, за тим ковтаються, потрапляючи до шлунково-кишкового тракту, негативно впливаючи тим самим на клітини травного каналу [11].

Курець має неприємний запах з рота, а його язик покривається сірою поволокою. Такі прикмети відзначають той факт, що діяльність шлунково-кишкового тракту порушена. [14].

Двадцять хвилин, це проміжок часу після паління, коли відбувається зниження еластичності слизової оболонки війчастого епітелію саме дихальних шляхів, що заважає виведенню вадливих компонентів з поверхні їхніх стінок. [14].

Довготривале куріння сигарет спричинює запаленню голосових зв’язок. Впливаючи на слизові шари гортані, дим потовщує голосові зв’язки, від чого і знижується тембр голосу в курця зі стажем. Голос

внаслідок цього стає низьким і хриплим. Найкраще це прослідковується в осіб жіночої статі [9].

У курильщиків достатньо часто (особливо вранці) відстежується кашель із виділенням слизу. Цей слиз зазвичай має темний колір. Через зниження еластичності легень і їхньої здатності до спадання на видиху виникає кашель, викликаючи легеневе розширення. Внаслідок цього розвивається задишка та ускладнене дихання. Якщо дихальні шляхи та легені курця знаходитимуться в стані тривалого, хронічного запалення, то відбудеться зниження їх спротиву гострим, хронічним захворюванням. Себто створяться сприятливі умови для таких хвороб, як: бронхіальна астма, запалення легень, хронічне обструктивне захворювання легень.

Курці погано відчувають смак солоного, солодкого, гіркого та кислого, оскільки дим тютюну гнітить чутливість смакових рецепторів. Пригнічуючи чутливість і нюхових рецепторів, він також створює проблеми з відчуттям запахів. Ця шкідлива звичка, крім вищевказанної кількості шкоди на організм, тягне за собою ще цілу купу інших проблем та труднощів для організму. [14]

1.5. Вплив тютюнового диму на кровоносну систему та її органи

Складники, що знаходяться у тютюновому димі, спроможні видообертати будову гладких м’язових клітин, що негативно позначається на їхній звичайній діяльності. Внаслідок цього синтез глікоаміноглікану стає меншим, а утворення фібронектину посилюється. За допомогою магнітно-резонансної аніографії можна виявити, що артеріальна стінка потовщена, а її жорсткість збільшена Дослідники стверджують, що саме ці переміни спонукають до прискореного

розвитку атеросклерозу. Можна навіть прослідкувати, на скільки помітні ці зміни, відштовхуючись від кількості викурених сигарет впродовж дня [17].

Дослідження показали, що в курящих осіб доволі змінений склад крові. Під час довготривалого куріння, кров курильщиків в'язкішає. Опинившись в одному з кров'яних русел, нікотин підвищує можливість крові до згортання. Дана картина і є причиною формування так званих тромбів. Внаслідок цих згустків підвищується ризик виникненню інфаркту міокарда.

Під час експериментів було встановлено, що при наявності отруйних елементів даного диму в крові відбувається збільшення лейкоцитів і зменшення еритроцитів. Вплив цих часток, як і більшість подібних отрут, перешкоджає нормальному кістковомозковому кровотворенню.

Одним із основних компонентів тютюнового диму являється чадний газ (CO). Потрапляючи в організм навіть в малих кількостях, він все одно шкодить і погано впливає на склад крові. При потраплянні утворюється карбоксигемоглобін, стійка сполука чадного газу з гемоглобіном. Карбоксигемоглобін заважає організму транспортувати кисень до тканин та органів, в результаті чого крові курця не вистачає кисню І, як наслідок, в людини відбувається гіпоксія (кисневе голодування). Цей паталогічний стан згубно позначається на обміні речовин та функціонуванні всіх органів і систем організму [6].

Щодо останніх, то опосередкованим свідченням залучення імунної системи і розвитку явищ запалення в процесі формування атеросклерозу у курців є збільшення рівня імуноглобуліну Е, фібриногену, абсолютного числа лейкоцитів (моноцитів), їх структурні зміни і

посилення здатності до адгезії, підвищена проникність ендотелію до альбуміну [8].

Попервах нікотин розбурхує дихальні осередки, а затим пригальмовує їх. При палінні посилюєься серцебиття, звужуються периферичні судини та підіймається кров'яний тиск. Після чого спостерігається звуження просвіту бронхів і настання гіпоксії клітин серця та нервової тканини. Від нестачі кисню в крові підвищується ступінь ліпідів та холестерину. За таких обставин розвивається атеросклеротичне ураження судин та серцева недостатність. Оболонки судин руйнуються, від того погіршується їх заповнення і прохідність. Тромби, формуючись в судинах, остаточно доповнюють загальну картину запальних процесів, які врезультаті закінчуюються некрозами. Найбільш уразливою частиною для таких процесів являються судини ніг. Уповільнений кровооббіг обумовлюється тим, що проходи пошкоджено, через які кисень та живильні ресурси не взмозі попасти до шкіри, м'язів та суглобів. [10].

В організмі людини є нервові центри, що відповідаютть за відчуття задоволення. Саме на ці осереддя впливає нікотин, потрапивши в організм. Таке довготривале заняття, як паління, зумовлює хронічне отруєння, назва якого – нікотинізм. Нікотинізм, як правило, знижує працездатність, а також разить серцево-судинну та дихальну системи. Смертельна доза нікотину міститься в двадцяти міцних сигаретах. Але протягом паління нікотин поступово надходить у кров. Ця смертоносна порція становить 1 мг на 1 кг маси тіла людини. Коли відбувається нарощення ознак отруєння, то спрацьовують захисні рефлекси, а саме: кашель, нудота, виділення слизу. Вони не взмозі перешкодити розвитку хронічного отруєння організму, так як їхня головна задача – це запобігти черговому накопиченню нікотину в крові. [10].

Цей вид токсину руйнує всі оболонки судинної стінки. Першим із ярусів підпадає під руйнацію ендотелій. Таке явище було задокументовано з допомогою експериментальних та патофізіологічних дослідів. Утворення підпухлості ендотелію віщує створенню внутрішньоклітинних вакуолей, які мають збільшений вміст лактату. У крові особи, яка викурила б дві сигарети, вже збільшилася б чисельність десквамованих клітин ендотелію (превентивна кардіологія). В немовлят, постійно оточених тютюновим димом, епітеліоцити гинуть впродовж першого місяця життя. Схожі наслідки утворюються також від кадмію та свинцю, які являються сполуками важких металів сигаретного диму. [8].

Жіноча ендокринна система також піддається негативному впливові паління. Цей, так званий, процес спричиняє часте виникнення кровотеч, створення аменореї та ранньої менопаузи, а іще знижує рівень естрогенів. [26].

1.6. Наслідки тютюнової залежності

Кашель. Спричиняють так званий «тютюновий» кашель краплі дьогтю, осівшого в легенях курця. Епітелій, що вкриває собою дихальні шляхи, запалюється від впливу речовин, які входять разом із дьогтем до складу тютюнового диму. Від того збільшується секреція слизу, обумовлюючи виділення мокроти при кашлі.

Хвороби серця. Внаслідок глобального попиту на сигарети в усьому світі, все більше тютюнозалежних людей стають жертвами різних серцево-судинних хвороб, широко розповсюджених на сьогоднішній день. На відмінну від некурящих осіб, в курців в 2 – 3 рази частіше трапляються інфаркти, передінфарктні стани, стенокардія, тощо. Від цього смертність у курящих людей набагато більша Статистика

показує, що курці живуть на 4,6 – 8,3 років менше, ніж некурящі, беручи, звичайно, до уваги той факт, коли саме людина почала курити.

Виразка шлунку. Переважно в курців із великим стажом найчастіше зустрічається хронічне захворювання шлунку та дванадцятипалої кишки. Більше 80% людей з цими захворюваннями становлять особи, які палять. Куріння ускладнює і сам процес лікування цих хвороб.

