МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

СТАСИШЕНА ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

Допускається до захисту:
завідувача кафедри біофізики і фізіології
кандидат хім. наук, доцент
_____ О. І. Доценко
«____» _____ 20___ р.

МАРКЕРИ ЗАПАЛЕННЯ В КРОВІ ЛЮДИНИ ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ ТА ОЖИРІННЯМ

Спеціальність 091 Біологія
Кваліфікаційна (магістерська) робота

Науковий керівник:
О. В. Єрмішев
_____

Оцінка: _____ / _____ /
_____
Голова ЕК: _____

Вінниця 2022

АНОТАЦІЯ

Стасишена І. В. Маркери запалення в крові людини та їх зв'язок з метаболічним синдромом та ожирінням. Спеціальність 091 «Біологія», Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2022. У кваліфікаційній (магістерській) роботі досліджено маркери запалення в крові людини, їх зв'язок з ожирінням та метаболічним синдромом. Показано залежність кількісних показників С-реактивного білку, глюкози, α-амілази та лейкоцитів, їх співвідношення з індексом маси тіла і показниками артеріального тиску. Встановлено залежність зростання маркерів запалення в крові людини, за наявності та прогресування метаболічного синдрому.

Ключові слова: метаболічний синдром, ожиріння, маркери запалення, кров.

41 с., 8 табл., 33 джерела.

Stasyshena I.V. Markers of inflammation in human blood and their relationship with metabolic syndrome and obesity. Specialty 091 "Biology", Educational program "Biology". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2022.

Markers of inflammation in human blood, their relationship with obesity and metabolic syndrome were investigated in the qualification (master's) thesis. The dependence of quantitative indicators of C-reactive protein, glucose, α-amylase and leukocytes, their relationship with body mass index and blood pressure indicators is shown. The dependence of the growth of inflammatory markers in human blood on the presence and progression of the metabolic syndrome was established.

Keywords: metabolic syndrome, obesity, markers of inflammation, blood.

41 p., 8 tabl., 33 Bibliography items.

ЗМІСТ

ВСТУП 4

РОЗДІЛ І. ЗМІНИ В СИСТЕМІ КРОВІ ПРИ СТРЕСІ. МЕТАБОЛІЧНИЙ СИНДРОМ 5

1.1 Загальні відомості про метаболічний синдром 5

1.2 Маркери запалення при метаболічному синдромі у системі крові(С-реактивний протеїн, α-амілаза) 12

РОЗДІЛ ІІ. МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ 14

2.1 Визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом 14

2.2 Підрахунок кількості лейкоцитів в крові в камері Горяєва 18

2.3 Індекс маси тіла 18

2.4 Визначення активності α-амілази 19

2.5 Імуноферментний аналіз для кількісного високочутливого визначення С-реактивного білка у сироватці та плазмі людини 22

2.6 Статистична обробка результатів 27

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 29

ВИСНОВКИ 35

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПОСИЛАНЬ 37

ВСТУП

Актуальність теми: На сьогодні метаболічний синдром є однією з широко обговорюваних проблем в сучасній біології та медицині. Останнім часом чітко спостерігається зростання поширеності ожиріння, цукрового діабету 2 типу, захворювань серцево-судинної системи. Метаболічний синдром є однією з основних проблем у галузі охорони здоров'я нашого століття. Цей синдром, у розвитку якого беруть участь урбанізація, модифікація способу життя, пов'язана з гіподинамією, нераціональним харчуванням, підвищенням рівня калорійності харчових продуктів і зростанням стресових навантажень, привертає особливу увагу у зв'язку з прогресивною тенденцією до «омолодження» населення з даною патологією. [3] Також про актуальність та необхідність подальшого вивчення проблеми, і пошуку вирішення питань, що стосуються його раннього виявлення та попередження є наявність великої кількості літературних даних та результатів досліджень в цьому напрямку. [2, 5, 13] Вони у свою чергу вказують на те, що показники смертності від серцево-судинних ускладнень в осіб з метаболічним синдромом залишаються високими. Метаболічний синдром становить сукупність генетичних, фізіологічних, біохімічних чинників, прояком яких є розвиток інсулінорезистентності, дисліпідемії, вісцерального ожиріння, артеріальної гіпертензії тощо. Проблема вивчення його актуальна у зв'язку з ранньою інвалідизацією, передчасною старістю і смертністю. [6]

Завдання даного дослідження: - дослідити кореляційні зв'язки між показниками маркерів запалення в крові обстежуваних

- показати вагомість способу життя як основи розвитку метаболічного синдрому

Об'єкт дослідження: кров.

Предмет дослідження: залежність зміни показників С-реактивного протеїну, α-амілази, рівня лейкоцитів від хронічного стресу, викликаного постійним підвищеним рівнем глюкози та ожирінням.

Методи дослідження: аналіз наукової літератури, визначення індексу маси тіла та окружності талії людей, а також кількісне визначення показників крові за допомогою лабораторних методик та обладнання.

Структура та обсяг роботи: загальний обсяг роботи становить 41 сторінку. Робота складається з вступу, 1 розділу (2 підрозділи), 2 розділу (6 підрозділів), 3 розділу, висновків та списку використаних джерел.

РОЗДІЛ І. ЗМІНИ В СИСТЕМІ КРОВІ ПРИ СТРЕСІ. МЕТАБОЛІЧНИЙ СИНДРОМ

1.1 Загальні відомості про метаболічний синдром

Метаболічний синдром є однією з найскладніших медико-соціальних проблем. Мета-аналіз широкомасштабних досліджень показав, що в популяції дорослого населення синдром діагностується від 10% в Китаї до 24% у США. За результатами досліджень у віковому діапазоні у жінок 30-39 років метаболічний синдром був виявлений у 1%, в 40-49 років у – 3,6% , у 50-59 років – 9%, 60-69 років – у 7% респондентів. Зацікавленість проблемою метаболічного синдрому виникла більше 80 років тому.[24] Ще в 1922 році професор Г. Ф. Ланг відзначав наявність тісного зв’язку артеріальної гіпертензії з ожирінням, порушеннями вуглеводного обміну і подагри. У таких людей дуже рано розвиваються ішемічна хвороба серця і атеросклероз коронарних судин. З 1948 по 2002 рік відбулася еволюція уявлень про метаболічний синдром – від стану, що підвищує ризик розвитку цукрового діабету 2 типу, до розуміння безперервного і нерозривного зв’язку між порушенням вуглеводного, ліпідного та пуринового обмінів, регуляцією артеріального тиску і рівнем серцево-судинного ризику. [13] Довгий час вважалося, що метаболічний синдром – це доля осіб переважно середнього та похилого віку, частіше зустрічається у чоловіків. Проте дослідження останніх років показують небезпечну тенденцію до «омолодження» цієї проблеми. [8]

Метаболічний синдром – сукупність генетичних, фізіологічних, біохімічних чинників, проявом яких є розвиток інсулінорезистентності, дисліпідемії, вісцерального ожиріння, артеріальної гіпертензії, ендотеліальної дисфункції. Його ще називають синдром Х – це свого роду розплата за нашу урбанізацію: гіподинамію,

неправильне харчування та малорухливий спосіб життя, який у подальшому може обернутися серйозними проблемами для здоров'я.[12]

Про наявність метаболічного синдрому можна говорити, якщо у людини є не менше трьох з наступних симптомів: надмірна вага (абдомінальне ожиріння), артеріальна гіпертензія, підвищення рівня цукру в крові, дисліпідемія (зміна співвідношень ліпідів у крові), ранній атеросклероз, ішемічна хвороба серця, подагра, підвищення рівня чоловічих статевих гормонів у жінок. У розвитку синдрому Х чітко простежується спадкова схильність. Спадкові чинники ризику можуть полягати в конституційних особливостях складу м'язових волокон, розподілі жиру, активності і чутливості до інсуліну основних ферментів вуглеводного і жирового обміну.[10]

У раціоні сучасної людини стало більше оброблених харчових продуктів, що вимагають для приготування значної кількості олії, а також страв, багатих на легкозасвоювані вуглеводи. Крім того, близько 30 – 40% хворих з ожирінням мають харчові порушення, серед яких найбільш часто зустрічаються гіперфагічна реакція на стрес, компульсивна гіперфагія, вуглеводна спрага і передменструальна гіперфагія.[24] Гіперфагічна реакція на стрес як харчове порушення проявляється тим, що при психоемоційному напруженні, хвилюванні або відразу після закінчення дії фактору, що викликав стрес, у людини різко посилюється апетит, і з'являється бажання поїсти. Схильність до розвитку ожиріння полягає в зниженні здатності до окислення жирів.[7] Одна з можливих причин – стан м'язів і склад м'язових волокон. Основна маса жиру в організмі окислюється в м'язовій тканині. В її повільних і швидких оксидативних волокнах, тоді як швидкі гліколітичні волокна в м'язах позбавлені здатності окислювати жир, і якщо переважають волокна цього типу, то здатність до окислення ліпідів буде знижена.[19]

