

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет біології, географії та екології**

**Кафедра біології людини та імунології**

**ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ**  
**КРОВІ ЯК ПОКАЗНИК ЗАГАЛЬНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ**

Кваліфікаційна робота (проєкт)

на здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

Виконала: студентка 4 курсу 411 групи

Спеціальності 091 Біологія

Освітньо-професійної програми Біологія

Баданюк Наталія Ігорівна

Керівник: к.б.н., доцент Бесчасний Сергій Павлович

Рецензент:

в.о директора КПН

«Херсонський обласний центр служби крові»

Лагутіна Ганна Григорівна

Херсон – 2021 рік

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>РОЗДІЛ 1. ЛЕЙКОЦИТИ ЯК ВИСОКОСПЕЦІАЛІЗОВАНІ КЛІТИНИ</b> .....	7
1.1 Загальна характеристика лейкоцитів крові.....	8
1.2 Особливості будови лейкоцитів .....	12
1.3 Цитохімічні дослідження лейкоцитів.....	14
1.3.1 Цитохімічні дослідження для діагностики захворювань.....	15
1.3.1.1 Лейкоцитоз.....	15
1.3.1.2 Лейкопенія.....	16
<b>РОЗДІЛ 2. ОСНОВНІ ЦИТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b> .....	18
2.1 Лейкоцитарна формула.....	18
2.2 Лейкоконцентрат.....	21
2.3 Метод азосполучення за Кеплоу.....	23
2.4 Метод азосполучення Грехема-Кнолля.....	25
2.5 Метод Шабадаша.....	28
<b>РОЗДІЛ 3. ОРГАНІЗАЦІЯ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ</b> .....	31
3.1 Фагоцитарний індекс Гамбургера та фагоцитарне число Райта.....	31
3.2 Результати дослідження.....	33
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	34
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	37

## ВСТУП

Усі лейкоцити здатні до фагоцитозу. Сам фагоцитоз полягає у наступному -рухливі клітини тіла макроорганізму, захоплюють цитоплазму і перетравлюють різні сторонні часточки, а саме це - бактерії, фрагменти клітин тощо [6].

На фагоцитарній активності будуються загальні функції лейкоцитів. Поживна функція лейкоцитів є важливою тому, що лейкоцити можуть робити «захват» і перетравлювати поживні речовини, переносити і віддавати продукти перетравлення іншим клітинам тіла. Цю функцію можна спостерігати у амебоцитів кишковопорожнинних, мальків риби. Прикладом можуть виступати лейкоцити мальків риби які при потраплянні з кров'ю до жовткового мішка, захвачують поживні речовини і переносять їх до кровоносного русла.

Потрапляючи у кров і тканини нашого тіла, лейкоцити захоплюють мікроскопічні часточки пилу, різних речовин через численні мікропошкодження шкіри, легень травного каналу. Якщо вони не здатні їх перетравити, лейкоцити разом з цими часточками надходять з кровоносної системи в кишки і виділяється поза межі організму.

Захисна функція здійснюється лейкоцитами як шляхом фагоцитозу патогенних мікроорганізмів та їхніх токсинів, так і за допомогою вироблених цими спеціальних речовин – антитіл. Це ї є найголовніша функція, навіть головна функція лейкоцитів, тому вона і потребує окремого дослідження та розгляду. Не менш важливою та специфічною функцією є виконання лейкоцитами здійснення гістолізу (руйнування) тканин тіла лялечки у процесі перетворення їх на дорослу форму(у комах з повним метаморфозом).

Основною функцією лейкоцитів є захист організму від будь-яких чужорідних речовин. У всіх лейкоцитів наявне ядро. Тривалість їхнього життя від кількох годин до кількох діб (за винятком лімфоцитів).

Існує 2 основні групи лейкоцитів, а саме це:

- *гранулоцити (зернисті);*
- *агранулоцити (незернисті).*

Зернистим лейкоцитам притаманне мультилобулярне ядро й зерниста цитоплазма, вони мають здатність до амебоїдного руху.

*Гранулоцити, в свою чергу, діляться на:*

- *базофіли;*
- *нейтрофіли;*
- *еозинофіли.*

*Нейтрофіли* становлять 70% загальної кількості лейкоцитів, вони володіють здатністю проходити між клітинами капілярів, проникати в *міжклітинний простір* тканин і рухатися в напрямку до інфікованих ділянок тіла.

Нейтрофіли – це так звані активні фагоцити, які поглинають і перетравлюють бактерії і токсини, при цьому самі можуть приходити в стан руйнації. Активний вихід лейкоцитів (напр. при запаленні) із кісткового мозку призводить до появи в *руслі* крові юних форм (паличкоядерних або навіть метамієлоцитів) [18].

*Еозинофіли* становлять 0,5-5% загальної кількості лейкоцитів. Їх кількість може збільшуватися під час алергічних реакції. Вони володіють антигістамінною здатністю, тобто руйнують чужорідні білки й токсини білкового походження.

*Базофіли* становлять 0-1 % від усіх лейкоцитів. Вони виробляють гепарин і гістамін. Гепарин затримує зсідання крові в осередку запалення, гістамін розширює капіляри, що сприяє заживленню. *Агранулоцити* мають ядро овальної форми й незернисту протоплазму, існує 2 їх види: *моноцити та лімфоцити.*

*Моноцити* (макрофаги) – становлять 3-11 % від усіх лейкоцитів, утворюються в лімфатичних вузлах і сполучних тканинах. Активно фагоцитують бактерії і великі частини зруйнованих клітин власного тіла,

беруть участь у відшаруванні трансплантату, а також захисті від пухлинних клітин. Здатні транспортуватися в осередки запалення, де діють як нейтрофіли, як замітники.

*Лімфоцити* становлять 19-37 % від усіх лейкоцитів, утворюються в тимусі та лімфоїдній тканині, вони мають округлу форму, містять мало цитоплазми.

Їх головною функцією є індукція імунних реакцій або участь у них (утворення антитіл, відторгнення трансплантату, знешкодження пухлинних клітин). У крові, як правило, не відсутні імунологічних реакції, кровотік доставляє лімфоцити до місця їх дії. Тривалість життя – до 10 років і більше. У дітей у віці від 5-6 днів до 5-6 років вміст лімфоцитів більший, ніж нейтрофілів.

*Усі лімфоцити поділяються на 3 групи:*

Т-лімфоцити (тимусові) – забезпечують імунітет клітин (рецептори знаходяться на цитолемі, вони вмикають активацію лізосомальних ферментів). Розрізняють три види Т-лімфоцитів: цитотоксичні Т-клітини (супресори) (виконують блокування надмірних реакцій В-лімфоцитів і мають здатність підтримувати постійне співвідношення різних форм лімфоцитів), Т-клітини-хелпери (взаємодіють з В-лімфоцитами, перетворюючи їх у плазматичні клітини), Т-клітини пам'яті. В-лімфоцити – здатні забезпечувати гуморальний імунітет за допомогою вироблення антитіл. Представники В-клітин перетворюються у плазматичні клітини та В-клітини пам'яті. Нульові лімфоцити в свою чергу можуть перетворюватися на лімфоцити Т або В [2].

**Актуальність теми:** Лейкоцити – це клітини, які мають ядро, вони не мають здатності вміщувати гемоглобін та відіграють важливу роль в захисті організму від найпростіших, мікробів, вірусів, простіше кажучи – забезпечують імунітет.

Чисельність еритроцитів в крові людини є постійною, а от чисельність лейкоцитів вагомо коливаються, це залежить від часу та стану самого організму та імунітету. У людей старшого віку лейкоцитів в крові міститься -

4000 – 9000 в 1мкл. Причому, фагоцитарна функція забезпечується як нейтрофілами (які є найчисельнішою групою) та моноцитарно-макрофагальною системою. Враховуючи вищезазначене, можна стверджувати що функціональна активність лейкоцитів являє собою фундаментальний аспект у підтримці та реалізації імунної функції організму.

**Об'єкт дослідження:** застосування методів визначення функціональної активності лейкоцитів у лабораторній практиці.

**Предмет:** методи визначення функціональних показників лейкоцитів для діагностики стану імунної системи, методика визначення фагоцитарної активності периферичної крові.

**Мета дослідження:** з'ясувати роль та місце цитохімічних досліджень лейкоцитів крові та їх значення для діагностики стану імунної системи.

Виходячи з мети дослідження були поставлені такі **завдання:**

- охарактеризувати лімфоцити периферичної крові людини;
- розглянути функціональну характеристику лейкоцитів в залежності від виконуваної функції;
- розглянути групи лейкоцитів в залежності від будови та походження;
- вивчити цитохімічні методи дослідження для визначення функціонального стану лейкоцитів.
- Дослідити фагоцитарну активність лейкоцитів під впливом стрес-гормону адреналіну.

**Структура роботи.** Дипломна робота складається зі вступу, трьох розділів, тринадцяти підрозділів, висновків, списку використаної літератури.