Але найбільшу згубу органам травлення нікотин наносить разом із паралельним вживанням алкоголю, прискорюючи процес виникнення виразок. Через це в рази підвищується ризик утворення раку шлунку, стравоходу, кишечника, печінки та підшлункової залози.

Страждає також сечовидільна система, виводячи з організму нікотин та інші шкідливі компоненти сигаретного диму. В жінок при довготривалому палінні грубішають риси жіночності, а саме: низький, «прокурений» голос, хворобливий колір обличчя, рання поява мімічних зморшок. Жовта емаль зубів та неприємний запах з рота доповнюють цей страшний, але ще не повний перелік.

За результатами досліджень ВООЗ залежність від нікотину виникає у 85% курців
[7].

У складі сигаретного диму містяться радіоізотопи. Один з них, а семе полоній-210, являється канцерогеном, що сприяє розвитку ракових пухлин. На відмінну від жителів сільської місцевості, жителі мегаполісів і промислових містечок, де рівень забрудненості вищий, ризик виникнення раку підвищений на 20 – 30 %. А особливо це стосується курців [15].

Потреба в нікотині, як фізична, так і психологічна прогресує стрімкіше на відміну від алкогольної залежності. [7].

Курець приймає в себе лише 25% диму. Інші 75% наповнюють повітря та навколишнє середовище, наносячи шкоду оточуючим. Це і називається «пасивне паління». В зачинених приміщеннях високий вміст сигаретного диму в повітрі є досить небезпечним. Курець, що скурює лиш кілька сигарет, створює таку концентрацію диму, що для «пасивного курця» вона може становити до десяти сигарет на добу [14].

РОЗДІЛ 2 ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ КЛІТИН ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ТА БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ

2.1. Характеристика зібраного контингенту

Букальний епітелій курящих людей досліджувався протягом 2017-2019 рр. В даному досліді взяли участь 11 курців та 10 некурців. Вікова категорія осіб, які погодились обслідуватись, сягала від 17 до 25 років.

Досвід куріння досліджуваних в середньому становив 1-5 років. Число викурених сигарет за добу в більшої кількості піддослідних не переважало за 10 сигарет.

На час експерименту у всіх учасників процесу були відсутні хронічні відхилення, проблеми із зубами, а також інфекційні хвороби.

Даних осіб напередодні обстеження було поставлено до відома з приводу ходу роботи. Прополоскавши ротову порожнину, кожен піддався взяттю препарату букального епітелію і периферійної крові з метою вивчення морфології даного шару.

2.2. Збір біоматеріалу та приготування мазків

На сьогоднішній день головним способом дослідження гістологічних одиниць зостається електронна та світлова мікроскопія, обширно залучаючись до клінічної та експериментальної галузі.

Вимірювання та обчислення ядерно-цитоплазматичного відношення клітин обумовлює одержанню об’єктивної інформації про їхнє звичайне становище, їхній стан під час експериментів та при паталогічних випадках. Саме морфометричні дані мікроструктур являються головними показниками – геометричні дані і число структур.

Морфометрія являє собою прийми та методи за допомогою яких можна виміряти геометричні показники гістологічних препаратів таких, як мазків та відбитків, а також об’єктів зображених на мікрофотографії. З обладнання можуть використовуватись окуляри мікрометру та морфо метричні сітки, які дозволяють визначити число структур, їх площину та діаметр та інші параметри.

Для нашого дослідження використовувались клітини букального епітелію курців зі внутрішньої поверхні щоки. Було задіяно 11 курців і 10 некурящих. Збір матеріалу проводили спеціальним дерев’яним шпателем.

Препарат приготовлений з епітелію щоки

Даний препарат являється тимчасовим. Збір матеріалу із внутрішньої поверхні щоки проводили шпателем. Далі зібрані клітини

переносили на чисте предметне скло, де їх висушили і зафіксували. Фарбували барвником метиленовим синім та роздивлялись під мікроскопом. із збільшенням окуляра х40.

2.3. Використання програми ImageJ для дослідження морфологічних параметрів букального епітелію

ImageJ це програма розроблена в National Institutes of Health, яка дає можливість робити вимірювання на електронних фотографіях. Вона дає можливість обчислити статистичні показники у піксельних значеннях, можна проводити різноманітні маніпуляції із контрастністю зображення, логічні та арифметичні операції. Також згладжувати або виявляти границі зображення, провести Фур`є аналіз, підвищувати різкість та безліч інших операцій, необхідних для дослідження. (рис 2.1).

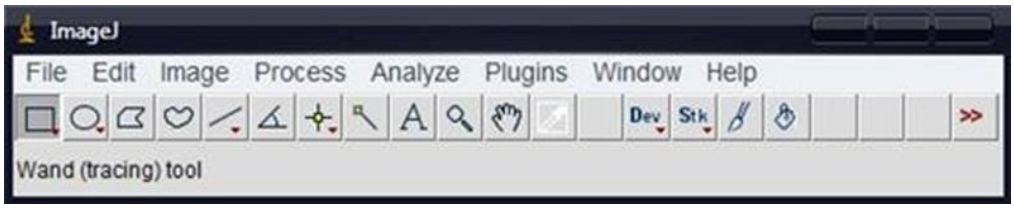

Рис. 2. 1 – Основне вікно програми ImageJ

Підтримуючи велику кількість зображень одночасно можна проводити геометричні перетворення: поворот, віддзеркалення, масштабування. Вимірювати кути, відстані.

У нашій роботі ми застосували програму ImageJ для виміру діаметру клітин та ядер букального епітелію.

Спершу ми відкрили потрібне нам зображення у меню File-Open, потім на відображеній панелі задач вибрали потрібний нам інструмент – лінійку (рис. 2.2).

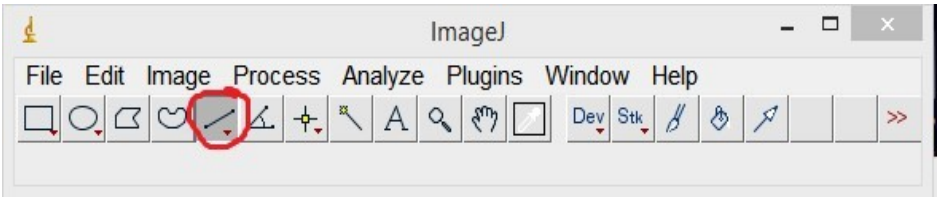

Рис. 2. 2 – Вибір масштабної лінійки.

Далі, натиснувши Shift привели виміри поперечного та повздовжнього діаметра клітини і вже потім ядра (рис. 2.4).

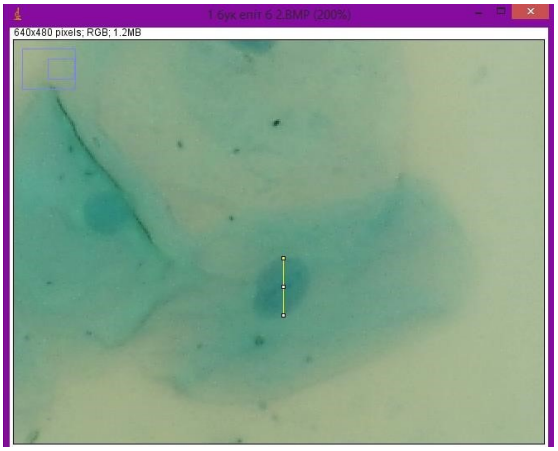

Рис. 2. 3 – Вимір поперечного діаметру ядра.

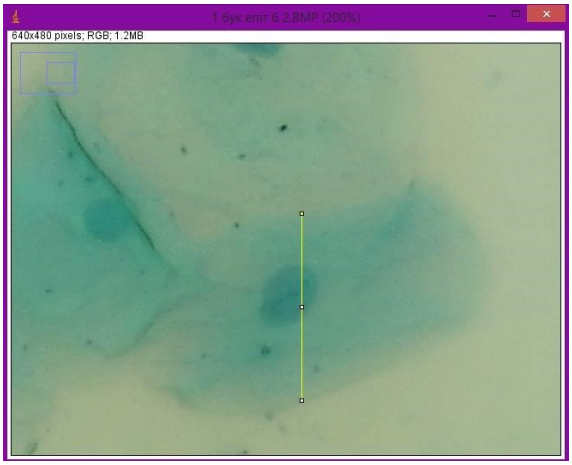

Рис. 2. 4 – Вимір поперечного діаметру клітини.