Гіподинамія – другий за значимістю, після переїдання, фактор зовнішнього середовища, що сприяє розвитку ожиріння та інсулінорезистентності. При гіподинамії сповільнюються ліполіз та утилізація тригліцеридів у м'язовій та жировій тканинах, знижується транслокація транспортерів глюкози у м'язах, що призводить до розвитку інсулінорезистентності. [6,23]

Артеріальна гіпертензія є одним із проявів метаболічного синдрому. Тривала гіпертензія викликає погіршення периферичного кровообігу, що призводить до зниження чутливості тканин до інсуліну і, як наслідок, до відносних гіперінсулінемії та інсулінорезистентності. [19]

Порушення метаболізму є першоосновою всіх змін і грунтується на існуванні певних обмежень у взаємних перетвореннях вуглеводів, жирів і білків, а саме: обмежені зворотні перетворення з вуглеводів у жири, за рахунок гліцерину; використання вуглецевого скелета, принаймні, 3/4 амінокислот для глюконеогенезу та залучення вуглеводних структур в біосинтез лише замінних амінокислот; здатності амінокислот це скелет перетворювати частково або повністю в ацетил-КоА, і таким чином, служити матеріалом для синтезу жирних кислот.[31] Ці обмеження поглиблюються при інсуліновій недостатності за рахунок зміни активності ряду ключових ферментів обміну речовин, які каталізують фосфорилювання глюкози і фруктозо-6-фосфату, синтез глікогену з УДФ-1-глюкози, фосфорилювання глюкози, фосфоролізу глікогену до глюкозо-1-фосфату, дефосфорилювання глюкозо-6-фосфату шляхом гідролізу до вільної глюкози, перетворення амінокислот на α-кетокислоти за допомогою реакцій переамінування та окислювального дезамінування, зворотнє прехоплення піровиноградної кислоти у фосфоєнол-піруват, ліполіз тригліцеридів, утворення ацетонових тіл з ацетил-КоА. [30]

Окрім регуляторів, які втручаються в метаболічні процеси на рівні ферментних реакцій, існує вплив гормонів, пов’язаний з їх викидом в кровоносне русло. Так, адреналін і норадреналін збільшують швидкість ліполізу в жировій тканині за рахунок стимуляції аденілатциклази адипоцитів і синтезу цАМФ. Дія глюкагону подібна до дії катехоламінів. Інсулін має дію, протилежну адреналіну і глюкагону на ліполіз і мобілізацію жирних кислот. Соматотропний гормон, адренокортикотропний гормон також мають стимулюючий вплив на ліполіз, збільшуючи вміст жирних кислот у плазмі крові.[33]

Жирова тканина має ауто-, пара- і ендокринну функцію та секретує «адипоцитокіни», яким властиві різні біологічні дії, які можуть (при їх надлишку – ожирінні),

викликати розвиток супутніх ожирінню ускладнень, у тому числі інсулінорезистентність: лептин, фактор некрозу пухлини-α (TNF- α), інгібітор-1 активатора плазміногену (PAI), протеїн, який стимулює ацилірування (ASK), інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, ангіотензин-II, резистин, адипонектин, адипсин, адипофілін. Багато дослідників розглядають TNF- α, як медіатор інсулінорезистентності при ожирінні. TNF- α знижує активність тирозинкінази інсулінового рецептора, гальмує експресію внутрішньоклітинних переносників глюкози ГЛЮТ-4 в м'язовій і жировій тканині. [17] Гормон лептин – це «голос» жирової тканини, який регулює харчову поведінку, впливаючи на центр насичення в гіпоталамусі. До фізіологічних ефектів лептину належать: підвищення тонусу симпатичної нервової системи, посилення термогенезу в адипоцитах, зниження синтезу інсуліну, зниження транспорту глюкози. Виявлено стимулюючу дію лептину на секрецію гонадотропінів. Ожиріння може бути пов'язане з дефіцитом лептину та лептинорезистентності. Кількість інсуліну і лептину в циркуляторному руслі прямо пропорційно масі жирових відкладень, і їх називають «сигналами ожиріння». Підвищений рівень лептину при лептинорезистентності і метаболічному синдромі обумовлює розвиток гормональної дисфункції і вісцерального ожиріння.[25]

Ключовим моментом у первинних метаболічних порушеннях є формування інсулінорезистентності. [4]Під інсулінорезистентністю наразі розуміють первинне, селективне і специфічне порушення біологічної дії інсуліну, що супроводжується зниженням споживання глюкози тканинами (переважно скелетними м'язами) і приводить до хронічної гіперінсулінемії. Селективний характер інсулінорезистентності означає, що окремі ефекти інсуліну зберігаються, наприклад, реабсорбція натрію в ниркових канальцях або вплив на симпатичний відділ нервової системи. [16]

Практично всі компоненти метаболічного синдрому є факторами ризику розвитку серцево-судинних захворювань, а в поєднанні багаторазово прискорюють їх розвиток. Причому поєднання окремих компонентів можуть розглядатися в рамках синдрому Х тільки при наявності інсулінорезистентності. [20]Зрозуміло, не всі компо-

ненти метаболічного синдрому зустрічаються одночасно. Яким фенотипом проявиться метаболічний синдром, залежить від взаємодії генетичних факторів та зовнішнього середовища. [27]

Основними механізмами, що приводять до підвищення артеріального тиску при метаболічному синдромі, є гіперволемія, обумовлена підвищеною реабсорбцією натрію в проксимальних канальцях нирок і яка викликає підвищення серцевого викиду; активація симпатичної нервової системи, яка також викликає зростання серцевого викиду та призводить до спазму периферичних судин і підвищення загального переиферичного опору судин.[2] Під впливом інсуліну відбувається підвищення вироблення ендотелієм вазоконстрикторних біологічно активних речовин – ендотеліну, тромбоксану A_2 і зниження секреції потужних вазодилататорів, як простациклін і оксид азоту.[12] Крім того, обговорюється ще одна теорія патогенезу артеріальної гіпертензії при ожирінні. У якій зростання артеріального тиску обумовлене підвищенням рівня лептину у цих хворих. Його рівень міцно корелює з індексом маси тіла. Лептин регулює відчуття насичення на рівні дугоподібного ядра гіпоталамуса, який тісно пов'язаний з паравентрикулярним ядром, стимуляція якого призводить до активації симпатичної нервової системи. Крім того, слід мати на увазі, що при дисліпідемії, у людей з метаболічним синдромом, можуть виникати атеросклеротичні зміни ниркових артерій, що призводять до розвитку реноваскулярної артеріальної гіпертензії.[9]

Розглянемо основні механізми впливу хронічної гіперінсулінемії на артеріальний тиск:

- блокує трансмембранні іонообмінні механізми (Na+ , K+ і Ca2+ -залежної АТ-Фази), підвищуючи тим самим вміст внутрішньоклітинного Na+ і Ca2+ , зменшуючи вміст K+ , що приводить до збільшення чутливості судинної стінки до пресорних впливів;[23]
- підвищує реабсорбцію Na+ в проксимальних і дистальних канальцях нефрону, сприяючи затримці рідини та розвитку гіперволемії, а також підвищенню вмісту Na+ і Ca2+ в стінках судин;[23]

- стимулює проліферацію гладком’язових клітин судинної стінки, що несе за собою звуження артеріол і збільшення судинного опору; [23]
- стимулює активність симпатичної нервової системи, що призводить до збільшення судинного тонусу; [23]
- стимулює активність ренін-ангіотензинової системи. [23]

Ці ефекти в сукупності сприяють підвищенню артеріального тиску.

З іншого боку, можливий механізм, за допомогою якого артеріальна гіпертензія може сама сприяти розвитку інсулінорезистентності. Збільшення активності симпатичної нервової системи, що виникає при АГ, викликає зниження об’ємного кровопотоку в капілярах скелетної мускулатури в результаті їх вазоконстрикції, що збільшує шлях дифузії глюкози до клітин і приводить до інсулінорезистентності.[6]

Ендотелій судин має метаболічну та секреторну активність і відіграє ключову роль в регуляції тонусу і проникності судин. Унікальне положення клітин ендотелію на кордоні між циркулюючої кров’ю і тканинами робить їх найбільш уразливими для різних патогенних факторів, що знаходяться в системному і тканинному кровообігу.[1,7]

В даний час є дві основні точки зору щодо формування ендотеліопатії. Перша, що при синдромі ІР розвивається дисфункція ендотелію судин і, зокрема, порушується синтез оксиду азоту в судинній стінці (оксид азоту є потужним вазодилататором). Він робить стримуючий вплив на проліферацію гладком’язових клітин, гальмує адгезію моноцитів до ендотелію судинної стінки, знижує перекисне окислення ліпідів, тобто охороняє стінки судин від ушкодження.[14] Існує також думка, що дисфункція ендотелію є не наслідком, а причиною в розвитку ІР, одним з первинних дефектів, що лежать в основі її розвитку. У разі первинного дефекту ендотеліальних клітин трансендотеліальний транспорт інсуліну порушується, що може сприяти розвитку ІР.[19] Однак, до теперішнього часу не отримано достатньо даних на користь первинної або вторинної ролі ендотеліопатії в генезі інсулінорезистентності. ‘Інсулінорезистентність та гіперінсулінемія є одними з основних факторів, що ведуть до розвитку цукрового діабету 2 типу, особливо у осіб із спадко-