## РОЗДІЛ 1.

### ЛЕЙКОЦИТИ ЯК ВИСОКОСПЕЦІАЛІЗОВАНІ КЛІТИНИ

Лейкоцити – клітини крові, різняться характерною структурою і складним внутрішньоклітинним метаболізмом. Різні форми зрілих лейкоцитів є об'єктом лабораторних досліджень. Вони відрізняються за формою і структурою ядра, характеру цитоплазми, її грануляції, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, тинкторіальними властивостям; ці ознаки є основними критеріями при дослідженні лейкоцитів в забарвлених мазків крові.

Лейкоцити – високоспеціалізовані клітини, володіють різними захисними функціями. Завдяки фагоцитарній активності, участі в клітинному і гуморальному імунітеті, обміні гістаміна, гепарина, реалізуються антимікробні, антитоксичні, антитілоутворюючі та інші важливі компоненти імунологічних реакцій.

Кількість лейкоцитів в крові змінюється під впливом різних зовнішніх факторів: сезонних, кліматичних, метеорологічних, період сонячної активності, а також при різному фізіологічному стані організму(вікові зміни, вагітність, фази менструального циклу та інші) різноманітної патології.

Тому дослідження числа лейкоцитів в крові – одне з самих розповсюджених в лабораторній практиці. Вони проводяться не тільки захворілим(обов'язково всім хворим в стаціонарі і амбулаторним за показанням), але і здоровим при профілактичному огляді дитячого населення, робочих і службових деяких виробництв та інших оздоровчих заходів [2].

#### 1.1 Загальна характеристика лейкоцитів крові

Розрізняють дві основні групи лейкоцитів: гранулоцити (зернисті) і агранулоцити (незернисті). Відмінними рисами гранулоцитів є сегментування ядра (фіолетового кольору), оксифільна (рожева) цитоплазма, що містить зернистість.

За характером специфічної зернистості протоплазми гранулоцити поділяються на такі види:

- нейтрофіли (міелоцити, юні, паличкоядерні і сегментоядерні);
- еозинофіли;
- базофіли.

Особливістю агранулоцитів є несегментоване ядро і базофільна (блакитна) цитоплазма, відсутність зернистості в цитоплазмі. До них відносяться:

- лімфоцити;
- моноцити [5].

*Основною функцією лейкоцитів є захист організму від мікроорганізмів, яку можуть нести загрозу, чужорідних білків, наявність сторонніх тіл. Лейкоцити здатні до самостійного руху, на шляху вони захоплюють і піддають внутрішньоклітинному перетравленню мікроорганізми і сторонні тіла. Щодо швидкості, то найшвидшими є нейтрофіли, а от лімфоцити і базофіли переміщуються повільніше. Рух збільшується під час захворювань та запальних процесів. Таке може бути пов'язано з тим, що хвороботворні мікроорганізми здатні виділяти токсини, які саме й викликають прискорення руху лейкоцитів. Приблизившись до мікроорганізмів, лейкоцити псевдоніжками охоплюють їх і всмоктують всередину цитоплазми. Якщо чужорідне тіло має більші розміри лейкоцитів, то навколо нього накопичуються групи нейтрофілів(утворюють так званий бар'єр). Перетравлюючи це стороннє тіло, настає загибель і як наслідок утворення гною. Спочатку він знаходиться всередині тканини, та запускає запалення – утворюється, так званий, нарив, який через деякий час від тиску розривається, і його вміст виходить з організму.*

Фагоцитозом можна охарактеризувати як поглинання і перетравлення лейкоцитами різних мікроорганізмів, які потрапляють отоком крові в



організм. Фагоцитоз був вивчений найковцем І.І. Мечніковим, який доречі, встановив, що фагоцитарну функцію виконують клітини, які можна розділити за двома групами: рухомі – до них відносяться лімфоцити, моноцити і нерухомі клітини, що містяться в лімфатичних вузлах, печінці, та інших органах. Щоб коротко та зрозуміло, то фагоцитоз - це виконання захисної функції організму [6].

Боротьба з інфекцією в організм застосовує 2 види факторів захисту: неспецифічні і специфічні. До *неспецифічних факторів* входять: шкіра та слизові оболонки, що слугують бар'єром, він має здатність затримувати сторонні тіла і запобігає проникненню їх у внутрішнє середовище організму. До неспецифічних факторів належать фагоцити, які містяться в крові, а ще наявні у різних органах системи організму.

Головними факторами у боротьбі з інфекціями являються *специфічні фактори*, які виробляються в організмі. Вони визначають специфічну несприйнятливості організму до тієї інфекції, проти якої вони саме й вироблялися. Така форма захисту має назву імунітет (включає захисні механізми організму проти чужорідних факторів - бактерій, вірусів [6, 4].

*Імунний процес* - це відповідь організму на подразник, або ж потрапляння антигену. Під антигеном розуміють білки, які проникли у його внутрішнє середовище, та які оминули травний .

Антигени - високомолекулярні сполуки, які здатні забезпечувати імунну відповідь та стимулювати імунокомпетентні лімфоїдні клітини. Антигенні властивості притаманні всім білкам, наприклад, хвороботворним бактеріям. Антигенів налічується сотні тисяч. Кров має здатність виробляти особливі білкові тіла, захищаючи цим організм від антигенів - антитіла.

*Антитіла* – так звані глобуліни сироватки крові людини, що утворюються у відповідь при потраплянні в організм різних антигенів, які знешкоджують антигени, вступаючи з ними у реакції найрізноманітнішого характеру.

Антитіла проникають у кров утворившись у клітинах лімфатичних вузлів, селезінки, кісткового мозку та циркулюють в організмі. Найактивніше вироблення антитіл - лімфоцити, моноцити.

Антитіла по-різному впливають на мікроорганізми, а саме хвороботворні. Одні з яких з'єднують мікроорганізми, а інші — осаджують з'єднані частинки, треті — повністю їх розчиняють.

*Преципітини* - антитіла, які мають здатність склеювати мікроорганізми. Антитіла, які розчиняють бактерії, мають назву бактеріолізину. Антитіла, які нейтралізують токсини бактерій, грибів, змій, рослин, називають антитоксинами. Вони починають діяти саме на той мікроорганізм чи отруту, який був спричинений їхнього утворення.

Антиген, потрапивши в організм, зупиняється на деякий час у лімфатичних вузлах. Це є, так званий, сигнал який утворює макрофаги, які в свою чергу починають пожирати і переробляти антигени.

*Імунітетом* можна назвати прояв, який спрямований задля збереження сталого стану внутрішнього середовища, а саме захисних реакцій організму. Під поняттям імунітет мають на увазі неприйнятність до хвороб(інфекційних). Імунітет розрізняють двох видів: природний і штучний.

*Природний імунітет* - це неприйнятність до інфекційних захворювань, яка передається від матері до дитини, інакше кажучи – *природжений* або *набутий* - виникає після перенесення хвороби.

Штучний імунітет поділяють на активний та пасивний. *Активний* - виникає в результаті введення збудників в ослаблений організм, настає легка форма хвороби (утворюються антитіла) *Пасивний*, який утворюється при введенні в організм сироваток, які мають в складі антитіла проти збудника. Препарат який виготовлений з ослаблених бактерій, вірусів та їх токсинів, має назву - вакцина, а вакцинація – це профілактичне щеплення. Проти поліомієліту, туляремії, коклюшу використовують введення вакцин під час щеплення щеплення.

Сироватки лікувального типу отримують з крові тварин, найбільш поширено використовують кров коней. Ця форма імунітету менш тривка, ніж сам по собі природний імунітет.

Крім фагоцитів у організмі людини (а саме в тимусі) утворюються лімфоцити (Т-лімфоцити), які, зіткнувшись з мікроорганізмами, запам'ятовують їхню структуру, будову та механізми і передають інформацію про цей тип мікроорганізмів поколінням Т-лімфоцитам. Клітинний імунітет забезпечується фагоцитами і Т-лімфоцитами.

Гуморальний імунітет забезпечується білками крові, який захищає організм певний проміжок часу від повторних інфекційних захворювань.

Виходячи з цього імунна система забезпечує захист організму при інфекціях, пухлинах, токсинів тощо

*Алергія* – своєрідна, навіть можна сказати специфічна реакція імунної системи на дію певних факторів навколишнього середовища. *Алергени* - речовини, які здатні викликати алергічну реакцію. Алергени спочатку вдихаються, потім йде етап заковтування або можуть проникати під час прямого контакту зі слизовим оболонками чи шкірою. Вони спричиняють алергічну реакцію, проявляється як лихоманка, висипів на шкірі та навіть астма тощо.

Алергени спричиняють виділення клітинами (імунокомпетентними) антитіл - імуноглобулінів Е (Ig E).