У меню Analize – Set Mesurements та у вікні, що відкрилося задали потрібні нам параметри: Fit Ellipse, Major, Minor, Angle, Centroid, Area, Perimetr (рис. 2.5).

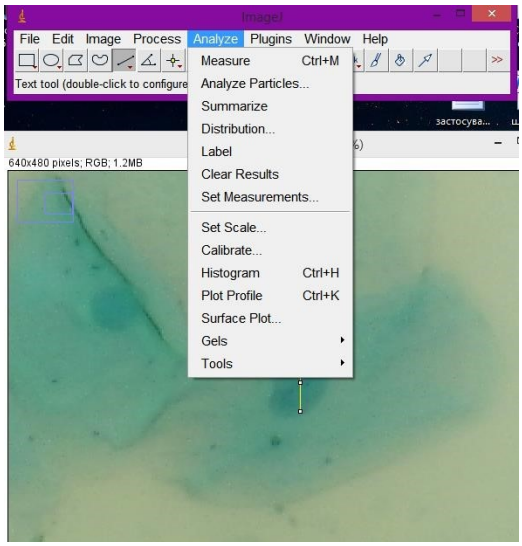

Рис. 2. 5 – На строчці меню Analize діалогове вікно.

Далі, натиснувши Analize – Measure у таблиці нам відкрились результати вимірювання в умовних одиницях.

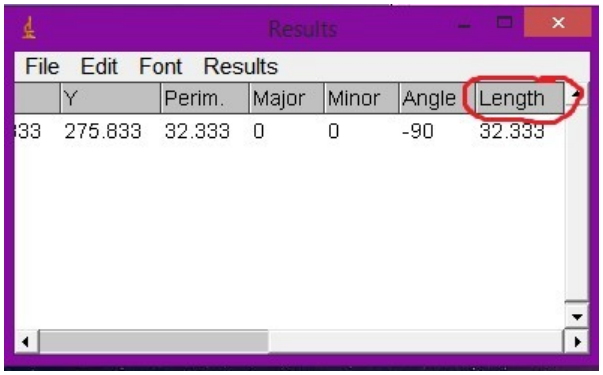

Рис. 2. 6 – Результати вимірювання.

Отриманні дані обчислювали вже у таблиці Excel, розраховуючи ядерно-цитоплазматичне співвідношення курців та контрольної групи.

Використовуючи інструменти програми ImageJ знайшли повздовжній та поперечний діаметр клітин та ядер. І дальше вже використовуючи формую знаходили саме ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

З відомим на поперечним та повздовжнім діаметрами розраховували об'єм клітини:

$$V_к = \frac{\pi a b^2}{6},$$

де Vк – об'єм клітини, а – поздовжні, b – поперечний діаметри клітини.

І таким же самим принципом знаходили об'єм ядер ($V_я$). Ядерноцитоплазматичне співвідношення визначають за формулою:

$$ЯЦС = \frac{V_я}{V_ц}.$$

де ЯЦП – ядерно-цитоплазматичне співвідношення, Vц

– об’єм клітини.

Але перед тим знайшли об’єм цитоплазми за цією формулою:

$$Vц = Vк - Vя .$$

Для клітин епітелію візуально оцінювали стан контурів.

Точний метод Фішера для таблиць 2х2 з застосуванням критерію $\chi 2$ знадобився для статистичної обробки результатів.

За допомогою нього з’ясували відмінність показників груп, які ми досліджували.

При значеннях $P \leq 0,05$ між двома величинами вважали різницю достовірною.

Далі операції математичного характеру проводили у програмах Microsoft Excel 2007 та „Statistica 6.0”.

2.4 Збір периферійної крові для дослідження

Відомо, що такі рідини організму як кров, тканинна рідина, лімфа є складом внутрішнього середовища організму, що контактують із всіма тканинами і клітинами тіла людини. Для внутрішнього середовища організму притаманний гомеостаз, або його сталість , що створює оптимальні умови для нормального функціонування (роботи) клітин. Потрапляння в кров необхідних речовин, та видалення шкідливих регулюється потрібними органами. По цій причині гематологічні дослідження набули широкого використання у медицині для діагностування захворювань та правильного їх лікування [16].

Для кожного досліджуваного використовувався індивідуальний стерильний пакет інструментів (скарифікатори, капіляри, мікропіпетки, предметні скельця, пробірки, ватно-марлеві тампони).

У нашому досліджені доцільно було використовувати саме периферичну кров. ЇЇ склад – плазма (55-60%), формені елементи 40-45% від загального об'єму. Загальний об'єм такої крові у дорослої людини становить 6-8%.

Сформовані клітини крові і є форменими елементами більшу їх кількість складають еритроцити, що містять у собі молекули гемоглобіну в виконують функцію перенесення вуглексилого газу та кисню. Інші – це лейкоцити, або їх ще називають білими кров'яними тільцями.

Більшу частину плазми складає вода (90-91%), є також білки (6,5 – 8%), та низькомолекулярні речовини (2%) [17].

Підготувавши робоче місце, на робочому столі, вкритому склом, розташували необхідні нам інструменти: (скарифікатор-спис, капіляр

Панченкова, предметні скельця), упаковка стерильних ватних або марлевих кульок, шліфоване скло для приготування мазків крові, капіляри на 0,02 мл, 5% лимонокислий натрій, стерильний пінцет.

Дослідник обов'язково одягнений у гумові рукавички, лабораторний захисний халат, маску. Приготували ємності зі спеціальним дезінфікуючим розчином, куди пізніше скидали використані інструменти і потім утилізували. Також нам знадобився простий олівець для підписування предметного скла з мазками від кожного досліджуваного.

Обробили IV палець лівої руки пацієнта спиртом, і зачекали, поки він висохне, щоб у разі змішування крові зі спиртом не було гемолізу еритроцитів. Зафіксувавши палець піддослідного великим і вказівним пальцем правої руки поставили спис перпендикулярно малюнку шкірних ліній, і у момент проколювання здавили його нігтьову фалангу. Прокол

здійснили глибиною приблизно 2-3 мм IV пальця лівої руки і одержали кров.

Після проколу капілярів кров виходила добре і рясно, що дало можливість правильно її відібрати і приготувати мазок на предметному склі, перед цим знявши першу краплю.

Палець пацієнта сильно стискати неможна, оскільки з кров'ю буде витікати тканинна рідина, що в подальшому зіпсує результати нашого дослідження.

2.5. Техніка приготування мазків крові для подальшого дослідження

Для правильного підрахунку формених елементів крові та вірної діагностики в подальшому – велику роль відіграє саме правильне приготування мазка [18].

Перед тим, як починати збір крові – необхідно підготувати предметні скельця, які ми будемо використовувати в подальшому. Незалежно від того, нові скельця, чи вже використані – їх необхідно замочити у мильному, або порошковому розчині в емальованому посуді приблизно на 10 годин.

Якщо скельця використовувалися раніше, і на них знаходиться старий мазок – необхідно їх ретельно відмити і потім прокип'ятити 10 хвилин у мильному розчині. Протягом довшого часу їх кип'ятити і використовувати алюмінієвий посуд неможна, оскільки це може призвести до їх помутніння і в подальшому їх вже неможна буде

використовувати. Після кип’ятіння у мильному розчині скельця добре сполоснули вже в чисті воді, і перевірили їх чистоту та нейтральність середовища за допомогою спиртового розчину фенолфталеїну. Рожевий колір відсутній – значить скло чисте і на ньому відсутні залишки мила. Після чого кожне скло витерли насухо.

Далі ці скельця на 30-60 хвилин занурювали у суміш Нікіфорова, яка складається із 96% етилового спирту та діетилового ефіру у співвідношенні 1:1, і вже потім їх зберігали у чистому закритому посуді.