вою схильністю. Відомо, що одними з найважливіших наслідків інсулінорезистентності є підвищення рівня інсуліну у крові й гіперглікемія. В умовах інсулінорезистентності відбувається зниження утилізації глюкози периферичними тканинами, підвищується продукція глюкози печінкою, що сприяє розвитку гіперглікемії. [26] При адекватній здатності b-клітин реагувати на підвищення глюкози в крові компенсаторною гіперінсулінемією зберігається нормальний рівень глюкози у периферичній крові. Однак, постійна стимуляція b-клітин у поєднанні з ймовірними генетичними порушеннями, що впливають на їх функціональні можливості, і впливом підвищеної концентрації вільних жирних кислот на b-клітини (феномен ліпотоксичності), сприяють розвитку секреторної дисфункції b-клітин, прогресуючого порушення секреції інсуліну. З часом, розвивається порушення толерантності до глюкози і розвивається ЦД 2 типу. При розвитку ЦД 2 типу виникає гіперглікемія, яка сприяє подальшому прогресуванню порушення секреції інсуліну b-клітинами (феномен глюкозотоксичності) і збільшенню периферичної інсулінорезистентності. [28]

При синдромі інсулінорезистентності також порушується функція ендотелію судин і, зокрема, зменшується синтез оксиду азоту в судинній стінці (оксид азоту є потужним вазодилататором). [16]Оксид азоту стримує проліферацію гладком'язових клітин, гальмує адгезію моноцитів до ендотелію судинної стінки, знижує перекисне окислення ліпідів, тобто охороняє стінки судин від ушкодження. Тому розвивається дисфункція ендотелію, яка сприяє прискоренню розвитку атеросклеротичних пошкоджень судин. За даними літератури, серед хворих з метаболічним синдромом смертність від ІХС у 2-3 вище, ніж у загальній популяції. Таким чином, інсулінорезистентність і гіперінсулінемія при метаболічному синдромі самостійно або опосередковано (через супутні метаболічні порушення), мають додатковий патологічний вплив на серцево-судинну систему, що, в кінцевому підсумку, прискорює розвиток атеросклеротичних судинних захворювань.[21]

Основними проявами метаболічного синдрому є:

- абдомінально-вісцеральне ожиріння;
- артеріальна гіпертензія;

- інсулінорезистентність та гіперінсулінемія;
- дисліпідемія;
- порушення толерантності до глюкози / цукровий діабет другого типу;
- ранній атеросклероз/ішемічна хвороба серця;
- порушення гемостазу;
- подагра;
- мікроальбумінурія, гіперандрогенія.[10,12]

Практично всі складові метаболічного синдрому є встановленими факторами ризику розвитку серцево-судинних захворювань, а їх поєднання багаторазово прискорює їх розвиток. Причому поєднання окремих компонентів синдрому можуть розглядатися в рамках метаболічного синдрому тільки при наявності інсулінорезистентності. Порушення, об'єднані рамками метаболічного синдрому, тривалий час мають безсимптомний перебіг, однак, нерідко починають формуватися ще в підлітковому і юнацькому віці.[10]

1.2 Маркери запалення при метаболічному синдромі у системі крові(С-реактивний протеїн, α-амілаза)

С-реактивний білок – білок що міститься у сироватці крові у дуже невеликій кількості, та є компонентом неспецифічної імунної відповіді. Синтез даного білка відбувається у печінці, де під час важких запальних процесів, що вимагають планової або термінової медичної допомоги, у перші шість-дванадцять годин може збільшуватися у сотні разів. Період напіввиведення СРБ становить дванадцять-двадцять чотири години.[15] Рівень СРБ підвищується при: запальних та пухлинних процесах, руйнуванні тканин, станах після операцій.

С-реактивний білок є класичним гостофазним білком. Він синтезується в печінці і складається з п'яти однакових поліпептидних ланцюгів. CRP є найбільш чутливим з реактантів гострої фази, його концентрація швидко збільшується протягом запального процесу. Відповідь С-реактивного білку часто передує появі клінічних симптомів, в тому числі лихоманки. У здорових людей СРБ є слідовим білком. Після прояву гострофазної відповіді концентрація СРБ сироватки швидко і значно підвищується. Доведено, що CRP в крові - це індикатор гострої

фази патологічних і запальних станів. Він практично миттєво реагує на зміни в організмі. Його кількість підвищується майже відразу у відповідь на захворювання, травму і також швидко знижується при нормалізації стану.[17]

Аналіз крові на СРБ допомагає:

- виявити приховані, уповільнені запальні процеси без явних ознак прояву;
- визначити пухлинні утворення (білок в цих випадках буде постійно підвищений);
- розпізнати аутоімунні захворювання;
- відрізнити серцевий напад від інфаркту міокарда (в останньому випадку показники підвищуються);
- допомагає виявити хронічні вогнища запалення, які можуть роками не турбувати пацієнта;
- діагностувати патологічні порушення в судинній системі;
- спрогнозувати можливі ускладнення при гіпертонічній і ішемічній хворобах серця.

Альфа-амілаза виробляється підшлунковою залозою і секретується в кишковий тракт через систему її проток. Визначення альфа-амілази в сечі є основним показником функціонального стану підшлункової залози. Підвищення активності альфа-амілази в сечі відбувається паралельно збільшенню її в крові.[8] Після перенесеного нападу панкреатиту активність ферменту в крові швидко нормалізується, в сечі вона залишається підвищеною до 7 діб. Панкреатична альфа амілаза - фермент, який здійснює розщеплення полісахаридів (глікоген, крохмаль). Фермент потрапляє в кров в результаті відновлення клітин підшлункової і слинних залоз. Синтезується в підшлунковій залозі. Різке зростання активності цього ферменту в сироватці крові характерне для гострих панкреатитів.[2,16]

Гострий панкреатит є найчастішою причиною підвищення панкреатичної амілази, що дозволяє вважати аналіз на панкреатичну амілазу одним з необхідних лабораторних тестів для діагностики цього захворювання.

Підвищений вміст панкреатичного ферменту в крові може також свідчити про порушення роботи кишечника, яєчників, бронхів, при патологіях скелетної мускулатури.[16]

РОЗДІЛ ІІ. МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом

Призначення: набір застосовують для визначення концентрації глюкози у цільній крові (плазмі), сироватці крові та сечі людини в клініко-діагностичних та біохімічних лабораторіях, науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на 50 макро-, 100-напівмікро, чи 200 мікровизначень (сумарний об'єм робочого розчину 200 мл) з урахуванням холостих та калібрувальних проб. Діапазон отримуваних концентрацій – від 0,056 ммоль/л до 25 ммоль/л або від 10 мг/л до 4500 мг/л. Коефіцієнт варіації визначення – не більше 5%.

Зберігання набору – при температурі від плюс 2ºС до плюс 16ºС. Гарантійний термін придатності набору – 24 місяці від дня виготовлення. Набір призначений для застосування in vitro професійно навченим лаборантом. Принцип методу: глюкоза в присутності глюкозооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хініміна червоно-фіолетового забарвлення, який визначається фотометрично.

Склад набору: 1. Ензими (розчин)

- пероксидаза (2200 ± 220) U/л;
- β,D-глюкозооксидаза (18000 ± 1800) U/л;
- 4-амінофеназон (110 ± 11) мг/л;
- стабілізатори, активатори.

2. Буферний розчин: - 1 флакон з (100 ± 2) мл або 2 флакони по (50 ± 2) мл;

- фосфатний буфер (pH 7,2 – 7,4) (0,10 ± 0,01) моль/л;
- фенол (190 ± 19) мг/л;
- стабілізатори.

3. Антикоагулянт: 1 флакон або пакет.

4. Калібрувальний розчин глюкози ((10,0 ± 0,5) ммоль/л або (1802 ± 90) мг/л)) – 1 ампула з (5,0 ± 0,5) мл.

Обладнання: 1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі (500-550) нм в діапазоні (0 – 1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 5 мм або 10 мм.

2. Водяний термостат або автоматична водяна баня, здатні підтримувати температуру (плюс 37 ± 1ºС) у випадку проведення аналізу при цій температурі. Можливе використання сухоповітряного термостата з механічною циркуляцією повітря.

3. Колба мірна ємністю 200 мл., колба ємністю 500 мл., пробірки місткістю 20 мл (ДСТУ 1770-74).

4. Піпетки місткістю 0,1 і 5 мл. (ДСТУ 29227-91).