Іноді органи імунної системи можуть утворювати антитіла не за зовнішніх факторів, таких, як бактерії, а проти власних тканин. Помилкова реакція може бути направлена на окремий орган, ним може бути щитовидна залоза.

В ембріональному періоді антитіла не виробляються. Специфічний білок плазми крові передається через плаценту від матері до дитини (плода). В перші 3 місяці після народження, діти майже повністю несприйнятливі до інфекційних захворювань. Це пов'язано з незрілістю організму, а в першу чергу його нервової системи. Неспецифічні фактори захисту в ранньому віці

більш виражені, ніж у дітей старшого віку. До 10 років імунні властивості організму вже добре виражені, далі вони починають знижуватись після 40 років.

## 1.2 Особливості будови лейкоцитів

Усі лейкоцити мають ядро та багато лізосом. Їх форма не є постійною, тому вони здатні утворювати псевдоподії та рухатись як амеба. Деякі види лейкоцитів проникають крізь стінки капілярів і рухаються у міжклітинних просторах.

У цитоплазмі, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли є гранули, які містять ферменти, білки та інші різні речовини, що виконують певні функції.

Не мають гранулоподібні включення в цитоплазмі моноцити, лімфоцити. Лейкоцити відрізняються за формою, розмірами, будовою, властивостями та походженням.

У крові може змінюватися кількість лейкоцитів, бо 50% лейкоцитів знаходиться у міжклітинних проміжках, третина - у червоному кістковому мозкові та невеликий відсоток міститься у кровоносному руслі.

Розглядаючи функціональні і морфологічні ознаки лейкоцитів, можна зробити висновки, що вони являють собою звичайні клітини, які мають ядро і протоплазму. Їх функція - це захист організму від шкідливих чинників. За рахунок такої будови лейкоцитів знищуються чужорідні організми, які потрапили в організм. Будова лейкоцитів людини різноманітна. Одні з них мають гранулоцити, інші - агранулоцити. Розглянемо ці види лейкоцитів детальніше.

Як вже згадувалося раніше, лейкоцити різні, і їх класифікують за зовнішнім виглядом, будовою та функціями. Це і є особливістю будови лейкоцитів людини.

Отже, до гранулоцитів відносяться:

- базофіли;
- нейтрофіли;

- еозинофіли [4].

Агранулоцити представлені наступними видами клітин:

**Базофіли.** Не численний вид клітин крові (їх максимум 1% від усього числа лейкоцитів). Будова лейкоцитів досить проста. Вони мають округлу форму, сегментоядерне або паличкоядерне ядро. Цитоплазма містить в собі різні гранули(за формою і розміром), мають темно-фіолетовий колір. Ці гранули мають назву базофільної зернистості, мають регуляторні молекули, ферменти, білки.

Базофіли беруть свій початок в кістковому мозку, відбуваються з клітки базофільного мієлобласта. Після того як вони дозріли - виходять у кров. Після клітини йдуть в тканини організму. Беруть участь під час перебігу анафілактичного шоку у запальних реакціях та можуть зменшувати згортання крові.

**Нейтрофіли.** Їх у крові знаходиться до 70% від загальної кількості всіх лейкоцитів. В цитоплазмі нейтрофілів знаходяться гранули фіолетово-коричневого кольору, які мають вигляд дрібної зернистості, які можна пофарбувати барвниками.

Форма нейтрофілів округла, ядро паличковидне, наявність сегментів (об'єднані між собою).

Життя зрілої клітини - 2 тижні, потім вона руйнується у селезінці або печінки.

Вони у своїй цитоплазмі мають до 250 видів гранул. Всі вони містять ферменти, регуляторні молекули, які допомагають нейтрофілу виконувати правильно функції, які йому притаманні. Вони здатні захистити організм за допомогою). Наприклад, одна клітина нейтрофіла здатна знешкодити до 7 мікробів.

**Еозинофіли.** Їм притаманна також округла форма і паличковидна форма ядра. Клітини у цитоплазмі досить великі, гранули однакової форми і розміру, (забарвлення яскраво-помаранчевого кольору). Склад: білки, фосфоліпиди, вітаміни і ферменти.

Еозинофіл формується в кістковому мозку. Існує він від 8 до 15 діб, потім йде в тканини, які контактують із зовнішнім середовищем. Еозинофіл також здатний до фагоцитозу [4].

### 1.3 Цитохімічні дослідження лейкоцитів

Цитохімічні дослідження проводять в мазках крові, лейкоконцентрату; вони засновані на використанні специфічних хімічних реакцій для визначення в клітинах різних речовин. Ці дослідження дозволяють вивчити локалізацію і орієнтовано оцінювати кількість визначених речовин в різних клітинних елементах. Цитохімічні дослідження відносно не складні, дають можливість досліджувати різні види лейкоцитів, але поступаються в точності кількісному аналізу, проведенню за допомогою біохімічних методів.

При цитохімічному дослідженні частіше користуються напівкількісною оцінкою результатів, використовуючи принцип Астальді, заснований на виявленні різної ступені інтенсивності специфічності забарвлення. В залежності від неї досліджувані елементи поділяють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабкопозитивною (+), позитивною (+ +) і різко позитивною (+ + +). Для кількісного вираження результатів підраховують 100 клітин певного виду, диференціюючи їх за зазначеним принципом, потім кількість клітин з однаковою інтенсивністю забарвлення множать на відповідній даній групі кількість плюсів, сума цих результатів становить умовні одиниці. Наприклад, при дослідженні активності лужної фосфатази в нейтрофілах з 100 переглянутих клітин в 60 клітинах активності ферменту не виявлено (-), в 35-специфічна зафарбованість була слабкою (+) і в 5-більш інтенсивної (+ +). Результат визначення активності лужної фосфатази в нейтрофілах в такому випадку складе  $(60 \times 0) + (35 \times 1) + (5 \times 2) = 0 + 35 + 10 = 45$  одиниць. Можна виразити результат у вигляді середнього цитохімічного показника за L. Karłow (1955) або середнє цитохімічного коефіцієнта (СЦК). З цією метою також диференціюють 100 досліджуваних

клітин за зазначеною вище системою. Отриманий відсоток клітин в кожній групі множать на відповідне даної групи число плюсів. Сума цих величин, ділена на 100, являє собою СЦК для однієї клітини. У вказаному прикладі СЦК лужної фосфатази нейтрофілів дорівнюватиме 0,45. В тих випадках, коли досліджувані речовини локалізуються в клітинах у вигляді одиничних гранул (наприклад, активність неспецифічної естерази в лімфоцитах та ін.), результат цитохімічної реакції доцільно виражати у відсотках клітини, даючи позитивну реакцію.

Метод напівкількісної оцінки є орієнтовним, але дозволяє порівнювати розподіл досліджуваних речовин в різних клітинних елементах або в одних і тих же клітинах при різних патологічних станів організму, а також в залежності від течії захворювання, ступеня його тяжкості і в зв'язку з проведеною терапією.

Найбільш розповсюджені цитоензиматичні дослідження, дають можливість виявити в клітинах активності різних ферментів. Для цього частіше використовують методи азосполучення, в яких специфічний субстрат, взаємодіючи з ферментом, утворює продукт реакції, який забарвлюється солями діазонія; за забарвленням судять про локалізації ферменту і його активності [1].

### **1.3.1 Цитохімічні дослідження для діагностики захворювань.**

**1.3.1.1 Лейкоцитоз.** Лейкоцитоз - це реакція кровотворної системи на вплив екзогенних і ендогенних факторів. Розрізняють фізіологічний і патологічний лейкоцитоз. Фізіологічний лейкоцитоз буває:

- травний - після прийому їжі, особливо багатой білками; число лейкоцитів не перевищує  $10,0-12,0 \times 10^9 / л$  і через 3-4 години повертається до норми;
- при емоційній напрузі (виділення адреналіну), важкому фізичному навантаженні, охолодженні, надмірному перебування на сонці (сонячні опіки), введення низки гормонів (катехоламінів, глюкокортикоїдів та ін.

Патологічний лейкоцитоз ділиться на абсолютний і відносний.

Абсолютний - підвищення числа лейкоцитів в крові до декількох сотень тисяч ( $100,0-600,0 \times 10^9 / \text{л}$  і більше). Найбільш часто спостерігається при лейкозі: при хронічному лейкозі - в 98-100% випадків, при гострих лейкозах - в 50-60%. Зміна співвідношення клітин лейкоцитарного ряду в пунктаті кісткового мозку і в крові служить основою діагностики лейкозів.