Приготування мазка крові. Готували мазок крові за допомогою спеціального скла з рівним шліфованим краєм, вужчим на 2-3 мм від звичайного предметного скла.

Після того, як зробили прокол, знявши першу краплю крові, до наступної ми торкаємось чистим предметним склом на відстані приблизно 2 см від краю не задіваючи шкіру.

Після того, як крапля крові на склі – до її краю підносимо шліфоване скло, і нахиливши його під кутом 45° торкаємось шліфованим краєм так, щоб кров рівномірно розприділилась і дальше проводимо шліфоване скло до наступного краю предметного так, щоб у нас вийшов мазок рівномірної товщини із «щіточкою» на кінці.

Правильно приготовлений мазок має жовтувато-прозорий колір, оскільки клітини крові у ньому розташовані рівномірно одним шаром, що дає можливість їх добре роздивитись під мікроскопом. Товсті мазки крові ми не використовували, оскільки вони не придатні для дослідження. Клітини крові у ньому нагромаджені, розташовані у декілька шарів та деформовані.

Повністю висушений на повітрі мазок крові ми підписали простим олівцем у спеціально відведеному місці на предметному склі. Вказали дату та номер піддослідного. Для кожної людини готували по три мазки.

Фіксація. Фіксацію мазків крові потрібно проводити обов'язково, оскільки в подальшому ми будемо його фарбувати. Щоб на пофарбованому мазку крові залишились клітини, а не змились, перед тим їх потрібно прикріпити до скла фіксатором. Він проводить коагуляцію білків і таким чином клітини прилипають. Якщо її не проводити – зміниться морфологія лейкоцитів і відбудеться гемоліз еритроцитів, в результаті чого мазок буде непридатним для подальшого дослідження і все на цьому закінчиться.

Надалі висушені мазки помістили в спеціальну ємність, де знаходився фіксатор, після чого знову висушували на повітрі. Тут необхідно слідкувати за тим, щоб скельця з мазками не контактували між собою.

Фарбування. Для якісного забарвлення всіх клітинних структур формених елементів крові необхідно застосовувати суміш двох барвників кислого та лужного. Для кислого підійде еозин калію, для лужного – похідні метилену синього АЗУР-І і АЗУР-ІІ, та сам метилен синій.

В 1891 році петербурзький лікар Д. Л. Романовський розробив методику фарбування препаратів одночасно двома барвниками з кислою та лужною основою. Для кислої - еозин, для основної – метиленова синь. І сьогодні використовується цей принцип фарбування, але вже в різних модифікаціях, таких як: методи Романовського-Гімзе, Нюхті, Паппенгейма, Райта [18].

Органели клітини мають своє pH середовище, тому і забарвлюються протилежним барвником – кислі зв'язуються з лужним, де з'являється синє забарвлення, а лужні структури взаємодіють із кислими, де ми в результаті спостерігаємо вже рожевий, більш до червоного колір. У ядрах клітин знаходиться нуклеїнова кислота, і при

взаємодії із барвником з’являється синій колір у молодих клітин ядра набувають блакитного кольору.

Нейтрофільна зернистість сприймає як кислу, так і основну частину барвника, оскільки її середовище є нейтральним. РН середовище відіграє дуже важливу роль, це ще тісно пов’язано зі зміною білкового заряду що відбувається досить легко під впливом середовища.

Досить важлива деталь, на яку варто звернути увагу під час розчинення (розведення) самого барвника є безпосередньо нейтральне середовище самої води. Це є однією із обов’язкових умов, щоб не відбувалося нейтралізації кислого, або лужного елемента самого барвника, і щоб в кінцевому результаті отримати якісне забарвлення препарату. Також потрібно прослідкувати за тим, щоб посуд, у якому збираємось проводити фарбування препарату був ідеально чистим, і не забувати про повітря у кімнаті. Пари кислот, які можуть у ньому міститися теж можуть негативно вплинути на роботу.

Як варіант – фосфатний буфер забезпечує нейтральність середовища, і саме ним можна розбавити необхідну нам фарбу.

2.6. Застосування методу фарбування гістологічних препаратів за Романовським-Гімзою

Для забарвлення мазків крові під час експерименту, було застосовано метод Романовського-Гімзи. Дана фарба містить еозин та АЖУР-ІІ, останній являється сумішшю компонентів АЖУР-І. із метиленовим синім. Виготовляють фарбу у вигляді порошку. Також вона випускається у готовому вигляді, себто у флаконах із затемненим склом, де на поверхні кожного наклеєна етикетка із датою випуску та серією.

Перед використанням проходитиме процес розбавлення розчину фарби Романовського-Гімзе, бо розчин – що являється основним – сам по собі має високу концетрацію. Обов’язковою процедурою перед вживанням є перевірка готового, або приготовленого розчину барвника на активність. Опісля відбувається приготування різних концентрацій фарби в трьох циліндрах. Це все робиться з розрахунком: 1 крапля концентрованого барвника на 1 мл нейтральної дистильованої води, 2 краплі на 1 мл, 3 краплі на 1 мл. На протязі різного часу, а саме: 20, 25, 30, 35 і 40 хв було забарвлено кожним розчином 5 - 6 зафіксованих мазків крові.

Проміжок часу, за який забарвлювався мазок, зазначався на склі кожного із мазка.

Потім фарбу з мазків змили нейтральною дистильованою водою [18].

За нестачі штатива-контейнера, ми покривали фарбою висушені мазки на так званих «містках». Ми заливали мазок робочим розчином барвника, шар якого зробили товщим. Даний покрив становив 3-4 мл на мазок.

Змонтовані «містки» з двох скляних трубок, або піпеток однакового діаметра, чи довжини, з'єднувались між собою гумовою трубкою.

Трубки розташовувались паралельно, а відстань між ними сягала 5 - 6 см. Після того, як «містки» було покладено до емальованого лотка, фарбу з предметного скла позмивали проточною водою. Скельця з «містків» не знімали. Самі мазки висушили на повітрі у прямовисній поставі.

Критерії правильності забарвлення мазка крові при використанні методу фарбування за Романовським-Гімзою:

гранули в базофілах забарвились у темно-синій аж до фіолетового кольору, гранули еозинофілів стали рожевими, ядра нейтрофілів набули синього кольору, оскільки в них міститься нуклеїнова кислота.

2.7. Підрахунок лейкоцитів та його значення у діагностиці

Клітини крові, які містять ядро і є безбарвними називаються лейкоцитами. Саме вони ще й здатні до руху – тому можуть знаходитись і поза кров'яним руслом, де виконують захисну функцію.

Їх розприділили на декілька видів, які значно відрізняються своїм зовнішнім виглядом, та виконують зовсім різні функції. Одні із них для захисту утворюють необхідні антитіла, а інші фагоцитують збудники, або чужорідні агенти, які потрапили в організм і можуть завдати йому шкоди.

Класифікують за по будові на *гранулоцити* (обов'язково присутні гранули, та ядро різної форми) та *агранулоцити* (це ті, що без гранул) [40].

Види лейкоцитів. Лейкоцити розрізняються за походженням, функціями і зовнішнім виглядом. Деякі з лейкоцитів здатні захоплювати і перетравлювати чужорідні мікроорганізми шляхом фагоцитозу, а інші можуть виробляти антитіла.

За будовою лейкоцити поділяють на дві великі групи: зернисті, або **гранулоцити**, і незернисті, або **агранулоцити**. У перших є ядро різних форм, вони здійснюють фагоцитоз [2].

Паличкоядерні гранулоцити складають від 3 до 5% загальної кількості лейкоцитів. У них дуже мало азурофільних гранул, але більша кількість саме нейтрофільних. Ядро частіше на вигляд нагадує S, але

може бути і сегментоване. Крім зрілих також присутні юні (мета мієлоцити) до 0,5%, у яких ядро ще богоподібної форми.