Зразок для аналізу: сироватка, плазма (гепаринізована, ЕДТО, оксалатна, фторидна), сеча. Концентрація глюкози стабільна протягом 24 годин при температурі від +2ºС до +8ºС, за умови, що сироватка або плазма приготовлені не пізніше 30 хв. після забору крові. Якщо вміст глюкози в сироватці крові або плазмі вище 25 ммоль/л, її необхідно розбавити фізіологічним розчином у 5 разів і повторити дослідження. При високому вмісті глюкози у сечі останню необхідно розбавити в 50 разів.

Приготування робочих розчинів: Розчин антикоагулянту. Вміст флакону з антикоагулянтом кількісно переносять до мірної колби на 200 мл., доводять розчин до мітки дистильованою водою. Отриманий розчин переносять у поліетиленову ємність місткістю 500 мл. В ту саму мірну колбу на 200 мл. наливають до мітки дистильованої води. Об’єднують цей розчин з розчином у ємності місткістю 500 мл. Ретельно перемішують. Готовий розчин стійкий не менше місяця при температурі від 0ºС до +8ºС.

Для приготування монореагенту на глюкозу змішують Буферний розчин і Ензими в співвідношенні 1:1 (рекомендується дотримуватися обговореного порядку змішування розчинів). Отриманий розчин стійкий не менше двох тижні0в при зберіганні в ємності з темного скла і температурі від +20ºС до +25ºС або одного місяця при температурі від +2ºС до +8ºС. При збереженні розчину допускається зміна його забарвлення до слабо-рожевого кольору, що на результатах аналізів не позначається.

Для використання набору у варіанті біреагенту розчини готові до використання і стабільні до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов зберігання, зазначених на упаковці).

Контроль якості: для контролю ходу реакції і процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями, визначеними даним методом. Наприклад: «Ліонорм» (Чехія), «ФілоНорм» та «ФілоПат» (Україна).

Інтерференція: Ліпемія (тригліцериди вище 1, 25 г/л), гемоліз (гемоглобін вище 5 г/л), білірубін вище 100 мг/л впливають на результат визначення. На хід визначення також можуть впливати деякі ліки і речовини (наприклад: ацетамінофен, N-ацетилцистеїн, метамізол приводять до отримання фальшиво занижених результатів).

Застережні заходи: при роботі застосовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити. Буферний розчин включає фенол (отруйна речовина).

Проведення аналізу цільної крові з використанням стабілізатора: 0,1 мл цільної крові змішують з 0, 9 мл розчину антикоагулянту та центрифугують 10 хв при 2000 об/хв або 5 хв при 3000 об/хв для осадження еритроцитів. Для аналізу використовують надосадову рідину. Калібрувальний розчин глюкози розбавляють у 10 разів (0,1 мл калібрувального розчину глюкози 10 ммоль/л змішують із 0,9 мл фізіологічного розчину). Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною нижче в таблиці 1.

Варіант аналізу з використанням монореагенту						
Виміряти у пробірку, мл	Калібр, або дослідна проба			Холоста проба		
	Макро	Напів-макро	Мікро	Макро	Напів-макро	Мікро
Розведений калібрувальний розчин або надосадова рідина	0,40	0,20	0,10	-	-	-
Фізіологічний розчин	-	-	-	0,40	0,20	0,10
Монореагент	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00

(*Таблиця 1)*

Реагенти змішати, витримати 20 хв. при кімнатній температурі (від +18 ºС до +25 ºС), або 12 хв. при температурі плюс 37 ºС.

Вимірюють оптичну щільність калібрувальної (Екал) та дослідної проби (Едосл) проти холостої проби. Забарвлення стабільне протягом (60±2)хв, проби фотометрують.

Розрахунок концентрації глюкози проводять за формулою (1):

$$C=\frac{Едосл}{Е\ кал}\times К\times 10\{(180)\} \quad (1)$$

С – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л (мг/дкл);

10 (180) – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л (мг/дкл);

Едосл – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

Екал – оптична щільність калібрувальної проби, од.опт. щільності.

К – коефіцієнт розведення.

Утилізування: всі зразки аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню

відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил. Паперова упаковка здається в макулатуру, виполоскана тара – в сортоване сміття.

2.2 Підрахунок кількості лейкоцитів в крові в камері Горяєва

Камера Горяєва є спеціальним монолітним предметним склом, призначеним для підрахунку кількості клітин в заданому об'ємі рідини. Вона широко застосовується в області клінічних та біомедичних досліджень.

При роботі з камерою важливо стежити, щоб її робочі поверхні залишалися сухими і чистими. Перш ніж приступити до лабораторного дослідження потрібно ретельно протерти камеру Горяєва невеликим шматочком чистого бинта, злегка змоченого в спирті, не використовувати вату, оскільки вона може залишати волокна. Таким же чином слід обробити покривне скло.

Для підрахунку лейкоцитів в камері Горяєва кров розводять 20 разів 3% розчином оцтової кислоти. Для цього в пробірку за допомогою піпеток послідовно додають 0,4 мл (0,4 мкл) 3% розчину оцтової кислоти і 20 мкл крові. Через кілька хвилин отриманий розсин з лейкоцитами (еритроцити гемолізуються оцтовою кислотою) заповнюємо камеру Горяєва і проводимо підрахунок кількості лейкоцитів в 100 великих (незаштрихованих) квадратах сітки Горяєва. Розрахунок кількості лейкоцитів на 1 л крові проводимо за формулою (2):

$$X=\frac{A\times 20\times 4000}{1600}\times 1000000 \text{ , де} \qquad (2)$$

X – кількість лейкоцитів в 1 л крові; A – сума лейкоцитів в 100 великих квадратах камери; 20 – ступінь розведення крові; 4000 і 1600 – параметри камери Горяєва. Після скорочення величин підрахунок кількості лейкоцитів можна здійснювати за формулою: $X= A\times 50/\mu l = A\times 50\times 10^6/л$.

2.3 Індекс маси тіла

Надмірна вага й ожиріння – результат формування аномальних або надмірних жирових відкладень, які можуть завдавати шкоди здоров'ю. Це глобальна й комплексна проблема громадського здоров'я, яка може призводити до скорочення тривалості життя і є фактором ризику низки хронічних захворювань, включно із серцево-судинними, діабетом 2 типу, щонайменше 12 видів

раку, захворювань печінки й органів дихання, а також може впливати на психічне здоров'я.

У світі від наслідків надмірної ваги й ожиріння помирає більше людей, ніж від аномально низької маси тіла. А кількість людей з ожирінням перевищує кількість людей із низькою масою тіла. Дані дослідження STEPS: поширеність факторів ризику неінфекційних захворювань в Україні в 2019 році виявили, що лише дві п'ятих (39,6%) населення в Україні мали нормальну вагу, а майже три п'ятих (59,1%) мали надмірну вагу й ожиріння. Як показники зайвої ваги, так і ожиріння різко збільшувалися з віком, серед жінок ожиріння було більш поширеним.

Для діагностики надмірної ваги й ожиріння у дорослих достатньо розрахувати індекс маси тіла (ІМТ). Він є оптимальним показником для оцінки розмірів тіла (ваги та зросту) та ризиків для здоров'я.

Розрахувати оптимальне співвідношення ваги і зросту (індекс маси тіла) можна за простою формулою:

ІМТ = вага (кг) / зріст в квадраті (м)

Результати: < 18,5 – недостатня вага; 18,5 – 24,9 – нормальна вага; 25,0 – 29,9 – зайва вага; ≥ 30,0 – ожиріння.

Для дітей та підлітків, які продовжують рости, неможливо визначити сталі показники ІМТ, що відповідають нормі для всіх вікових і статевих груп. Тому використовуються спеціальні таблиці, у яких зазначено нормальні межі для кожного віку.

2.4 Визначення активності α-амілази

Діагностичні характеристики: α-амілаза каталізує гідроліз α-1,4-зв'язку молекул α-D-глюкози. В результаті утворюються декстрани, мальтоза і молекули глюкози. α-Амілаза синтезується екзокринною частиною підшлункової залози (Р-тип) і слинними залозами (S-тип), виявляється вона і в інших тканинах організму.

Принцип методу визначення: у присутності α-амілази крохмаль гідролізується до похідних, що не дають кольорової реакції з йодом. Зміна інтенсивності фарбування йод-крохмального комплексу пропорційна активності ферменту в пробі, що аналізується. Остаточне забарвлення реакційної суміші може бути від світло-коричневого до синьо-зеленого в залежності від активності α-амілази.

Склад набору для визначення:

1. Буфер Рн (7,0 ± 0,1) – 2 флакони по (50 ± 2) мл;

- фосфат натрію – (200 ± 20) ммоль/л,
- хлорид натрію – (150 ± 15) ммоль/л.

2. Розчин йоду 0,1 Н – 1 флакон з (10,0 ± 0,5) мл;

- йод – (12,7 ± 1,2) г/л,
- калій йодистий – (30,0 ± 1,5) г/л,

3. Розчин концентрату інгібітору – 1 флакон з (50 ± 2) мл.

4. Розчин субстрату

- крохмаль розчинний – (10,0 ± 0,5) мг/мл.