Відносний лейкоцитоз спостерігається:

- при гострих запальних та інфекційних процесах, виняток становлять черевний тиф, грип, віспа, краснуха, хвороба Боткіна, кір. Найбільший лейкоцитоз (до  $70,0-80,0 \times 10^9 / \text{л}$ ) відзначається при сепсисі;
- під впливом токсичних речовин (отрут комах, ендотоксинів), іонізуючої радіації (відразу після опромінення);
- в результаті дії кортикостероїдів, адреналіну, гістаміну, ацетилхоліну, препаратів наперстянки;
- при розпаді тканини (некроз), інфаркті міокарда, тромбоз периферичних артерій з розвитком гангрені, опіках, ексудативному плевриті, перикардиті, уремії, печінковій комі;
- значних крововтратах при пораненнях, внутрішніх, гінекологічних та інших кровотечах. Підвищення числа лейкоцитів при інфекційних захворюваннях в більшості випадків супроводжується зрушенням лейкоцитарної формули вліво [3, 16].

**1.3.1.2. Лейкопенія.** Лейкопенія – зменшення кількості лейкоцитів в крові. Найтяжчий прояв лейкопенії - це агранулоцитоз. *Агранулоцитоз* – це зменшення кількості гранулоцитів у крові менше  $0,55 \times 10^9/\text{л}$  або лейкоцитів менше  $1,0 \times 10^9/\text{л}$ .

Найчастіше його розвиток починається у пацієнтів з діагнозом апластичною анемією, лікування цитостатичними ліками. У хворих з агранулоцитозом в результаті з'являються інфекційні ускладнення, тому їм потрібно надати невідкладну допомогу.

Нейтропенія часто розвивається у пацієнтів, які проходять курс протипухлинного лікування, інакше кажучи "цитостатична хвороба". Вона



супроводжується сепсисом, пневмонією, гіпертерією, інтоксикацією, тяжкими інфекціями, виразковими хворобами слизових (стоматит, ангіна), які важко піддаються лікуванню, якщо вчасно не звернутися [3, 16, 25].

## РОЗДІЛ 2.

### ОСНОВНІ ЦИТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Лейкоцитарна формула

Лейкоцитарну формулу (процентне відношення різних видів лейкоцитів) підраховують в забарвлених мазках крові. Методи фіксації і забарвлення мазків крові, а також мікроскопічного дослідження мазків. Уніфікований метод морфологічного дослідження формених елементів крові з диференціальним підрахунком лейкоцитарної формули (1979).

Принцип. Мікроскопія сухих фіксованих і забарвлених мазків крові з диференціюванням різних форм лейкоцитів.

Реактиви. 1. Іммерсійне масло. 2. Діетиловий ефір.

Спеціальне обладнання.

1. Мікроскоп. 2. 11-клавішний лічильник для підрахунку лейкоцитарної формули.

Хід дослідження. За допомогою об'єктива 10 X (малого збільшення) знаходять край мазка крові. Наносять краплю імерсійного масла і, не змінюючи положення скла, переводять імерсійний об'єктив (90 X) таким чином, щоб він занурився в краплю олії. Підбирають за допомогою мікрогвинта відповідну фокусну відстань, встановлюючи чітку видимість клітин. Приступають до диференціювання лейкоцитів, відзначають клітини за допомогою 11-клавішного лічильника; необхідно врахувати не менше 100 лейкоцитів. Підрахунок лейкоцитів проводять, дотримуючись наступних правил: відступивши 2-3 поля зору від краю мазка, потім 3-5 полів зору уздовж краю мазка, затим 3-5 полів зору під прямим кутом по напрямленню до середини мазка, знову 3-5 полів зору паралельно краю, потім під прямим кутом у напрямку до краю і т. д. ; такимчином, скло рухають зигзагом (лінія «меандра »). Прорахувавши близько половини клітин на одному краї мазка,

змінюють положення скла і другої половини клітин рахують на протилежному краї.

При дослідженні лейкоцитарної формули необхідно диференціювати незруйновані лейкоцити. Якщо при підрахунку 100 лейкоцитів відзначаються будь-які відхилення від норми (наприклад, збільшення числа паличкоядерних форм, еозинофілів, лімфоцитів або поява лейкоцитів, що не виявляються у здорових людей), необхідно підрахувати ще 100 лейкоцитів і вивести середній результат.

Дослідження лейкоцитарної формули за допомогою автомата. Сучасні гематологічні автомати для підрахунку лейкоцитарної формули засновані на двох принципах.

Принцип 1. Диференціація лейкоцитів за допомогою мікроскопа в забарвлених мазках крові шляхом порівняння морфологічних характеристик клітин крові зі стандартними, що зберігаються в пам'яті комп'ютера (автомат «Hematrak» фірми «Opton», ФРН, і ін.).

Принцип 2. Диференціація лейкоцитів не в мазках, а в цільної крові в залежності від розміру і цитохімічних властивостей клітин із застосуванням селективних забарвлень (автомат «Hemalog D» фірми «Technicon», США).

Спеціальне обладнання. Автомат для підрахунку лейкоцитарної формули.

Хід дослідження відповідає інструкції, яка додається до автомата.

Існуючі автомати для підрахунку лейкоцитарної формули відрізняються не тільки принципом роботи, але і кількістю диференціюючих лейкоцитів в 1 пробі, по можливості ідентифікації патологічних форм, наявності контрольного пристрою, пристрою для приготування мазків і їх забарвлення і ін.

Клінічне значення. Зміни лейкоцитарної формули супроводжують багатьма захворюваннями і нерідко є неспецифічними. Проте діагностичне значення цього дослідження велике, воно дає представлення про тяжкість стану, ефективності терапії. При гемобластозах дослідження лейкоцитарної

формули особливо діагностично значиме. Виявлення в крові владних клітин є опорним пунктом для діагнозу гострого лейкозу.

Підвищення числа нейтрофілів - нейтрофіліз, як правило, поєднується зі збільшенням загального числа лейкоцитів в крові і спостерігається при гострих запальних процесах, інтоксикаціях, шоківих станах, при кровотечах, інфаркті міокарда. Нерідко цим станам супроводжує і підвищення числа паличкоядерних нейтрофілів, і появи незрілих гранулоцитів (мієлоцитів, метамієлоцити) в невеликій кількості (зрушення формули вліво). Максимального ступеню трансформаційних змін досягають при мієлопроліферативних захворюваннях, особливо хронічному мієлолейкозі. При цьому різко збільшується загальна кількість лейкоцитів ( $50 \cdot 10^9 / \text{л}$  -  $100 \cdot 10^9 / \text{л}$  і більше) і в значному відсотку лейкоцитарної формули виявляють промієлоцити (3-5%), мієлоцити (до 10%), метамієлоцити (до 10-15%) і поодинокі владні клітини, при цьому число зрілих нейтрофілів суттєво не зменшується. Такого типу зміни можуть бути і реактивними (лейкемоїдні реакції), і супроводжувати сепсису, туберкульозу, метастамам злоякісних пухлин в кістковий мозок. Зниження числа нейтрофілів – нейтропенія - зазвичай поєднується з лейкопенією і спостерігається при вірусних інфекціях, деяких хронічних інфекціях, після прийому різних медикаментів (особливо цитостатичних), після променевої терапії. Максимальний ступінь нейтропенії спостерігається при апластичній анемії, агранулоцитоз. Збільшення числа еозинофілів - еозинофілія - супроводжується алергічними реакціями, глистової інвазії, деяким дитячим інфекціями, особливо скарлатині, іноді пухлин, лімфогранулематозу та ін. Збільшення числа базофілів - базофілія - зустрічається рідко і разом з еозинофілією може бути ознакою мієлопроліферативного захворювання. Збільшення числа лімфоцитів -лімфоцитоз - спостерігається при інфекційному лімфоцитозі, кашлюку, туберкульозі, після видалення селезінки. Найбільшій мірі лімфоцитоз досягає при хронічному лімфолейкозі (70 - 90%) і поєднується з високим лейкоцитозом ( $50 \cdot 10^9 / \text{л}$  і вище). Відносний лімфоцитоз - явище

нерідке і спостерігається у всіх випадках лейкопенії з нейтропенією. Збільшення числа моноцитів - моноцитоз - проявляється при хронічних інфекціях, пухлинах і особливо різке - при хронічних моноцитарних лейкозах [16].

## 2.2 Лейкоконцентрат

Приготування і дослідження лейкоконцентрата проводять у випадках виражених лейкопенії, коли дослідження лейкоцитарної формули затруднене, а також для виявлення патологічних елементів, що не виявляються в мазках крові (наприклад, при алейкемічній стадії гострого лейкозу та ін.). Лейкоконцентрацію можна проводити при невиражених результатах стеральної пункції.

Всі методи лейкоконцентрації засновані на наступному: 1) гемоліз; 2) центрифугування; 3) седиментація. Найбільш фізіологічні методи, засновані на седиментації формених елементів крові, вони найбільш поширені. Метод з трилоном Б. Принцип. У зв'язку з різною питомою вагою еритроцитів і лейкоцитів додаванням трилону Б, що прискорює осадження еритроцитів, отримують плазму, яка має велику кількість лейкоцитів.

Реактиви: 1. 3% розчин трилону Б. 2. Фарба Романовського - Гімзе або азур-еозину. 3. Метанол для фіксації мазків.