Від 0,5 до 5 відсотків циркулюючих лейкоцитів становлять *еозинофіли.*У цитоплазмі таких лейкоцитів дуже добре помітні великі гранули забарвлені у рожево-помаранчевий колір. Саме ці гранули називаються лізосомами, всередині яких містяться відповідні ферменти з пер оксидазою та кислою фосфатазою.

Базофілів у крові дуже мало, і їх важко знайти розглядаючи мазок – лише до 0,5 відсоткв від всієї кількості кількості білих кров'яних тілець. Да і у крові вони циркулюють всього лише 12 – 15 годин. Його можна розпізнати по великій кількості темно-синіх з фіолетовим відтінком гранулах, за якими практично не видно ядра.

Т- і В-лімфоцити представляють собою клітину структуру імунної системи, і також присутні у кров'яному руслі. Їх кількість у крові 25-40 % від усіх лейкоцитів [19].

Моноцити є досить крупними клітинами з богоподібним ядром в якому можуть знаходитись 2 ядерця їх кількість у крові від 3 до 11%.

Цитоплазма сіруватого відтінку, базофільна. Містиль первинні лізосоми, які є азурофільними гранулами, менше вільних рибосом. Також присутні мітохондрії, фагоцитарні вакуолі і піноцитозні пухирці [19].

Трактувати змінення кількості лейкоцитів слід з урахуванням індивідуальної норми. Їх вміст лейкоцитів в крові не є постійним, а динамічно змінюється в залежності від часу доби і функціонального стану. Найменше лейкоцитів в крові вранці, але зазвичай їх кількість дещо підвищується до вечора, після прийому їжі, а також після фізичного та емоційного напруження. У здорових людей співвідношення

між усіма видами лейкоцитів досить постійне і зміна його служить ознакою різних захворювань.

У кожної людини лейкоцитрана норма є індивідуальною, яка взалежності від впливів чинників, стану організму та навіть від часу доби змінюється - і по цій причині існують допустимі межі її зсуву. Вранці їх кількість набагато менша у порівнянні із вечором, чи після вживання їжі. Також в результаті стресу їх кількість також підвищується. Якщо лейкоцитарне співвідношення виходить за межі допустимої норми – це може бути наслідком захворювання, та погіршення стану здоров'я.

Лейкоцитарна формула, або її ще називають **лейкограмою** представляє собою співвідношення видів лейкоцитів, які є у крові і позначається у відсотках [20].

У результаті дослідження лейкоцитарної співвідносності діагностують захворювання. До уваги беруться не тільки загальна кількість лейкоцитів, а і звертають увагу на їх види [21].

Таблиця 3.1

Лейкоцитарна формула крові здорової людини

Зернисті лейкоцити			Незернисті лейкоцити	
Граничні коливання (%)				
Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли	Лімфоцити	Моноцити
0 - 1	3 – 5	57 – 73	25 - 35	3 - 5
(в абсолютній кількості у 1 мм^3 крові)				
35 - 70	140 – 350	4200 – 5250	1750 - 2450	350 - 560

Процент лейкоцитарної співвідносності може варіюватися в залежності від самої хвороби. Тому в клініках широко поширене дослідження за лейкоцитарною формулою для правильного поставлення діагнозу хворому пацієнту [22].

2.8. Результати досліджень академії медичних наук Боснії та Герцеговини про вплив куріння сигарет на гематологічні параметри здорового населення

У дослідженні взяли участь п'ятдесят шість випробовуваних, 56 курців та 100 некурящих. Курці регулярно споживали 10-20 сигарет на день протягом принаймні 3 років. Повний аналіз клітин крові аналізували за допомогою повністю автоматичного гематологічного аналізатора CELL-DYN 3700.

Результати дослідження показали, що куріння сигарет має серйозні негативні наслідки для гематологічних показників (наприклад, гемоглобін - Hb, гематокрит - HCT, кількість лейкоцитів - WBC, кількість еритроцитів - RBC, MVC, MCH).

За цими результатами курці та некурці мали майже рівні значення загальної кількості еритроцитів. Статистично значущі більші значення еритроцитів були відзначені у курців чоловічої статі у порівнянні з курцями жіночої статі.

У дослідженні значення гемоглобіну були значно більшими у курців, ніж у некурящих, незалежно від статі, тоді як між цими двома групами

суб'єктів не було значної різниці у значеннях гематокриту. Однак у курців чоловічої статі було значно більше значень гематокриту у порівнянні з курцями жінок. Значне збільшення рівня Hb у групі курців корелює з попередніми дослідженнями [49].

У дослідженні, проведеному Лакшмі та співавт. рівень гематокриту та Hb був значно вищим у курців, а серед курців рівень еритроцитів значно збільшувався із збільшенням інтенсивності куріння [50]. Спостерігали, що концентрація гемоглобіну та гематокрит значно зростали у тих, хто курив більше 10 сигарет на день [51].

Вважається, що збільшення концентрації гемоглобіну відбувається через вплив окису вуглецю, і деякі вчені припускають, що підвищення рівня гемоглобіну в крові курців може бути компенсаторним механізмом. Оксид вуглецю зв'язується з Hb, утворюючи карбоксигемоглобін, неактивну форму гемоглобіну, яка не має кисневої здатності. Карбоксигемоглобін також зміщує криву дисоціації Hb в ліву сторону, що призводить до зменшення здатності Hb доставляти кисень до тканини. Щоб компенсувати знижену здатність доставляти кисень, курці підтримують вищий рівень гемоглобіну, ніж некурці [52].

Збільшення кількості еритроцитів і значення гематокриту у курців чоловічої статі можна пояснити тим, що тканинна гіпоксія, спричинена підвищеним утворенням карбоксигемоглобіну, призводить до посиленої секреції еритропоетину, збільшуючи тим самим еритропоез. Окис вуглецю з тютюнового диму також призводить до збільшення проникності капілярів, що зменшує об'єм плазми, що остаточно імітує стан поліцитемії, що характеризується збільшенням частки еритроцитів в об'ємі крові, що відображається також через збільшення значення гематокриту.

Асіф та ін. виявили збільшення MCV та зниження рівня MCH та MCHC у курців [53].

MCV вказує на розмір еритроцитів і наявність еритроцитів, менших або більших за нормальний розмір, означає, що людина має анемію; підвищений рівень MCV у дослідженні вказує на те, що суб'єкти можуть страждати мегалобластною, гемолітичною, перніціозною або макроцитарною анемією, як правило, спричиненою дефіцит заліза та фолієвої кислоти.

MCH - це середня вага гемоглобіну, який присутній всередині одиничних еритроцитів, тоді як MCHC позначає кількість гемоглобіну в певному обсязі «упакованих» еритроцитів або клітин.

Дане дослідження встановило значно більшу кількість лейкоцитів у курців обох статей у порівнянні з некурящими. Крім того, значення рівня лейкоцитів були статистично достовірно більшими у курців чоловічої статі.

Збільшення загальної кількості лейкоцитів, яке спостерігається у курців, подібне до попередніх досліджень. Хоча точний механізм того, як куріння збільшує кількість лейкоцитів, до кінця не з'ясований, індукований курінням лейкоцитоз має кілька факторів, які можна пояснити різними способами.

Деякі автори стверджують, що збільшення кількості лейкоцитів може бути наслідком вивільнення нікотином катехоламінів та стероїдних гормонів з ядра надниркової залози. Відомо, що підвищення рівня деяких ендогенних гормонів, таких як адреналін та кортизол, призводить до збільшення кількості лейкоцитів [55]. Крім того, подразнююча дія тютюнового диму на дихальне дерево із виниклим запаленням може також сприяти збільшенню кількості лейкоцитів. Встановлено, що запальна стимуляція дихальних шляхів індукує збільшення маркерів запалення в циркуляції, особливо цитокінів, які впливають на кількість лейкоцитів.

Найкраще охарактеризовані реакції мікроциркуляції на запалення включають знижену вазомоторну функцію, знижену капілярну

перфузію, адгезію лейкоцитів і тромбоцитів, активацію каскаду згортання та збільшення тромбозів, збільшення судинної проникності та збільшення швидкості проліферації крові та лімфатичних судин. Відповідь на запалення - активація різних клітин, які зазвичай циркулюють у крові (лейкоцити, тромбоцити) або існують у стінках судин (ендотеліальні клітини, перицити) або в навколосудинному просторі (жирові клітини, макрофаги).