Зразок: свіжа сироватка, гепаринізована плазма, сеча розведена в 10 разів або дуоденальний вміст, розведений в 100 разів фізіологічним розчином. Матеріал стабільний протягом 5 діб при температурі від плюс 2ºС до плюс 8ºС.

Обладнання: 1. Фотометричне обладнання, здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі 640 (600-700) нм у діапазоні (0-1,0) од. опт. Щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.

2. Водяний термостат або баня, яка забезпечує інкубацію пробірок при температурі плюс (37 ± 1)ºС.
3. Колба мірна місткістю 1000 мл., пробірки місткістю 10 мл.
4. Піпетки місткістю 0,1 та 5 мл.

Приготування робочих розчинів:

1. Субстратно-буферний розчин готують змішуванням буферу і розчину субстрату в співвідношенні 24:1. Отриманий реагент стабільний не менше 7 днів при кімнатній температурі і не менше 15 днів при температурі від плюс 2ºС до плюс 8ºС.

2. Розчин йоду 0,1 Н. Придатний до використання. Розчин стабільний після першого розкриття оригінальної упаковки протягом 4 тижнів при температурі від плюс 2ºС до плюс 8ºС.
3. Розчин інгібітору одержують розведенням вмісту флакону із Розчину концентрату інгібітору дистильованою водою у мірній колбі, до об'єму 1000 мл. Розчин стійкий.

Проведення аналізу (Таблиця 2)

Відміряти у пробірку, мл	Холоста проба	Досліджувана проба
Субстратно-буферний розчин	0,50	0,50
Прогріти точно 5 хв. При плюс 37ºС у водяному термостаті, наступні реагенти вносити в термостатовані пробірки.		
Зразок	-	0,01
Перемішати і інкубувати при плюс 37ºС точно 5 хв.		
Розчин інгібітору Зразок Розчин йоду 0,1 Н	4,50 0,01 0,05	4,50 - 0,05
Вимірюють (не пізніше 10 хв.) оптичну щільність дослідної проби і холостої проби проти дистильованої води. Остаточне забарвлення реакційної суміші може бути від світло-коричневого до синьо-зеленого в залежності від активності α-амілази.		

(Таблиця 2)

Розрахунок результатів:

$$\text{Активність } \alpha - \text{амілази}, \frac{\text{мг}}{\text{с} \times \text{л}} = \frac{\text{Е холост} - \text{Едосл}}{\text{Ехолост}} \times 66{,}6 \times \text{К}$$

$$\text{Активність } \alpha - \text{амілази}, \frac{\text{г}}{\text{год} \times \text{л}} = \frac{\text{Е холост} - \text{Едосл}}{\text{Ехолост}} \times 240 \times \text{К}$$

Е холост і Е досл – оптичні щільності холодної і дослідної проби відповідно, од. опт. щільності;

К – коефіцієнт розведення зразка (якщо він був розведений).

Нормальні межі активності ферменту при 37ºС у сироватці, плазмі крові:

(3,3 – 8,9)мг/с×л або (12 – 32) мг/год×мл.

Інтерференція: гемоліз не заважає визначенню.

Примітка:1. Якщо активність α-амілази в зразку перевищує 36 мг/с×л, його розбавляють у 10 разів фізіологічним розчином. Аналіз повторюють з урахуванням коефіцієнту розведення 10.

2. Активність ферменту α-амілази залежить від температури. Аналіз, що виконується при температурі менше плюс 37ºС або більше плюс 37ºС, показує відповідне зменшення або збільшення величини активності.

3. Знебарвлення реакційної суміші після додавання розчину інгібітору свідчить про наявність речовин-відновників у воді для приготування Розчину інгібітору.

Постійно пам’ятайте про те, що слина і поверхня шкіри людини містять даний фермент у великій кількості. Щоб уникнути отримання хибнопозитивних результатів використовуйте на всіх стадіях преаналітичної підготовки проб і самого аналізу респіратори і рукавички.

Застережні заходи: - при роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.

- Розчин концентрату інгібітору – включає соляну кислоту (їдка речовина). Буфер включає азид натрію (отруйна речовина).

Утилізація: всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

2.5 Імуноферментний аналіз для кількісного високочутливого визначення С-реактивного білка у сироватці та плазмі людини

Загальна інформація та пояснення: С-реактивний білок - це білок гострої фази, що виробляється виключно в печінці. Інтерлейкін-6 є посередником синтезу гепатоцитами С-реактивного протеїну, пентамеру приблизно 120 000 Дальтон. С-реактивний білок присутній у сироватці крові нормальних людей у концентраціях до 5 мг / л. Серія проспективних досліджень забезпечує узгоджені дані, що підтверджують, що незначне підвищення базових рівнів С-реактивний білок серед, здавалося б, здорових людей асоціюється з вищим довгостроковим ризиком майбутніх серцево-судинних подій. Ця прогностична здатність С-реактивний білку не залежить від традиційних серцево-судинних факторів ризику і пропонує

прогностичну перевагу перед вимірюванням лише ліпідів. Маркери запалення, особливо високочутливий С-реактивний білок, можуть допомогти визначити тих, хто найбільше виграє від цього фармакологічного втручання. Високочутливий С-реактивний білок - це новий та еволюціонуючий біомаркер, який забезпечує найбільш корисний індикатор прогнозу для подальших серцево-судинних подій. Цей тест не повинен використовуватися для оцінки гострого запалення, але повинен бути призначений для оцінки ризику серцево-судинних захворювань у, здавалося б, здорових людей, які не перенесли нещодавно інфекцію чи іншу серйозну хворобу.

Принцип аналізу: Мікротитрувальні стріпи, покриті антитілами до С-реактивного білку , інкубують з розведеними стандартними сироватками та зразками пацієнтів. На цьому етапі інкубації С-реактивний білок специфічно зв’язується з лунками. Після видалення незв’язаних сироваткових білків процедурою промивання комплекс антиген-антитіло в кожній лунці виявляється за допомогою специфічних кон’югованих з пероксидазою антитіл. Після видалення незв'язаного кон'югату стріпи інкубують з розчином хромогену, що містить тетраметилбензидин та перекис водню: синій колір розвивається пропорційно кількості імунокомплексу, зв'язаного з лунками стріпів. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням 0,5М H_2SO_4 і визначають значення поглинання при 450 нм. Стандартна крива отримується шляхом побудови графіків значень поглинання проти відповідних стандартних значень. Концентрація С-реактивного білку у зразках пацієнтів визначається інтерполяцією зі стандартної кривої.

Реагенти:

1. Мікропланшет з покриттям (12 х 8-луночні стріпи з покриттям із моноклональних антитіл до С-реактивного білку людини.
2. Кон’югат (1 флакон, що містить кон’юговані з пероксидазою моноклональні антитіла до с-реактивного білку людини (12мл.)). Містить протимікробні засоби та інертний червоний барвник.
3. Стандарт сироватка – 5 флаконів, кожен з яких містить 1/10 попередньо розведених стандартних розчинів С-реактивного протеїну (0,2 мл.): 0 - 0,4 - 1 –

5 – 10 мкг/ мл. Калібрується за першим міжнародним стандартом NIBSC, 85/506. Містять 0,09% NaN3.

4. Розчинник буфера зразків - 1 флакон, що містить 40 мл буфера для розведення 5 разів концентрованого. Містить 0,09% NaN3 та інертний зелений барвник.
5. Хромогенний розчин - 1 флакон, що містить 15 мл розчину, що містить H2O2 і тетраметилбензидин.
6. ТБМ СТОП Розчин - флакон, що містить 12 мл 0,5 М H2SO4.
7. Промивний розчин - флакон, що містить 50 мл 20 х концентрований миючий розчин, забуферений фосфатом.
8. Точні мікропіпетки та стандпртні лабораторні піпетки, чистий стандартний лабораторний об'ємний посуд, скляні або пластикові пробірки для розведення зразків, рідер мікропланшетів, здатний вимірювати поглинання при 450 нм.

Попередження та застереження:

1. Лише для діагностики in vitro.

2. Компоненти крові людини, що використовуються для приготування стандартних сироваток, були протестовані та виявлено нереактивними щодо поверхневого антигену гепатиту В та ВІЛ. Оскільки жоден відомий метод ніколи не може дати повних гарантій того, що продукти, отримані з крові людини, не передаватимуть гепатит або інші вірусні інфекції, рекомендується обробляти ці стандартні сироватки точно так само, як і потенційно інфекційний матеріал. Утилізуйте зразки пацієнтів та всі матеріали, що використовуються для проведення цього тесту, так, ніби вони містять інфекційні агенти.

3. Не змішуйте реагенти або мікросхеми з покриттям із наборів з різними партійними номерами.