Спеціальне обладнання: 1. Мікроскоп. 2. Термостат на 37 °С. 3. Центрифуга.

Хід визначення. У пробірку з 1 мл 3% розчину трилону Б вносять 4 мл венозної крові і обережно перемішують. Ставлять суміш крові з трилоном в термостат (можна відстоювати і при кімнатній температурі) на 30 - 45 хв (за цей час над еритроцитами з'явиться 2 - 3 мл прозорої плазми). За допомогою пастерівської піпетки відсмоктують в центрифужну пробірку шар плазми, намагаючись не захопити еритроцити. Центрифугують при 1000 об / хв протягом 10 хв. Надосадову рідину видаляють, а з осаду готують мазки

(поміщають краплю осаду пастерівською піпеткою на предметне скло і готують мазок). Мазки висушують на повітрі, фіксують і зафарбовують гематологічними барвниками. Метод з гепарином може бути використаний при необхідності видалення тромбоцитів.

**Принцип.** При центрифугуванні плазми, розведеною холодним фізіологічним розчином хлориду натрію, тромбоцити осідають в осад, а лейкоцити залишаються в підвішеному стані.

**Реактиви.** 1. Гепарин (500 ОД / мл). 2. 0,85% розчин хлориду натрію.

**Хід визначення.** У пробірку з 1 мл гепарину додають 4 мл крові.

**Відстоюють**

40 - 45 хв. За допомогою пастерівської піпетки

відбирають плазму в центрифужну пробірку,

намагаючись не захопити еритроцити. Центрифугують при 1500 об / хв протягом 10 хв. Надосадкову рідину видаляють, а до осаду додають 5 мл холодного 0,85% розчину хлориду

натрію. Центрифугують при 500 - 800 об / хв

протягом 10 - 15 хв (якщо в осаді є домішки еритроцитів, то повторно центрифугують з холодним розчином хлориду натрію).

З осаду готують мазки і фарбують їх гематологічними барвниками.

**Нормальні величини.** При дослідженні лейкоконцентрату 50 здорових людей Р. А. Поспелова отримала наступну лейкограму: нейтрофіли паличкоядерні  $1,2 \pm 0,1\%$ , сегментоядерні  $58,8 \pm 0,7\%$ , еозинофіли  $1,8 \pm 0,05\%$ , базофіли  $0,7 + 0,08\%$ , лімфоцити  $31,2 \pm 1\%$ , моноцити  $7,1 \pm 0,3\%$ , плазматичні клітини  $0,2 \pm 0,03\%$ . У одної людини виявлено 0,2% мієлоцитів, у 2 - 0,2 і 0,4% метамієлоцитів, у 2 - поодинокі фрагменти ядер мегакаріобластів.

**Клінічне значення.** Дослідження мазків лейкоконцентрату має переваги перед дослідженням мазків периферичної крові при гострих лейкозах. Це дослідження дає можливість виявити власні клітини, оцінити повноту

ремісії при гострому лейкозі, а також провести цитохімічний дослід, що має важливе діагностичне значення при гострих лейкозах [15, 17].

### 2.3 Метод азосполучення за Кеплоу

Принцип. Розщеплення лужної фосфатази анатилфосфата зі звільненням а-нафтолу утворюючого з солями діазонію нерозчинний забарвлений в коричневий колір осад в місцях локалізації ферменту.

Реактиви.

1. 10% розчин формаліну в абсолютному метанолі.
2. 0,05 М розчин пропандіолового 0,2 М розчин (10,5 г 2-аміно-2-метил-1,3-пропандіола розчиняють в 500 мл дистильованої води), зберігають його в холодильнику. З основного розчину готують 0,05 М розчин (25 мл основного розчину буфера змішують з 5 мл 0,1 н.розчину HCl і доводять дистильованою водою до 100 мл), зберігають в холодильнику.
3. а-Нафтилфосфат. Можна використовувати нафтол-AS-Фосфат, нафтол-AS-TR-фосфат або нафтол-AS-B1-фосфат.
4. Міцний синій RR; можна використовувати вітчизняні барвники діазоль синій 2С і діазоль синій 0.
5. 2% розчин метилового зеленого.
6. Інкубаційне середовище (готують перед застосуванням): 35 мг а-нафтилфосфата, 35 мг міцного синього RR, 35 мл буферного розчину.

Хід дослідження. Висушені на повітрі мазки фіксують в 10% розчині формаліну в абсолютному метанолі при температурі 0-5 °С протягом 30 с. На висушені мазки наносять інкубаційне середовище після фільтрування і залишають мазки при кімнатній температурі на 8-10 хв. Промивають в проточній воді протягом 10 с. Дофарбовують метиловим зеленим протягом 15 хв або метатоксиліном Майєра 3-4 хв.

Метод азопоєднання (модифікація М.Г. Шубича).

Реактиви.

1. 0,5% розчину целоїдину в суміші рівної кількості абсолютного спирту і ефіру. Целоїдин можна приготувати із фотоплівки по методу Меркулова: видалили шар емульсії після вимочування в гарячій воді, витримують 5-10 днів в трьох змінах хлороформах, промити спиртом, висушити, дрібно порізати і розчинити в суміші абсолютного спирту з ефіром.

2. 0,5 М розчин тетраборату рН 9,18 [19,1 г тетрабората натрію розчинити и довести дистильованою водою до 1 л]. Розчин стійкий.

3. 0,1 розчину  $\alpha$ -нафтилфосфату в розчині тутраборату (готують перед вживанням).

4. 0,2% розчину діазоль синій 0 в розчині тетраборату (готують перед вживанням і фільтрують в захищеному від світла місці).

5. Гематаль & Байкера: один об'єм 0,1% гематеїну, приготованого на 50% водним рочином етиленгліколя, змішують з одним об'ємом 1,6% водного розчину сульфату алюмінію. Замість гематалю можна використати гематоксилін: 1 г фарби розчиняють в 50 мл дистильованої води, доводять до кипіння, доливають 50 мл дистильованої води, додають 0,02 г йодату натрію і 5 г алюмокалієвих квасців, струшують до розчинення і охолоджують.

6. Інкубаційне середовище (готують перед споживанням); рівні кількості реактивів 3 і 4.

Спеціальне обладнання. Холодильник.

Хід визначення. Мазки фіксують в 0,5 розчині целоїдину протягом 3-5 с. Після фіксації целоїдин зі зворотної сторони предметного скла видаляють серветкою, скельця ставлять у вертикальне положення на фільтрувальний папір і дають йому висохнути. Проходять інкубацію в інкубаційному середовищі при кімнатній температурі в захищеному від світла місці протягом 30 хв. Промивають проточною водою протягом 5-10 хв і змивають дистильованою водою. Дофарбовують ядра барвником (реактив 5). Під час використання гематалю 8 мазки фарбують 18-24 год, після чого змивають дистильованою і проточною водою і висушують. При використанні



гематоксиліну мазки фарбують 30-60 хв, змивають тетраборатним буферним розчином, водопровідною водою, промивають водою і висушують.

Нормальні величини. У здорових людей більшість сегментоядерних нейтрофілів виявляються фосфатазонегативними і тільки в 20-30% клітин виявлена слабка активність ферменту (+). За даними М. Г. Шубича і

Б. С. Нагоєва, активність фосфатази для здорових обох статей складає  $26 \pm 0,6$  одиниць, або СЦК  $0,26 + 0,006$ . Виявлений достовірний різновид між показником ензиматичної активності у чоловіків і у жінок (відповідно  $21 \pm 0,7$  та  $31 \pm 0,8$  одиниць).

Клінічне значення. Найбільше діагностичне значення має визначення активності ферменту при гемобластозах; зниження активності характерне для хронічного мієлолейкозу, підвищення – розглядають як одну з ознак еритремії.

Збільшення активності спостерігається також при запальних процесах, інтоксикаціях, пухлинах, цирозу печінки. Показник може бути використаним як диференціально-діагностична ознака при лейкемоїдних реакціях (активність ферменту збільшена) і хронічному мієлолейкозі. Зниження активності ферменту часто супроводжується вірусним гепатитом, інфекційному мононуклеозу та іншим вірусним інфекціям, променевої хвороби [11, 12, 14].

#### **2.4. Метод азосполучення Грехема-Кнолля**

Принцип. В присутності пероксидази бензидин окислюється перекисом водню в коричневий оксибензидин.

Реактиви.

1. 4% формаліново-спиртового розчину (10 частин 40% формаліну і 90 частин 96% спирту).

2. Реактив на пероксидазу: бензидин (на кінчику ножа) розводять в 6 мл 96% спирту, додаючи 4 мл води і 0,02 мл 3% перекису водню. Реактив дійсний до вживання у протязі 5-6 днів.

3. Барвник Романовського-Гімзи.

Спеціальне обладнання. Не потребується.