Адгезія лейкоцитів на ендотелії судин є передвісником запальних процесів. Лейкоцити пов'язані з ендотелієм залишаються інертними, після чого вони можуть мігрувати в міжклітинний простір між цими самими клітинами. Весь процес адгезії лейкоцитів на клітинах ендотелію регулюється послідовною активацією різних сімейств молекул адгезії, які розташовані на поверхні клітини і сприяють взаємодії клітин, фіксації клітин на стінці судин та їх руху. Лецитиноподібні адгезійні глікопротеїни, так звані селектини, опосередковують рух лейкоцитів, тоді як тверда адгезія і подальша транс-ендотеліальна міграція лейкоцитозу опосередковується взаємодією інтегрину (CD11 / CD18, VLA-4), розташованого на лейкоцитах і молекулах імуноглобулінової адгезії на клітинах ендотелію (ICAM-1, VCAM-1).

Можливо, що збільшена кількість лейкоцитів у периферичній крові здорових курців пов’язана з явищем руху клітин з інших лімфоїдних органів у периферійній крові або що куріння зменшує здатність адгезії цих клітин до клітин ендотелію судин, що веде до до загального збільшення кількості клітин крові.

Повідомлення про диференційоване дослідження крові, пов’язане з курінням, не узгоджуються. Аула та Кадір продемонстрували значне збільшення лейкоцитів, нейтрофілів, еозинофілів, базофілів, лімфоцитів та моноцитів у курців щодо контрольної групи некурящих. З іншого

боку, Kastelein et al. не встановили суттєвої різниці у значеннях нейтрофілів у курців середнього віку та некурців [56].

Такі ж результати продемонструвало і наше дослідження, де значення гранулоцитів, що включають нейтрофіли, не суттєво зросли. Однак, на відміну від дослідження Kasteleinaet al., Яке встановило у курців статистично достовірно більші значення базофілів, лімфоцитів та моноцитів, дослідження не підтвердило впливу куріння на згадані параметри білої крові у здорових добровольців.

Передбачається, що атерогенна дія куріння сигарет може бути частково опосередкована лейкоцитами. Число лейкоцитів представляє, можливо, найкорисніший і найпростіший біомаркер пошкодження ендотелію. Наявність хронічно збільшеної кількості лейкоцитів у курців сприяє патогенезу захворювань, пов'язаних з курінням, особливо ішемічної судинної хвороби, враховуючи, що збільшення агрегації лейкоцитів спричинює оклюзію мікроциркуляції та пошкодження судин. Кілька досліджень підтвердили, що кількість лейкоцитів є незалежним провісником атеросклерозу та серцево-судинних захворювань [54]. Велика кількість лейкоцитів у курців, особливо у чоловіків, вказує на те, що вони мають вищий ризик розвитку атеросклерозу та серцево-судинних захворювань у порівнянні з некурящими.

З цього дослідження ми можемо зробити висновок, що постійне куріння сигарет збільшує кількість еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, гематокрит, кількість лейкоцитів, середній об'єм корпускули та середню концентрацію корпускулярного гемоглобіну, і ці зміни можуть бути пов'язані з більшим ризиком розвитку атеросклерозу, поліцитеміавери, хронічної обструктивної захворювання легенів та / або серцево-судинні захворювання.

РОЗДІЛ 3 ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати дослідження клітинної морфології букального епітелію

Отримання та дослідження живих клітин букального епітелію відноситься до інвазивних методів дослідження. І дослідження саме таких препаратів дають змогу оцінити стан організму вцілому. Букальний епітелій є легкодоступний, його можна просто зібрати, візуальним методом оцінити стан його клітин і зробити висновок про стан організму [23].

Букальний епітелій є багатошаровим та незроговилім. Містить базальний шар, де утворюються нові клітини. І поступово піднімаються вгору з одночасною диференціацією, а верхні клітини старіють та відлущуються. Таким чином і відвувається його оновлення [46].

Букальний епітелій є багатошаровим та незроговилім. Містить базальний шар, де утворюються нові клітини. І поступово піднімаються вгору з одночасною диференціацією, а верхні клітини старіють та відлущуються. Таким чином і відвувається його оновлення [48].

До канцерогенно-мутагенного фактору також відносять сигаретний дим. Клітини букального епітелію контактують як із зовнішнім, так із внутрішнім середовищем, а це значить, що вони безпосередньо

контактують і з тютюновим димом який несе негативний вплив на їхню морфологію.

При збільшення окуляра на 400 досліджевали 10 полів, де робили підрахунок тисячі клітин.

Робили обчислення ядерно-цитоплазматичного співвідношення для того, щоб дослідити морфологію та її особливості клітин курців, оцінювали контури клітин (обривисті, пелюсткоподібні, плавні), та дивились чи наявний пікноз ядра (табл. 4.1).

Після того, як дослідили мазки букального епітелію курців та контрольної групи вияснили, що у полі зору мікроскопа нараховувалось від 4 до 8 клітин у 81,8% мазків курців та 75% препаратів некурців.

У 18,35% курців та 25% з контрольної групи спостерігали від 1 до 3 кілтин у полі зору. Від 3 до 15 клітин у полі зору – це норма, а це значить, що всі піддослідні мали нормальну кількість клітин, але у ході дослідження серед курців нараховували більше клітин, ніж у некурців.

Таблиця 4.1

Морфологічна оцінка клітин букального епітелію курців та некурців

Характеристика	**Курці**	**Некурці**
Кількість клітин у полі зору		
1-3	18,2%	25%
4-8	81,8%	75%
Пікноз ядра		
Пікноз наявний	36,4%	50%

Продовження табл. 4.1

Пікноз відсутній	63,6%	50%

Особливості контурів клітини		
Плавні	36,3%*	100%
Пелюсткоподібні	36,3%*	0
Обривісті	27,3%*	0
ЯЦП	0,016ум.од.	0,024ум.од.
Діаметр ядра	31,9ум.од.	34,68ум.од.
Діаметр клітини	165,03ум.од.	193,52ум.од.

Примітка: * - статистично достовірна відмінність (P<0,05) між обстежуваними групами

Контурна характеристика клітин:

Курці плавні – 36,3%

Некурці плавні – 100%

Серед курців:

Обривисті контури - 27%.

Пелюсткоподібні – у 36,3%.

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення:

Курці – 0,016 ум. од.

Некурці – 0,024 ум. од.

При збільшенні деконденсації активного хроматину збільшується активність клітни та об’єм її ядра.

У метаболічноактивних клітин ядро більше, порівняно із неактивними. Співвідношення об’єму ядра клітини з цитоплазмою називається **ядерно-цитоплазматичним співвідношенням**. Цей показник також залежить від функціональної активності клітини [41].

Якщо у клітинах спостерігається збільшений хромосомний набір це може свідчити про їхній злоякісний стан. У цьому випадку також звертають увагу на ядерно-цитоплазматичне співвідношення клітин [40].

Вміст екзогенних включень в цитоплазмі клітин та його дослідження.

Включення – це компоненти цитоплазми, які в ній не обов'язково знаходяться. Можуть бути як присутніми, так і відсутніми. В залежності від умов, я яких клітина знаходиться їх кількість може збільшуватись. Самі вони не мають чіткої будови та розмірів.

Коли їх у клітині накопичується досить велика кількість – сама тканина загалом може змінювати колір. Це явище може бути тимчасовим, або постійним.

У досліджуваних мазках клітин букального епітелію забарвлення цитоплазми звичайне світло-блакитне. Включень не знайшли.

У результаті морфологічного дослідження клітин епітелію ми з'ясували, що під час паління клітини курців набули меншого ядерно-цитоплазматичного співвідношення на відмінну від клітин, некурців, які не контактують із тютюновим димом. Також клітинах курців були ми помітили, що їх краї пелюсткоподібні та обривисті та менша кількість клітин була з ядрами на різному ступені кіріопікнозу.