4. Розчин хромогену містить небезпечний інгредієнт N-метил-2-піролідон у концентрації > 0,3%. Він класифікується як токсичний засіб для розмноження категорії 1B. Застосовуються такі положення щодо небезпеки: H360D: Може завдати шкоди ненародженій дитині. Застосовуються наступні запобіжні за-

ходи: P280: Одягати захисні рукавички / захисний одяг / захист для очей / захист обличчя. P308 + P313: У разі впливу або занепокоєння: Зверніться за медичною консультацією.

5. Деякі компоненти набору містять азид натрію як консервант. Для запобігання утворенню потенційно вибухонебезпечних азидів металів у лабораторних трубопроводах після промивання цих розчинів ретельно промивайте зливи.

Збір і зберігання зразків: У цьому аналізі можуть використовуватися сироватка та плазма людини. Видаліть сироватку зі згустку якомога швидше, щоб уникнути гемолізу. Ліпемічні та / або гемолізовані зразки можуть спричинити хибні результати. Перенесіть сироватку в чисту пробірку для зберігання. Зразки можна зберігати при температурі 2-8 ° C протягом декількох днів або зберігати замороженими протягом більш тривалого періоду часу. Уникайте повторного заморожування та розморожування.

Застереження:

1. Використовуйте окремий одноразовий наконечник для кожної передачі зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.

2. Перед використанням всім реагентам слід дозволити нагрітися до кімнатної температури. Всі реагенти слід змішувати без піноутворення.

3. Після того, як аналіз розпочато, усі етапи слід виконувати без перерви.

4. Абсорбція - це функція часу інкубації та температури. Тому розмір пробного циклу повинен бути обмежений. Пропонується запускати не більше 20 зразків пацієнтів з одним набором еталонних стандартів у двох примірниках.

5. Якщо використовується вошер ІФА, може знадобитися адаптація етапу миття для отримання оптимальних результатів.

Відновлення реагентів: Промивний розчин: Розведіть 50 мл концентрованого промивного розчину до 1000 мл дистильованою водою. Відновлений розчин можна зберігати принаймні 1 місяць, зберігати при температурі 2–8 ° C. При більш високих температурах концентрований промивний розчин може виглядати мутним, не впливаючи на його ефективність. При розведенні розчин буде

прозорим. Розчинник зразку: Розведіть 40 мл концентрованого розчинника зразка до 200 мл дистильованою водою. Відновлений розчин можна зберігати принаймні 3 місяці або до тих пір, поки розчин залишається прозорим. Зберігати при температурі 2–8 ° С.

Аналіз: 1. 10 х попередньо розведених стандартних сироваток розводять 1: 100 наступним чином: піпетують по 10 мкл кожного калібратора в окремі скляні або пластикові пробірки для розведення. Додайте 990 мкл розведеного розчинника зразка і обережно перемішайте.

2. Зразки пацієнта розводять у співвідношенні 1: 1000 у два послідовних етапи: піпетуютьпо 10 мкл кожної проби пацієнта в окремі скляні або пластикові пробірки для розведення та додають 990 мкл розведеного розчинника зразка. Ретельно перемішайте. Додайте 450 мкл розведеного розчинника зразка до 50 мкл цих 100 разів попередньо розведених зразків. Ретельно перемішайте. Попередження: не зберігайте розведені зразки більше 8 годин.

3. Піпетуйте 100 мкл розведених калібраторів та зразків у кожну пару сусідніх лунок.

4. Інкубуйте накриті стріпи мікропланшета протягом 30 ± 2 хв при кімнатній температурі.

5. Промийте мікропланшет три рази промивним розчином. Це можна виконати за допомогою відповідного вошера для мікропланшетів або жваво витрусивши вміст стріпів і зануривши їх у миючий розчин. На третьому етапі миючий розчин залишають у стріпах на 2-3 хв. Змінюйте миючий розчин для кожного циклу. Нарешті спорожніть стріпи мікропланшету та видаліть зайву рідину, промокаючи перевернуті стріпи на адсорбуючому папері.

6. Додайте 100 мкл кон’югованого розчину та інкубуйте покриті стріпи мікропланшетупротягом 30 ± 2 хв при кімнатній температурі.

7. Повторіть процедуру промивання, як описано в 5.

8. Додайте 100 мкл розчину хромогену в кожну лунку.

9. Інкубуйте 10 ± 2 хв при кімнатній температурі. На цьому етапі уникайте впливу світла.

10. Додайте 50 мкл стоп розчину в кожну лунку.

11. Визначте поглинання кожної лунки при 450 нм протягом 30 хв після додавання кислоти.

Результати: Середнє значення поглинання кожного калібратора наноситься на графік щодо відповідного значення С-реактивного білку і будується найкраща калібрувальна крива. Використовуйте середню поглинання кожного зразка пацієнта, отриманого в методі високочутливого імуноферментного аналізу С-реактивного білку, щоб визначити відповідне значення простою інтерполяцією з кривої. Залежно від досвіду та / або наявності можливостей комп'ютера можуть застосовуватися інші методи обробки даних.

Інтерпритація результатів:

Наступні критерії зазвичай зустрічаються в літературі щодо зв'язку між значеннями С-реактивного білка(СРБ) та ризиком розвитку серцево-судинних захворювань(ССЗ).

СРБ<1,0 мг/л = низький ризик розвитку ССЗ;

СРБ 1,0 – 2,9 мг/л = проміжний ризик для ССЗ;

СРБ >3,0 мг / л = високий ризик ССЗ.

2.6 Статистична обробка результатів

Для статистичної оцінки достовірності результатів при використанні контрольної сироватки з досліджуваним вмістом компонентів рекомендується використовувати тест Лорда і різницевий метод критерію «t» Стьюдента.

Тест Лорда дозволяє достовірно визначити, чи відхиляється середнє значення окремої проби від номінального значення, чи різниця є випадковою. Цим тестом порівнюють результати 10 паралельних досліджень контрольної сироватки із значенням, вказаним в анотації до контрольної сироватки. Тест Лорда розраховується за формулою (3):

$$L = \frac{(\overline{x}-\mu)}{x_n - x} \text{ , де} \qquad (3)$$

μ - номінальна величина, вказана в анотації;

$\overline{x}$ – середнє значення результатів перевірки по 10 визначенням;

$x_n - x$ – різниця між максимальною і мінімальною величинами з 10 визначень.

При вірогідності похибки, рівної 5% і при числі визначень, рівному 10, *L* має дорівнювати 0,23. Якщо L > 0,23, то різниця між середнім значенням 10 контрольних визначень і значень, вказаних в анотації, достовірна. Тобто, результати неправильні. Відповідно, при правильних результатах і при співпадінні вказаних вище умов L повинно бути менше 0, 23.

Різницевий метод критерію «t» Стьюдента також дозволяє розрахувати рівень достовірності різниці між номінальною і отриманою величиною досліджуваного компоненту. В кожному випадку вираховується різниця між результатами кожного визначення і номінальною величиною з урахуванням знаків. Потім отримують суму різниць з урахуванням знаків і середнє значення цієї різниці (4):

$$M = \frac{\text{сума різниць}}{\text{кількість досліджень}} \quad (4)$$

Визначають відхилення від середньої різниці і підносять до квадрату, знаходять суму квадратів відхилень($\sum D^2$).

Розраховують значення середньої похибки (m):

$$\sqrt{\frac{\sum D2}{(n-1)n}} \quad (5)$$

і показник суттєвості різниці (t):

$$t = \frac{M}{m} \quad (6)$$

На підставі величини t і числа ступеня свободи $(n-1)$ по таблиці Стьюдента визначають рівень достовірності різниці (p).

РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослід проводився власноруч на базі загальної клінічної лабораторії Шаргородського РЦ ПМСД. Дослідження кількості лейкоцитів, рівня глюкози крові, С-реактивного білку, та α-амілази проводилися у 40 людей. Обстежувані були поділені на дві групи в залежності від статі (чоловіки – 20, жінки – 20). В свою чергу ці групи були поділені ще по 10 людей, люди однієї групи мали візуальні симптоми ожиріння, а інші 10 – ні. Таким чином для проведення дослідження було створено 4 групи людей, по 10 кожна. Вік обстежуваних: 24 – 65 років. Практично здоровими вважали тих, які не мали ніяких скарг і були обстежені у зв'язку з профілактичним оглядом, що дозволило виключити захворювання, котрі могли би вплинути на картину крові. Перед обстеженням всім учасникам дослідження були проведені заміри окружності талії, вимірювання зросту та маси тіла для подальшого підрахунку індексу маси тіла. Також проводилось вимірювання показників артеріального тиску і температури тіла.

Взяття крові з вени відбувалось натще серце, в ранкові години, з дотриманням необхідних вимог в окремі, промарковані пробірки.

Підрахунок лейкоцитів проводився класичним методом в камері Горяєва. При оцінці лейкоцитів периферичної крові враховувалась відповідність віковим нормам.

Визначення цукру крові проводилось глюкозоксидазним методом на фотометрі МБА-540. Визначення кількісного значення С-реактивного білку проводилось методом імуноферментного аналізу з допомогою імуноферментного аналізатора MR-96 A. Визначення кількісного значення α-амілази по Каравею фотометричним методом проводилось на аналізаторі BS3000T. Дослідження проводились із урахуванням принципів медичної біоетики з добровільного інформованого дозволу обстежуваних.