Хід визначення. Свіжі мазки (1-2-денної давності) фіксують 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30 с. Промивають під проточною водою і висушують. Заливають реактивом на пероксидазу на 5 хв. Ретельно промивають під проточною водою і висушують. Дофарбовують барвником Романовського-Гімзи. Пероксидаза виявляється в цитоплазмі клітини у вигляді коричневих гранул. Модифікований метод Нарцисова.

Принцип Грехема-Кнолля. Для зменшення інактивації ферменту використали відповідний фіксатор і невелика кількість перекису водню.

Реактиви.

1. 60% водного розчину ацетону.
2. 0,1 М розчину борату натрію (можна використати фосфатний або мєдналовий буферний розчин рН 7.6).
3. 5% водний розчин трилону Б.
4. Насичений водний розчин бензидину.
5. 0,003% перекису водню (розводять перед вживанням із 3% розчину в два етапи).
6. Інкубаційне середовище: мл 5% водного розчину трилону Б, 10 мл розчину борату натрію, 35 мл насиченого розчину бензидину і 2 мл розчину перекису водню.
7. 0,5% розчин метилового зеленого на буферному розчині (рН 5,0) або 0,1 % водний розчин метилового синього.

Спеціальне обладнання. Термостат.

Хід визначення. Свіжоприготовані мазки фіксують в 60% водному розчині ацетону протягом 30 с. Промивають дистильованою водою. Проходять інкубацію в інкубаційному середовищі протягом 1 год в

термостаті при 37 °С. Промивають дистильованою водою. Дофарбовують мазки метиловим зеленим або метиловим синім протягом 10 хв. Можна досліджувати недофарбовані мазки.

Модифікований метод [Шафран М. Г. та співавтор, 1979]. Принцип див. Метод Грехема-Кнолля. Бензидин замінений О-дианізидином.

Реактиви.

1. 10% спиртового розчину формаліну (1 мл 10% формаліну і 9 мл етилового спирту).

2. Спиртовий розчин О-дианізидину (можна використовувати препарат Шосткінського заводу хімреактивів; білі або жовтуваті кристали препарату швидко окислюються на повітрі, при зміні забарвлення він стає непридатним). 24 мг О-дианізидину розчиняють в 5 мл метанолу і доводять дистильованою водою до 9,9 мл.

3. 3% розчин перекису водню.

4. Реакційна суміш: до спиртового розчину О-дианізидину додають перед споживанням 0,1 мг перекису водню.

5. 0,25% водний розчин азура А або інший ядерний барвник.

Спеціальне обладнання. Не потребується.

Хід визначення. Мазки фіксують спиртовим розчином формаліну протягом 10-15 с. Змивають проточною водою. На мазки наносять реакційну суміш на 2-3 хв при кімнатній температурі. Змивають проточною водою. Дофарбовують розчином азура протягом 10-15 с. Змивають проточною водою і висушують.

Нормальні величини. У крові здорової людини активність пероксидази виявляється переважно в цитоплазмі гранулоцитів і в меншій ступені – моноцитів. Фермент з'являється в кров'яних клітинах на стадії проієлоцитів і у ряду мієлобластів (більш зрілих). Не містять ферменту недиференційовані бласти, частина мієлобластів та лімфобласти; 3-16 % нейтрофілів зафарбовані різко позитивно (+ + +). 60-90% - позитивно (+ +) та інші – слабо позитивні (+ +). СЦК нейтрофілів здорових людей дорівнює 2,56 +

+0,033. Еозинофіли характеризуються різко позитивною реакцією на пероксидазу.

Клінічне значення. Активність ферменту в нейтрофілах знижена при інфаркті міокарда, ревматизмі, туберкульозі, пухлинах. У хворих хронічним мієлолейкозом, особливо в термінальній стадії, СЦК знижується до  $1.63 \pm 0,19$  одиниць. В бластних клітинах активності ферменту висока при гострому мієлобластному лейкозі, слабка – при гострому монобластному і відсутня – при гострому лімфобластному лейкозі [18, 8].

## 2.5 Метод Шабаша

Принцип. Під впливом періодату калію глікоген окислюється з утворенням альдегідних з'єднань, легко реагуючих з реактивом Шиффа (фуксин-сірчаста кислота). В місцях локалізації глікогену проявляється вишнево-фіолетове забарвлення.

Реактиви.

1. 0,03 М розчину періодату калію або натрію: 230 мг періодату розчиняють в 100 мл дистильованої води. Готують перед застосуванням.

2. 1.н НСІ: 82,5 мл концентрованої НСІ відношення щільності 1,19 доливають дистильованою водою до 1 л.

3. Основний фуксин (для фуксин-сірчастої кислоти).

4. Метабісульфіт калію.

5. Реактив Шиффа; 1 г основного фуксину розчиняють в 200 мл киплячою дистильованою водою. За мірою охолодження в розчин додають 1 г метабісульфіту калію і 20 мл 1 н НСІ. Залишають на добу. Для повного забезпечення додають подрібнену пігулку карболону, залишають на добу, потім фільтрують. Реактив зберігають в темному місці (краще в холоді) в щільно закритому посуді. Придатний до вживання протягом декількох місяців (легка ступінь почервоніння свідчить про непридатність реактиву).

6. Сірчаста вода: до 10 мл 10% розчину метабісульфіту калію додають 200 мл дистильованої води та 10 мл 1 н. НСІ. Готують перед використанням.

7. 0,1% спиртовий розчин світло-зеленої фарби (лихтрюн).

Спеціальне обладнання.

1. Пальник. 2. Термостат. 3. Ваги.

Хід визначення. Препарати фіксують в абсолютному спирті протягом 30 хв. Промивають два рази дистильованою водою. Занурюють в розчин періодату на 20 хв (в темноті). Промивають трьома змінами сірчастої води по 3 хв. Промивають в трьох змінах дистильованої води по 3 хв. Зафарбовують світло-зеленою фарбою протягом 10-20 с. Промивають дистильованою водою. Глікоген зафарбовують у вишнево-фіолетовий колір на зеленому фоні препарату. Крім глікогену, позитивну реакцію можуть давати такі

ШИК-позитивні речовини, як кислі і нейтральні мукополісахариди, мукопротеїни, глікопротеїни та ін. Глікоген легко відифференціювати від інших речовин пробою зі слиною або діастазою.

Проба зі слиною. Препарат поміщають в свіжозібрану слину і залишають на 30 хв в термостаті. Потім проводять забарвлення на глікоген наведеним вище методом. Інкубація препаратів зі слиною сприяє розщепленню глікогену, і при реакції з реактивом Шиффа не виходить рожеве забарвлення.

Ідентифікувати глікоген можна також шляхом попередньої інкубації мазків з діастазою ( $\alpha$ -амілаза; К. Ф. 3.2.1.1) (1 мл профільтрованої діастази розчинити в 40 мл ізотонічного розчину хлориду натрію) протягом 30 хв в термостаті. Нормальні величини. В мазках периферичної крові глікоген міститься в цитоплазмі нейтрофілів (у вигляді рясної дрібної зернистості), цитоплазмі лімфоцитів (у вигляді невеликої кількості великих зерен).

В пунктаті кісткового мозку глікоген виявляється в нейтрофілах різного ступеня зрілості, лімфоцитах і мегакаріоцитів. У здорових людей кількість інтенсивно забарвлених нейтрофілів крові (+ + +) коливається в

межах 2-12%, середньої інтенсивності забарвлення(++) - в межах 72 - 90%, слабо зафарбованих (+) - від 4 до 18%. СЦК дорівнює 1,71 - 2,04.

У лімфоцитах крові здорових людей глікоген міститься у вигляді невеликого числа гранул в  $10,4 \pm 2,3\%$  клітин. У мегакаріоцитів кісткового мозку глікоген виявляється у вигляді гранул (від одиничних до 30 - 50), нагадуючи скупчення кров'яних пластинок. У здорових людей число глікоген позитивних мегакаріоцитів становить  $62,0 \pm 3,55\%$ .

Клінічне значення. Збільшення вмісту глікогену в нейтрофілах спостерігається при різних запальних процесах, еритремії, цукровому діабеті, зменшенням - при агранулоцитозі, променевої хвороби, при хронічному мієлолейкозі, особливо при прогресуванні процесу. Підвищення числа глікогенпозитивних лімфоцитів (до 70 - 80%) характерно для лімфопроліферативних захворювань, особливо хронічного лімфолейкозу. При тромбоцитопенічній пурпурі і симптоматичних тромбоцитопеніях число глікогенпозитивних форм мегакаріоцитів значно знижене, після спленектомії воно підвищується до нормальних величин.

При гострих лейкозах глікоген можна виявити в клітинах: при гострому мієлобластному лейкозі - у вигляді дрібної зернистості в цитоплазмі або у вигляді дифузного її фарбування, при гострому лімфобластному лейкозі - у вигляді великих гранул, розташованих в цитоплазмі навколо ядра, при гострому монобластному варіанті бластні клітини містять глікогену трохи в вигляді дифузного забарвлення, при еритромієлозі глікоген у вигляді гранул виявляються в еритробластих [9, 13, 26].