Для курців, яких ми обстежили характерна середня інтенсивність паління, а саме приблизно 10 сигарет на добу та не великий стаж куріння – від одного до п'яти років. Спираючись на наші дані можна сказати, що цей стаж та інтенсивність не викликають сильно помітних змін у морфології клітин букального епітелію. Але присутні зміни у ядерно-цитоплазматичному співвідношенні та загальному вигляді контурів (країв) клітин. І саме ці показники вказують на негативну дію сигаретного диму навіть при такому стажі та інтенсивності паління.

3.2. Результати морфологічного дослідження формених елементів периферійної крові у курців. Підрахунок за лейкоцитарною формулою

Саме із застосуванням імерсійної мікроскопії ми виконували підрахунки формених елементів крові за лейкоцитарною формулою. Під час роботи нам знадобилося спеціальна імерсійна олія, краплину якої ми наносили безпосередньо на сам готовий для дослідження препарат. Спеціальний об’єктив, позначений білою полоскою, повільно опустили у краплину олії на препараті. Далі шляхом регулювання макрогвинта та мікрогвинта навели чіткість на зображенні для того, щоб добре роздивитись клітини крові.
(рис. 3.7).

Рис. 3.7 – Іммерсійна мікроскопія.

Проводили підрахунок лише цілих клітин (табл. 4.2). У мазку находили такі види лейкоцитів, як лімфоцити, моноцити, базофіли, еозинофіли та нейтрофіли. З нейтрофілів: сегментоядерні та паличкоядерні. Також у мазку зустрічались незрілі гранулоцити, плазматичні клітини. Їх ми бакож брали до уваги у розрахунках за лейкоцитарною формулою [21].

Також ми оцінювали кількісний склад формених елементів крові. Це один із важливих критеріїв дослідження морфології крові. За допомогою цього дослідження дає змогу вчасно помітити патологічні процеси в організмі, які ще тільки знаходяться на початковому стані. Якщо під час дослідження виявляють відхилення від норми – це значить, що організм не функціонує нормально і йому властиві порушення.

Спостереження за певним видом лейкоцитів, показники яких відхилені від норми – дають можливість діагностувати хворобу.

Таблиця

4.2 **Середнє значення вмісту різних видів лейкоцитів у курців та некурящих людей**

Вид клітин крові	**Курці**	**Некурці**	**Норма**
Нейтрофіли п/я	3,72%	6,1%	1-6%
Нейтрофіли с/я	47,27%	38,25%	47-72%
Лімфоцити	24,63%	36,3%	19-37%
Моноцити	2,54%	2,25%	3-11%
Базофіли	1,18%	0,5%	0,5-1,0%
Еозинофіли	4,72%	0,5%	1,5-5,0%
Лейкоцити	5,90%	7,2%	7,0-7,3%

Досліджувані групи не мали захворювань під час збору біоматеріалу. Показники відсоткового вмісту лейкоцитів знаходяться у межах норми. Але наші підрахунки по лейкоцитарній формула показали, що у курців порівняно із контрольною групою некурців спостерігалось менше паличкоядерних нейтрофілів, але у них спостерігалася більша кількість сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів та базофілів.

Ці показники також вказують на негативну дію сигаретного диму га організм людини, яка знаходиться ще на початковій стадії залежності від паління.

ВИСНОВКИ

У даній роботі розглянули досить актуальну на сьогодні проблему – тютюнопаління. Починаючи з її історії і дійшовши до глобальної шкоди, яку вона приносить на сьогоднішній день.

1. З’ясовані морфологічні проблеми показники букального епітелію, а саме: ядерно-цитоплазматичне співвідношення, у полі зору підрахували їх кількість, оцінено стан контурів і наявність каріопікнозу. Для периферійної крові підрахована кількість формених елементів за лейкоцитарною формулою.
2. За допомогою проаналізованих морфологічних параметрів з’ясували, що під час тютюнопаління у клітинах букального епітелію ядерно-цитоплазматичне співвідношення менше, ніж у клітин букального епітелію людей, які не палять.
3. У клітинах букального епітелію курців виявили обривисті та пелюсткоподібні краї, також були присутні ядра на різних стадіях каріопікнозу.
4. За результатами аналізу підрахунку форменних елементів за лейкоцитарною формулою у крові курців спостерігалась менша кількість паличкоядерних нейтрофілівта більше сегментоядерних нейтрофілів, порівняно із показниками крові не валящих. За результатами дослідження академії медичних наук встановлено, що зі збільшенням інтенсивності паління концентрація гемоглобіну та гематокриту зростає, і саме це явище пояснюється як компенсація організмом нестачі кисню. Встановлено, що зміни в показниках крові людини, яка палить, частіше всього свідчать можливі виникнення захворювань, спричинених такою шкідливою звичкою.

5. При тому, що у досліджуваної групи курці із середньою інтенсивністю паління, а саме 10 сигарет на добу та невеликим стажем (від 1 до 5 років) показники периферійної крові та букального епітелію відображають негативний вплив паління.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Іващук Л. Ю. Валеологія: навч. посібник / Л. Ю. Іващук, С. М. Онишкевич. – Тернопіль: Навчальна книга – Богдан, 2010. – 400 с.
2. Сахарук Н. А. Микробная флора полости рта в норме и патологии. Морфология грибов рода candida / Н. А. Сахарук // Вестник ВГМУ. — 2008. — № 2. — С. 137—143.
3. Грушко В. С. Основи здорового способу життя для всіх і кожного: посіб. з валеології / В. С.Грушко, С. І. Ситник. – Тернопіль,1999. – 368с.
4. Короткіх Л. В. Профілактика та запобігання тютюнопаління / Л. В. Короткіх. – Луганськ, 2008. – 255 с.
5. Петрушанко Т. О. Зміни епітеліоцитів ясен та слизової оболонки щік при наявності катарального гінгівітуу вагітних / Т. О. Петрушанко, Л. Й. Островська, Н. В. Гасюк // СМБ. — 2009. — № 4. — С. 131—137.
6. Калаев В. Н. Частота встречаемости клеток с морфологически аномальными ядрами в буккальном эпителии человека при разных способах окрашивания /В. Н. Калаев, В. Г. Артюхов, М. С. Нечаева // Цитология. —2012. — Т. 54, № 1. — С. 78—84.
7. Казьмин В. Д. Вынужение курить/ В. Д. Казьмин. – М.: Знание, 1991. – 64 с.
8. Желібо Є. П. Безпека життєдіяльності: курс лекцій / Є.П. Желібо, А.І. Чмир, В.С. Троян, Є.О. Савінов. – Ірпінь: Академія ДПС України, 2001. – 356 с.
9. Головацький А. С. Анатомія людини: підручник : у 3 т. Т. 1 /А. С. Головацький, В. Г. Черкасов, М. Р. Сапін та ін. – Вінниця : Нова Книга, 2013. – 368 с.
10. Бригас А. Кишеньковий вбивця / А. Бригас// Твоє здоров'я – 2015.- №5. – С. 20
11. Пархотик И. И. Как сохранить здоровье/ И. И. Пархотик К.: Наукова думка, 1981. – 243 с.