Статистична обробка даних включала визначення середніх арифметичних величин , похибки середнього арифметичного і достовірності відмінностей з використанням t-критерія Стьюдента.

Завданнями дослідження було встановити, чи корелюють показники глюкози крові, індексу маси тіла, α-амілази, С-реактивного білку та кількості лейкоцитів. Перед проведенням дослідження припустили, що у людей з наявним метаболічним синдромом, або який знаходиться на стадії розвитку буде спостерігатися підвищення рівня глюкози крові. Це не обов'язково мають бути понаднормові значення, лише такі, котрі будуть різнитися від контрольної, «здорової» групи. При підвищенні рівня глюкози існує велика ймовірність ураження ендотелію стінок кровоносних судин, що в свою чергу має спонукати показники запалення в організмі (С-реактивний білок, α-амілазу, кількість лейкоцитів) реагувати на запальні процеси судин. Відповідно очікувані збільшені рівні їх показників, на противагу показникам контрольної групи людей.

Результати досліджень:

Для зручності обробки результатів дослідження 40 осіб були розділені на групи за статтю, та наявністю ожиріння. В результаті можемо порівняти зміни кількості досліджуваних параметрів.

Таблиця 3. Кількісна зміна маркерів запалення в крові у жінок без ожиріння (метаболічного синдрому).

№	Індекс маси тіла (кг/м^2)	С-реактивний білок (мг/л)	Концентрація глюкози (ммоль/л)	α- амілаза (мг/год х мл)	Кількість лейкоцитів (10^9л)
1	19.8	2.83	3.9	15	4.2
2	20.5	2.87	3.9	17	5
3	21.2	3.1	4.6	26	4.4
4	21.4	2.85	5	23	5.3
5	21.8	3	5.1	25	4.6
6	21.1	2.87	4.9	22	5.9
7	21.1	3	4.5	21	4.8
8	20.7	2.96	4.4	16	6.3
9	21.6	3	4.8	18	5.6
10	21.5	2.89	4.4	23	5.4
Середнє значення	21.1	2.9	4.5	20.6	5.1

(Таблиця 3)

Таблиця 4. Кількісна зміна маркерів запалення в крові у чоловіків без ожиріння (метаболічного синдрому).

№	Індекс маси тіла (кг/м^2)	С-реактивний білок (мг/л)	Концентрація глюкози (ммоль/л)	α- амілаза (мг/год х мл)	Кількість лейкоцитів (10^9л)
1	22.5	3	5.2	16	4.7
2	22.2	3.1	3.9	24	6.3
3	24.7	2.98	4	16	5.4
4	21.4	2.88	4	20	4.2
5	24.8	3	4.2	22	5.3
6	24.3	3.1	4.8	29	4.6
7	24.4	2.98	4.4	25	5.3
8	23.4	3	4.6	25	5.9
9	24.6	2.93	4.2	26	5.1
10	24.0	2.96	4.2	24	4.4
Середнє значення	23.6	3.0	4.3	22.7	5.1

(Таблиця 4)

Таблиця 5. Кількісна зміна маркерів запалення в крові у чоловіків з ожирінням (метаболічним синдромом).

№	Індекс маси тіла (кг/м^2)	С-реактивний білок (мг/л)	Концентрація глюкози (ммоль/л)	α- амілаза (мг/год х мл)	Кількість лейкоцитів (10^9л)
1	33.1	3.8	4.9	27	6.8
2	32.9	5.6	5.4	28	8.3
3	32.4	4.2	4.4	34	6.9
4	33.7	10.1	4.9	32	6.7
5	32.1	3.4	5.8	29	5.4
6	31.6	6.1	5.9	30	8.7
7	33.8	8.2	5.6	35	7.9
8	30.6	3.9	5.7	28	8.4
9	34.4	4.3	5.6	29	7.3
10	36.8	5.2	5.7	34	8.9
Середнє значення	33.1	5.5	5.4	30.6	7.5

(Таблиця 5)

Таблиця 6. Кількісна зміна маркерів запалення в крові у жінок з ожирінням (метаболічним синдромом).

№	Індекс маси тіла (кг/м^2)	С-реактивний білок (мг/л)	Концентрація глюкози (ммоль/л)	α- амілаза (мг/год х мл)	Кількість лейкоцитів (10^9л)
1	31.8	6.4	5.4	30	8.3
2	30.8	5.3	5.2	29	6.4
3	32.3	7.1	5.3	29	8.8
4	32.4	3.2	5.7	32	8.4
5	33.0	4.1	5.6	35	7.8
6	30.5	4.6	4.9	27	6.8
7	32.4	5.8	5.6	28	7.3
8	38.0	5.1	4.4	29	7.9
9	33.4	3.8	4.7	26	6.7
10	34.5	3.6	5.8	30	5.4
Середнє значення	32.9	4.9	5.3	29.5	7.4

(Таблиця 6)

У результаті дослідження було виявлено, що середні значення показників маркерів запалення крові у жінок та чоловіків із зайвою вагою дещо вищі. У жінок із індексом маси тіла в межах норми середній показник артеріального тиску дорівнює 117.9/74.5 мм. рт. ст. . У жінок із індексом маси тіла вище норми середній показник артеріального тиску складає 143.4/87.3 мм. рт. ст. . У чоловіків із індексом маси тіла в межах норми середній показник артеріального тиску дорівнює 124.3/79.5 мм. рт. ст. . У чоловіків із індексом маси тіла вище норми середній показник артеріального тиску становить 153.8/94.7 мм. рт. ст.

Таблиця 7. Порівняльна таблиця середніх значень показників маркерів запалення крові людини (значення округлені до десятих).

	Жінки з нормальним ІМТ	Жінки з ІМТ що перевищує норму	Чоловіки з нормальним ІМТ	Чоловіки з підвищеним ІМТ

Середнє значення концентрації глюкози(ммоль/л)	4.5	5,3	4.4	5.4
Середнє значення С-реактивного протеїну (мг/л)	2.9	4,9	2.9	5.5
Середнє значення концентрації α-амілази(мг/год х мл)	20.6	29,5	22.7	30.6
Середнє значення кількості лейкоцитів	5.2	7,4	5.1	7.5

(Таблиця 7)

З таблиці 7 видно що, організм реагує на стрес, у цьому випадку на стан метаболічного синдрому. При цьому збільшуються кількісно речовини що сигналізують про запальні процеси в організмі, як от ураження ендотелію судин внаслідок підвищення рівня глюкози в крові. У випадку з групами людей що мають підвищений рівень цукру крові можемо говорити про дисфункцію ендотелію судин, що має місце при синдромі інсулінорезистентності. Запальні зміни стінок судин і викликають підвищений рівень лейкоцитів, порівняно з групами людей у котрих рівень цукру крові нижчий. Проте не можна виключити присутність цього процесу у жінок та чоловіків де рівень цукру крові знаходиться в межах норми, оскільки і у них з підвищенням рівня глюкози рівень лейкоцитів теж зростає.

Щоб бути ближчим до твердження про наявність у обстежуваних двох груп людей метаболічного синдрому в ході роботи було проведено вимірювання окружності талії. Цей показник є однієї із характерних ознак метаболічного синдрому у людини. Він у поєднані із збільшеним індексом маси тіла та підвищеними показниками артеріального тиску дозволяє припустити наявність метаболічного синдрому у двог груп досліджуваних людей з явним ожирінням. Отримані результати вимірювання окружності талії у таблиці 8.

Таблиця 8. Результати середніх значень окружності талії у піддослідних груп.

	Жінки з нормальним ІМТ	Жінки з ІМТ що перевищує норму	Чоловіки з нормальним ІМТ	Чоловіки з підвищеним ІМТ
Середнє значення окружності талії, см.	79	96	90.7	107.6

(Таблиця 8)

ВИСНОВКИ

Встановлено, що стрес будь якої етіології впливає на зміни стану фізіологічних систем організму. В наш час споживання великої кількості глюкози, частину з якої ми навіть не помічаємо, бо вона потрапляє в організм з продуктами, в яких, здавалось би, цукру не повинно бути взагалі. Через малорухомий спосіб життя та надмірне споживання нездорової їжі організм замість того, щоб відчувати себе в безпеці, навпаки постійно перебуває у стані не лише психоемоційного, але і фізіологічного стресу. У даній роботі показаний взаємоз'язок глюкози крові як стресового фактору для організму людини, та відпоовідь таких показників маркерів запалення як α-амілаза та С-реактивний білок на цей стресовий фактор.

Під час дослідження корелятивних зв'язків між маркерами запалення в крові людини, прямої кореляції не було помічено. Водночас спостерігається закономірність зростання рівня маркерів запалення у людей, котрі мають велику імовірність виявлення метаболічного синдрому.