### РОЗДІЛ 3.

## ОРГАНІЗАЦІЯ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

### 3.1. Фагоцитарний індекс Гамбургера та фагоцитарне число Райта

Фагоцитарну активність оцінювали за такими показниками: фагоцитарний індекс Гамбургера - відсоток фагоцитів, мають поглинені частинки, від загального числа фагоцитів; фагоцитарне число

Райта - середня кількість фагоцитованих об'єктів на один фагоцит.

Індекс Гамбургера (процент нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі). Індекс Райта (середнє число мікробів, захоплених одним лейкоцитом).

Для експерименту було взято 14 статевозрілих мишей - самців, мають однаковий вік, які були довільно розділені на 2 групи по 7 особин в кожній (група 1 і група 2). Тварини містилися у віварії в стандартних умовах. Забір крові для дослідження фагоцитозу здійснювали з хвостової вени, перед початком і після закінчення експерименту у тварин обох експериментальних груп. Для моделювання стресового впливу вводили підшкірно адреналін в дозі 5 мг/кг.

Досліджували функціональну активність нейтрофілів сироватки крові мікроскопічно шляхом підрахунку загального числа клітин, що беруть участь в фагоцитозі (фагоцитарний індекс Гамбургера ФІ,%), і визначення середнього числа мікроорганізмів, поглинених одним фагоцитом (ФЧ - фагоцитарне число Райта). Як об'єкти фагоцитозу виступали пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Статистичну обробку результатів дослідження проводили на комп'ютері з використанням програми Excell. Обчислювали середнє арифметичне значення (M), помилку середнього арифметичного (m), представляли результати у вигляді  $M \pm m$ . Відмінності

між групами оцінювали за допомогою критерію Манн-Уїтні, достовірними вважалися результати при  $p \leq 0,5$ .

## **Методи фіксації лабораторних тварин**

### *1. Фіксація тварини двома руками:*

Тримайте хвіст правою рукою та зафіксувати голову лівою рукою. Спочатку потрібно схопити шкіру, а саме між великим пальцем та третім пальцем, потім обміняти третій палець із другим пальцем, таким чином щоб згиб шкіри між пальцями був під прямим кутом до шиї тварини. Такий метод дозволяє зменшити тиск на горло миші. Підняти мишу над поверхнею клітки, давши їй зачепитися передніми лапками за решітку клітки і продовжуючи м'яко витягувати вздовж тварину. Це, таким чином, не дасть можливість їй повернутися і вкусити експериментатора. Перед тим, як підняти мишу, слід перевірити щоб складка шкіри була відтягнута достатньо вперед тварини і її голова була піднята угору.

### *2. Фіксація тварини однією рукою:*

Захватити складку шкіри на голові біля вух. Мишу потрібно держати достатньо твердо. Це, таким чином, не дає можливість їй повернути голову. Потім хвіст фіксується четвертим і п'ятим пальцем руки та основою руки. Миша перевертається уверх черевцем. Фіксація миші у пластмасовій трубці із повітряними отворами у кінці.



### 3.2 Результати дослідження

Дослідження функціональної активності лейкоцитів є молоінвазійним методом визначення стану організму. Взяття лише однієї порції крові дозволяє з'ясувати різноманітні функціональні показники із використанням цитохімічних методів дослідження. Не менш інформативним, на нашу думку, є дослідження фагоцитарної активності лейкоцитів. Цей метод не потребує значної кількості біологічного зразку, дорого вартісного обладнання. Разом з тим, фагоцитарна активність є визначальною ланкою вродженого імунітету без якої неможливе функціонування адаптивного імунітету.

Таблиця 3.1

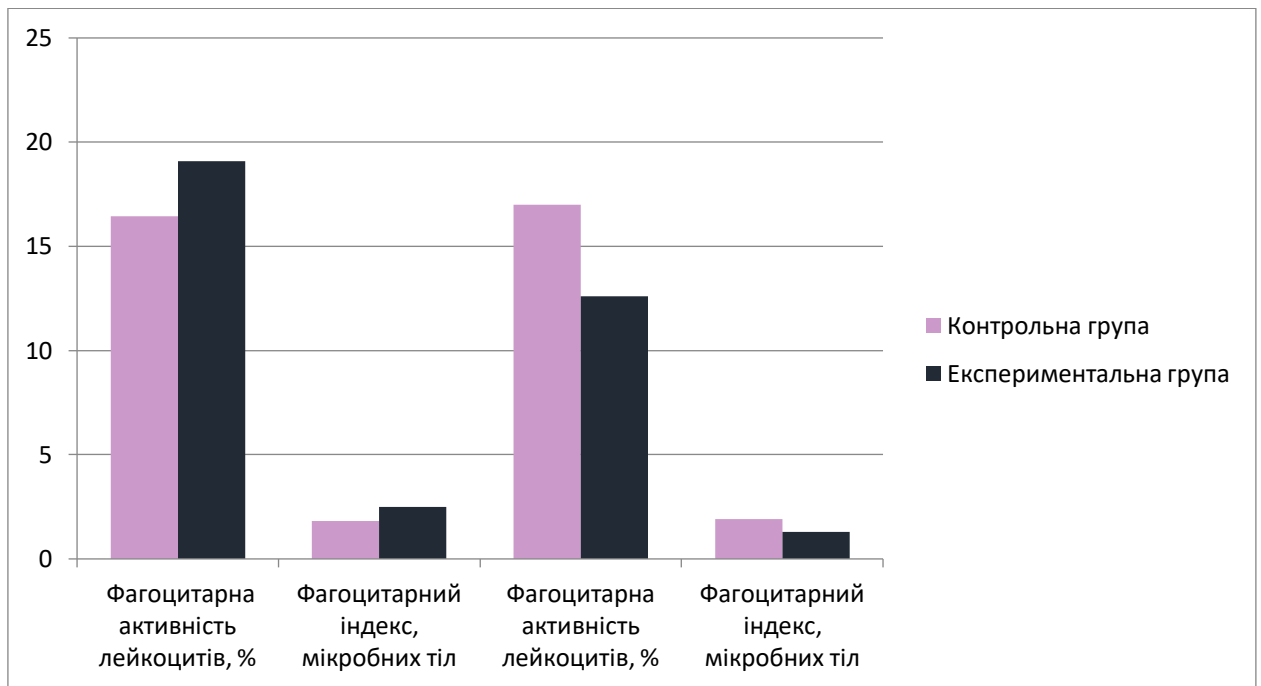
#### Показники фагоцитарної активності лейкоцитів периферичної крові під впливом адреналіну

	1 доба експерименту		10 доба експерименту	
	Фагоцитарна активність лейкоцитів, %	Фагоцитарний індекс, мікробних тіл	Фагоцитарна активність лейкоцитів, %	Фагоцитарний індекс, мікробних тіл
Контрольна група	16.43	1.81	17.0	1.9
Експериментальна (вводився адреналін)	19.1	2.5	12.6	1.3

Аналізуючи отримані дані (табл. 3.1.), ми побачили, що вихідний рівень як в контрольній, так і в експериментальній групах був приблизно однаковий. На противагу цьому, через 10 діб після уведення значної дози адреналіну (яка імітує вивільнення адреналіну під час стресової реакції) було виявлено вплив адреналінового стресу на показники фагоцитарної активності лейкоцитів.

Адреналін, який є активним гормоном (вивільнення якого активізується під впливом стресу) здатний впливати на метаболічні процеси

в організмі на рівні клітин і тканин для подальшої мобілізації захисних сил організму. Проте, виходячи з дослідження активності фагоцитозу, можна зробити інший висновок (рис. 3.1).



**Рис. 3.1. Порівняння показників фагоцитарної активності під впливом адреналінової стимуляції**

Отже, фагоцитарна активність лейкоцитів в контрольній групі зросла непомітно, а саме на 0,17%, а в експериментальній, навпаки, знизилася на 6,5%. Щодо фагоцитарного індексу, мікробних тіл в контрольній групі ми можемо спостерігати зростання на 0,09%, а в експериментальній зниження на 48%.

Таким чином, несприятливий вплив адреналінової стимуляції на фагоцитарну активність лейкоцитів периферичної крові досліджуваних груп тварин є несприятливим. Відбувається зниження показників фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу.

## ВИСНОВКИ

1. Лімфоцити поділяються на 3 групи: Т-лімфоцити, їх ще називають тимусові. Вони відповідають за клітинний імунітет (відбивається активація лізосомальних ферментів). Існує три види Т-лімфоцитів: цитотоксичні Т-клітини (підтримка сталого співвідношення різних форм лімфоцитів та блокування надмірних реакцій В-лімфоцитів), Т-клітини-хелпери (відбувається взаємодія з В-лімфоцитами, внаслідок чого відбувається їх перетворення у плазматичні клітини), Т-клітини пам'яті (В-лімфоцити, які шляхом вироблення антитіл забезпечують гуморальний імунітет. Представники В-клітин диференціюються у плазматичні клітини та В-клітин пам'яті. Нульові лімфоцити можуть перетворюватися на лімфоцити Т або В.