12. Микроядерный тест на буккальных эпителиоцитах / В.В. Юрченко и др. // Полиорганный микроядерный тест в экологогигиенических исследованиях. М.: Гениус, 2007. С. 220–267.
13. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // Медицинская генетика. 2007. Т. 6 (11). С. 3–11.
14. Денисова В. В. Экология / В.В. Денисов. – М.: ЧКЦ «МарТ»; Ростов н/Д: Издательский центр «МарТ», 2006. – 768 с.
15. Елисеев В. Г. Атлас микроскопического и ультрамикроскопического строения клеток, тканей и органов / Елисеев В. Г., Афанасьев Ю. И., Котовский Е. Ф. – М.: Медицина, 1970. – 400 с.
16. Hutc Hings R. T. A Colour Atlas of Human Anatomy / Thrid Editiom. R. M. H. McMinn, R. T. Hutc Hings, J. Pegingion, P. Abrahams. – Mosby-Wolfe. – 1993. – 359 p.
17. Камышникова В. С. Методы клинических лаораторных исследований / под ред. проф. В. С. Камышникова – 5-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2011. – 752 с.
18. Головацький А. С. Анатомія людини: підручник : у 3 т. Т. 1 /А. С. Головацький, В. Г. Черкасов, М. Р. Сапін та ін. – Вінниця : Нова Книга, 2013. – 368 с.
19. Луцика Б. Д. Клінічна лабораторна діагностика: Навч. посіб. Для мед. ВНЗ IV рів. акред./ За ред. Б. Д. Луцика. — Медицина. — 2011. — 288с.
20. Батуев А.С. Малый практикум по физиологии человека и животных / Батуев А.С., Никитина И.П., Журавлев В.Л., Соколова И.Н. – СПБ.: Из-во Петербургского ун-та, 2001. – 38 с.

21. Івонов І. А. Фізіологія крові та внутрішнього середовища: методичні рекомендації / І. А. Івонов, Т. Є. Комісова, В. Ф. Слюсарєв, С. О. Шаповалов. – Х. : ЧП, 2017. – 48 с.
22. Хухліна О. С. Тютюнопаління та його шкідливі наслідки / О. С. Хухліна, І. В. Дудка // Дайджест – 2010. - №2. – С.458 – 502
23. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення //[Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://studfiles.net/preview/2283019/
24. Зинчук В. В, Нормальная физиология. Краткий курс : учеб.пособие / В. В. Зинчук, О. А. Балбатун, Ю. М. Емельянчик; под ред. В. В. Зинчука. – 3-е изд., стер. – Минск : Вышэйшая школа, 2014. – 431 с.
25. Логинова Н. К. Функциональная диагностика в стоматологии: теория и практика / Н. К. Логинова, Е. К. Кречина, С. Н. Ермольев и др.; под ред. Н. К. Логиновой. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2007. – 120 с.
26. Sobotta A. Atlas of Human Anatomy. 2 vol. Set / A. Sobotta – Lippincott Williams & Wilkins. 2001. – 833 p.
27. Привес М. Г. Анатомия человека / Привес М. Г., Лысенков Н. К., Бушкевич В. И. – СПб.: Издательство дом СПб МАПО, 2004. – 720 с.
28. Зербіно Д. Д. Патоморфологія та гістологія: атлас / Д. Д. Зербіно, М. М. Багрія, Я. Я. Бондара, В. А. Діброви. – Вінниця : Нова Книга, 2016. – 800 с.
29. Осипова В. Н. Возрасная физиология и психофизиология: учебное пособие / В. Н. Осипова. – М. : МГИУ, 2010. – 190 с.
30. Петленко В. П. Основи валеології. Книга перша: навч. посіб. / В. П. Петленко. – 1-ше вид. – 1998. – 433 с.
31. Воробьев В. И. Структура дезоксирибонуклеотида. Метаболизм клеточного ядра и ядерно-цитоплазматическое соотношения / В. И. Воробьев. – Тез. Докл. Киев. – 1970. С. 124-125.

32. Терехов В. Л. Куріння або здоров’я – вибирайте самі / В. Л. Терехов// Академічний простір - 2014. - № 8.С. 7
33. Корсаков А. В. Многофакторное техногенное загрязнение окружающей среды как фактор риска формирования цитогенетических нарушений у населения / А. В. Корсаков // Вестник Брянского государственного технического университета. – 2014. – №2 (42). – С. 155 – 160.
34. Грузова М. Н. Экстрахромосомная ядерная ДНК в оогенезе // Метаболизм клеточного ядра и ядерно-цитоплазматическое соотношение/ М. Н. Грузова. – Тез. Докл. Киев. – 1970. – С. 229-230.
35. Тенкова Л. Л. Почему это опасно/ Л. Л. Тенкова, Н.Б. Славков. – М.: Просвещение, 1989. – 154 с.
36. Демина К. Ю., Гришилова Е. Н., Бражникова А. Н. Влияние фотодинамической терапии на гемодинамику в тканях пародонта при лечении хронического генерализованного пародонтита // Функциональные исследования. – 2014. – № 10–6. – С. 215–221.
37. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
38. Архіпова Г. І. Вплив тютюнового диму на організм людини / Г. І. Архіпова, Ю. С. Макаренко // Вісник НАУ - 2012. - № 3.С. 54-56 4. Атаман О. В. Патофізіологія органів і систем в 2 т. / О. В. Атаман. – Вінниця : Нова Книга, 2015. – 528 с.
39. Тодоріко Л. П. Наслідки тютюнопаління / Л. П. Тодоріко // Дайджест – 2014. - №3. С. 6
40. Камышникова В. С. Методы клинических лаораторных исследований / под ред. проф. В. С. Камышникова – 5-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2011. – 752 с.

41. Пальцев М. А. Сигнальные молекулы в буккальном эпителии: оптимизация диагностики социально-значимых заболеваний / М. А. Пальцев, И. М. Кветной, В. О.Полякова // Молекулярная медицина. — 2012. — № 4. —С. 18—23.
42. Глобальне опитування дорослих щодо вживання тютюну (Global Adult Tobacco Survey – GATS) (укр. мова). – Київ, 2017. – 240 с.
43. Елисеев В. Г. Атлас микроскопического и ультрамикроскопического строения клеток, тканей и органов / Елисеев В. Г., Афанасьев Ю. И., Котовский Е. Ф. – М.: Медицина, 1970. – 400 с.
44. Лютинский С. И. Патологическая физиология животных : учеб. Для студентов высших учебных заведений / С. И. Лютинский. – 3е узд., испр. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 560 с.
45. Бабский, Е. Б. Физиология человека : учеб пособие для мед. инст. / Е. Б. Бабский, Г. И. Косицкий, Б. И. Ходоров под ред. Г. И. Косицкого. - М. : Книга по требованию, 1985. - 487 с.
46. Трикутько О. П. Куріння і здоров’я / О. П. Трикутько// Природа – людина – здоров’я – 1991. - №4. – С. 32
47. Кубарко А. И. Нормальная физиология : учебник. В 2 ч. Ч. 1 / А. И. Кубарко, А. А. Семенович, В. А. Переверзев; под ред. А. И. Куарко. – Минск : Вышэйшая школа, 2013. – 542 с.

48. Shah BK, Nepal AK, Agrawal M, Sinha AK. The effects of cigarette smoking on hemoglobin levels compared between smokers and non-smokers. Sunsari Technical College Journal. 2012;1(1):42–4.
49. Lakshmi AS, Lakshmanan A, Kumar GP, Saravanan A. Effect of Intensity of Cigarette Smoking on Haematological and Lipid

Parameters. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014;8(7):11–3.

50. Whitehead TP, Robinson D, Allaway SL, Hale AC. The effects of cigarette smoking and alcohol consumption on blood hemoglobin, erythrocytes and leukocytes: a dose related study on male subjects. Clinical and laboratory hematology. 1995;17(2):131–8.
51. Aitchison R, Russell N. Smoking - a major cause of polycythaemia. Journal of the Royal Society of Medicine. 1988;81(2):89–91.
52. Asif M KS, Umar Z, Malik A, et al. Effect of cigarette smoking based on haematological parameters: comparison between male smokers and non-smokers. Turkish Journal of Biochemistry. 2013;38(1):75–80.
53. Loimaala A, Rontu R, Vuori I, Mercuri M, Lehtimaki T, Nenonen A, et al. Blood leukocyte count is a risk factor for intima-media thickening and subclinical carotid atherosclerosis in middle-aged men. Atherosclerosis. 2006;188(2):363–9.
54. Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. European journal of endocrinology. 2005;152(4):491–9.
55. Kastelein TE, Duffield R, Marino FE. Acute Immune-Inflammatory Responses to a Single Bout of Aerobic Exercise in Smokers;The Effect of Smoking History and Status. Frontiers in immunology. 2015;6:634.