2. У формуванні імунітету провідну роль виконують клітини крові - лейкоцити. Норма лейкоцитів у людини міститься від 4 до 10 тис. лейкоцитів в 1 мкл крові ( $4 - 10 \times 10^9 / \text{л}$ ). Якщо надлишок їхньої кількості, то це говорить про лейкоцитоз, і навпаки, зменшення – лейкопенія. Дія лейкоцитів зазвичай у сполучній тканині різних органів. Після виходу з кісткового мозку вони циркулюють від 4 до 72 годин. Потім лейкоцити проходять крізь стінку капілярів в тканини та «розселяються» там, де знаходяться декілька днів. Усі лейкоцити самостійно пересуваються. Амебоїдний рух здійснюється білками актинового і міозинового походження, що містяться в них. Завдяки тому, що лейкоцити утворюються в кістковому мозку, вони кровотоком розносяться до всіх органів. Лейкоцити - це повноцінні цілі клітини, що мають ядро та інші досить важливі клітинні структури. За формою ядра й наявні різних включень у цитоплазмі лейкоцити поділяють на п'ять видів, співвідношення яких називають лейкоцитарною формулою.

3. Лейкоцити або білі кров'яні тільця – це повноцінні клітини, які мають ядро та інші клітинні включення. У клінічній практиці лейкоцити групують у відповідності з морфологією клітинного ядра: поліморфно-ядерні, мононуклеарні. За наявністю цитоплазматичних включень:

гранулоцити, агранулоцити. За вище зазначеними ознаками лейкоцити поділяють на 5 видів. У крові процентне співвідношення яких позначається лейкоцитарною формулою. Кількість лейкоцитів у крові не постійна, вона може змінюватися. Утворення нових лімфоцитів відбувається в червоному кістковому мозку, селезінці або лімфатичних вузлах. Основною функцією лейкоцитів є захист організму від мікроорганізмів, які проникають у кров і тканини, чужорідних білків, сторонніх тіл.

4. Цитохімічні реакції дозволяють визначити речовини, беруть участь в клітинному метаболізмі. Оцінку цитохімічних реакцій проводять на підставі підрахунку 100 клітин з урахуванням інтенсивності забарвлення цитоплазми за чотирибальною системою: інтенсивне забарвлення відповідає високому ( + + + ), середня ( + + ), помірна, слабка - незначний вміст речовини в клітині. Негативні реакції позначається як 0. При проведенні цитохімічної диференціації визначають відсоток позитивно реагуючих клітин і середній гістохімічний коефіцієнт, який обчислюється за певною формулою. Всі існуючі до останнього часу класифікації лейкоцитарних елементів будувалися за морфологічним принципом. Вони істотно не відрізнялися один від одного, і основні відмінності стосувалися номенклатури елементів системи крові. Морфологічний принцип класифікації значною мірою виправдав себе, оскільки морфологічні особливості різних клітин тісно корелюють з їх функцією.

5. Дослідження впливу адреналіну на фагоцитарну активність лейкоцитів периферичної крові виявив здатність цього гормону знижувати активність фагоцитозу. Зокрема, відбувається зниження показника фагоцитарної активності на 34 %, фагоцитарного індексу на 48% . Зазначене явище пояснюється ознаками зниження опірності організму після тривалих стресових впливів.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:**

1. Astaldi G., Verga L. Acta haematol., 1957, vol. 17, p. 129-136; Kaplow L. Blood, 1955, vol. 10, № 10, p. 1023-1029.
2. Абрамов М. Г. Гематологический атлас.- М.: Медицина, 1979. 279 с.; 1985-344 с.
3. Алексеев Г. А., Берлинер Г. Б. Гемоглобинурии.- М.: Медицина, 1972.- 248 с.
4. Алмазов В. А., Афанасьев Б. В., Зарицкий А. Ю. и др. Лейкопении.- Л.: Медицина, 1981.---240 с.
5. Бажора Ю. И., Тимошевский В. Н., Протченко П. З., Головченко А. Н. Лаб. дело, 1981, No 4, с. 198---200; Нагоев Б. С., Лаб. дело, 1983, No 8, 7-11; Park B. H., Flrkig S. M., Smitwick E. M. Lancet, 1968, vol. 2, p. 532-534; Stuart J., Gordon K, Lee T. J. Histochem. Cytochem., 1975, vol. 7, p. 477.
6. Буйкис И. М., Руденс Ю. Ф. Гистохимическое определение активности щелочной фосфатазы методом одновременного азосочетания.- Вопросы лейкологии (Рига), 1969, No 1, с. 369 - 376; Шубин М. Г.- Лаб. дело, 1965, No 1, с. 10 -14; Шубин М. Г., Нагоев Б. С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии.- М.: Медицина, 1980, с. 41; Kaplow L. Blood, 1955, vol. 10, No 10, p. 1023-1029.
7. Вилков И. Н. Патология лимфатических узлов/Пер. с болг.- София: Медицина и физкультура, 1980.- 246 с.
8. Грибова И. А. Гематологическая норма. – В кн.: Руководство по гематологии/ Под ред. А. И. Воробьева, Ю. И. Лорие. М.: Медицина, 1979, с. 53.
9. Золотницкая Р. П. Лаб. дело., 1983, № 5, с. 36-38.
10. Идельсон Л. И. Гипохромные анемии.- М.: Медицина, 1981,- 190 с.
11. Кассирский И. А. Физиологические нормы лейкоцитов и проблема leucopenia innocens / И. А. Кассирский, Д. И. Денщикова, 1974. – 144 С.

12. Козинец Г. И. «Кровь и инфекция» / Г. И. Козинец и др. - М., 2001.- 456 С.
13. Мазинг Ю. А., Старосельская И. Я. Лаб. дело, 1981, No 10, стр. 582 - 584; Нагоев Б. С. Катионный белок лейкоцитов и его значение: Методические указания.- Нальчик, 1982. - 67 с.; Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А. Лаб. дело, 1981, No 10, с. 579 - 582; Шубин М. Г. Цитология, 1974, No 10, с. 1321 - 1322.
14. Мамаева Н. Н. Гематология: книга / Н. Н. Мамаева, С. И. Рябова. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2008. – 616 С.
15. Морозова В. Т. Лабораторная диагностика лейкозов.- Л.: Медицина, 1977.- 152 с.
16. Нарциссов Р. П. Арх.анат., 1969, No 5, с. 85 - 91; Nachlas M. M. et al.j. Histochem., Cytochem., 1957, vol. 5, p. 420 - 436; Quaglini D., Nayhoe F. Nature, 1960, vol.187, No 4731, p. 85 - 86.
17. Нарциссов Р. П. Лаб. дело, 1964, No 3, с. 150 - 151; Шафран М. Г., Пигаревский В. Е., Блинова Э. И. Цитология, 1979,т. 21, No 10, с. 1206 - 1208; Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. - София, 1963, с. 468.
18. Нормальна фізіологія. Підручник за ред. проф. Філімонова В. І. — К.: Здоров'я, 1994. — 608 с., іл. : 3,71 арк. іл.
19. Поспелова Р. А. Лейкоконцентрация в клинической практике. – М., 1973, с. 22.
20. Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника.--- М., 1957, с. 257.
21. Руденс Ю. Ф., Буйкис И. М. Лаб. дело., 1971, No 10, с. 592; Moloney W. C. et al. J. Histochem. Cytochem., 1960, vol. 8, p. 200 - 207; Schmalzl F.\ Braunsteiner H. Klin. Wschr., 1968, Bd 46, H. 12, S. 642 - 650.
22. Судаков К. В. «Нормальная физиология» / К. В. Судаков – Медицинское информационное агенство, 2006. 398 С.

23. Теодорович В. П., Абдулкадыров К. М. Трепанобиопсия костного мозга при некоторых гематологических заболеваниях.- Л.: Медицина 1977.- 95 с.
24. Філімонов В. І. «Фізіологія людини» / В. І. Філімонов - Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2015. – 448 С.
25. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия: Пер. с англ./Под ред. Н. С. Кисляк.- М.: Медицина, 1983.- 319 с.
26. Шабдаш А. Л. Изв. АН СССР; серия биол., 1947, No 6, с. 745 - 760; Шабдаш А. Л. Докл. АН СССР, 1949, т. 68, No 2, с. 389 - 392.
27. Dahmen G.P. Skrodies: Extracorporeal stoss wellen therapia (ESWT) in knochennahen weichteil bevei chander Schulter // Extracta Orthoped. – 1992. – №11. – P. 25-27.
28. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe (Strasbourg, 18.03.1986). – Strasbourg, 1986. – 52 p.