Порушення, які властиві синдрому Х, тривалий час мають безсимптомний перебіг, нерідко починають формуватися в підлітковому та юнацькому віці, задовго до клінічної маніфестації артеріальної гіпертензії, атеросклеротичних уражень судин, цукрового діабету 2-го типу, що визначає неоднорідність клінічних проявів на різних етапах розвитку цієї патології. Наявність метаболічного синдрому у 3 – 6 разів збільшує ризик розвитку артеріальної гіпертензії, цукрового діабету другого типу і смертності.

Гіперінсулінемія (ендогенна при цукровому діабеті 2 типу, екзогенна при цукровому діабеті 1 типу) виступає як антиген. Внаслідок автоімунної реакції відбувається деструкція інтими судин, що у поєднанні з гіпер- і дисліпопротеїнемією сприяє виникненню склерозу стінки судин.

При діабетичній мікроангіопатії спостерігаються властиві для неї гістологічні зміни, такі як потовщення базальної мембрани капілярів, проліферація ендо-

телію у судинах, відкладання у стінках судин глікопротеїдів, глікозаміногліканів, зменшення кількості або відсутність перицитів (регулюють тонус судин і товщину базальної мембрани.

При синдромі інсулінорезистентності розвивається дисфункція ендотелію судин і, зокрема, порушується синтез оксиду азоту, що чинить стримуючий вплив на проліферацію гладеньком'язових клітин, гальмує адгезію моноцитів до ендотелію судинної стінки, зменшує перекисне окиснення ліпідів, тобто оберігає стінки судин від ушкодження. Тому розвиток дисфункції ендотелію сприяє пришвидшенню розвитку атеросклеротичних уражень.

При пошкодженні стінки судини, цілком прийнятним є збільшення кількості лейкоцитів – таким чином організм реагує на найдрібніші вогнища запалення в організмі, зокрема в серцево-судинній системі.

Важливо застосовувати профілактичні заходи по зменшенню вживання простих вуглеводів в раціоні, щоб не допустити розвитку метаболічного синдрому, з подальшим його прогресуванням. Актуальність даної теми підкреслює доцільність подальшого вивчення патогенетичних та клінічних особливостей перебігу синдрому Х задля розробки алгоритму раннього виявлення та попередження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Fahed G., Aoun L., Bou Zerdan M., Allam S., Bouferraa Y., Assi HI. Metabolic syndrome: Updates on pathophysiology and management in 2021. Int J Mol Sci. 2022. 12;23(2);786. DOI:10.3390/ijms23020786.

2. Saklayen M.G. The global epidemic of the metabolic syndrome. Curr. Hypertens. Rep. 2018;20:1–8. DOI: 10.1007/s11906-018-0812-z.

3. McCracken E., Monaghan M., Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. Clin. Dermatol. 2018;36:14–20. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.

4. Ross R., Neeland I.J., Yamashita S., Shai I., Seidell J., Magni P., Santos R.D., Arsenault B., Cuevas A., Hu F.B., et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: A Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. Nat. Rev. Endocrinol. 2020;16:177–189. DOI: 10.1038/s41574-019-0310-7.

5. Neeland I.J., Ross R., Després J.-P., Matsuzawa Y., Yamashita S., Shai I., Seidell J., Magni P., Santos R.D., Arsenault B. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: A position statement. Lancet Diabetes Endocrinol. 2019;7:715–725. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30084-1.

6. Elsi Haverinen, Mariana F Fernandez, Vicente Mustieles, Hanna Tolonen. Metabolic Syndrome and Endocrine Disrupting Chemicals: an overview of exposure and health effects. Int J Environ Res Public Health. 2021. Dec 10;18(24):13047. DOI: 10.3390/ijerph182413047.

7. Chiu H., Lee M.Y., Wu P., Huang J.C. Comparison of the effects of sibling and parental history of type 2 diabetes on metabolic syndrome. Sci Rep. 2020. 7(16). P. 56-76. DOI: 10.1038/s41598-020-79382-z.

8. Kocak M.Z., Aktas G., Erkus E., Sincer I., Atak B. Serum uric acid to HDL-cholesterol ratio is a strong predictor of metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. Rev Assoc Med. 2019. DOI: 10.1590/1806-9282.65.1.9.

9. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A.J., Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2018. P. 141-150. DOI: 10.1016/.2014.04.006.

10. Jirawat Riyaphan, Dinh-Chuong Pham, Max K Leong, Ching-Feng Weng. In silico approaches to identify polyphenol compounds as α-glucosidase and α-amylase inhibitors against type -II diabetes. Biomolecules. 2021. Dec 14;11 (12):1877. DOI: 10.3390/biom11121877.

11. Bilal HM, Sharif A., Malik MNH, Zubair HM. Aqueos ethanolic extract of adiantum incisum Forssk. Protect against type 2 diabetes mellitus via attenuation of α-amylase and oxidative stress. ACS Omega. 2022. Oct 12;7(42):37724 – 37735. DOI: 10.1021.

12. Khanna D., Rehman A. Pathophysiology of obesity. Stat Pearls. 2022. Jun 11. PMID: 34283442.

13. Barroso I., Guimaraes JT., Craveiro V., Severo M., Ramos E. How the metabolic phenotype in adulthood is affected by long-lasting immunological trajectories since adolescence. Sci Rep. 2022. May 31;12(1):9085. DOI:10.1038/s41598-022-13126-z.

14. Xue Q., Yang X., Huang Y., Zhu D., Wang Y., Wen Y., Zhao J., Liu Y., Yang CX., Pan J., Yan T., Pan XF. Association between baseline and changes in high-sensitive C-reactive protein and metabolic syndrome: a nationwide cohort study and meta-analysis. Nutr Metab (Lond). 2022. Jan. 6;19(1):2. DOI 10.1186/s12986-021-00632-6.

15. Wang M, Liu J, Zhang Z, Zhang H, Wang N, Chen X, Han X, Lu Q, Chi S. Effects of dietary intervention on inflammatory markers im metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. Front Nutr. 2022. Mar. 31;9:846591. DOI: 10.3389/fnut.2022.846591.

16. Willemen FEM, van Zuiden M, Zantvoord JB, de Rooij SR, van den Born BH, Hak AE, Thomaes K, Segeren M, Elsenburg LK, Lok A. Associations between child maltreatment, inflammation, and comorbid metabolic syndrome to depressed mood in a multiethnic urban population:the helius study. Front psychol.2022. Jul. 14;13:787029. DOI: 10.3389/fpsyg.2022.787029.

17. Stanimirovic J, Radovanovic J, Banjac K, Obradovic M, Essack M, Zafirovic S, Gluvic Z, Gojobori T, Isenovic ER. Role of C-reactive protein in diabrtic inflammation. Mediators Inflamm. 2022. May 17;2022:3706508. DOI:10.1155/2022/3706508.

18. Agius R, Pace NP, Fava S. Reduced leukocyte mitochondrial copy number in metabolic syndrome and metabolically healthy obesity. Front Endocrinol. 2022. Jul> 25;13:886957. DOI: 10.3389/fendo.2022.886957.

19. Kim JE, Kim JS, Jo MJ, Cho E, Ahn SY, Kwon YJ, Ko GJ. The roles and associated mechanisms of adipokines in development of metabolic syndrome. Molecules. 2022. Jan. 6;27(2);334. DOI:10.3390/molecules27020334.

20. Rhee EJ. The influence of obesity and metabolic health on vascular health. Endocrinol Metab. 2022. Feb;37(1):1-8. DOI:10.3803/EnM.2022.101.

21. Vatashchuk MV, Bayliak MM, Hurza VV, Storey KB, Lushchak VI. Metabolic syndrome^ Lessons from Rodent and Drosophila models. Biomed Res Int. 2022. Jun, 22;2022;5850507. DOI:10.1155/2022/5850507.

22. Rochlani Y., Pothineni N. V., Kovelamudi S., Mehta J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease . 2017;11(8):215–225. doi: 10.1177/1753944717711379.

23. Rodríguez-Correa E., González-Pérez I., Clavel-Pérez P. I., Contreras-Vargas Y., Carvajal K. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? Nutrition & Diabetes . 2020;10 doi: 10.1038/S41387-020-0127-4.

24. Bayliak M. M., Abrat O. B., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: comparison between Drosophila and mammals. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology . 2019;228:18–28. doi: 10.1016/J.CBPA.2018.09.027.

25. Pankaj Prasun. Mitohondrial dysfunction in metabolic syndrome. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020. Oct.1;1866(10):165838. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020. 165838.

26. World Health Organization . Noncommunicable Diseases. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2021. [(accessed on 1 December 2021)]. Available online: https://www.who.int/health-topics/noncommunicable-diseases#tab=tab_1 [Google Scholar].

27. Cho Y., Lee SY. Useful biomarkers of metabolic syndrome. Int J Environ Res Public Health. 2022. Now.15;19(22):15003. DOI: 10.3390/ijerph192215003.

28. Lee, K.W.; Shin, D. Prospective associations of serum adiponectin, leptin, and leptin-adiponectin ratio with incidence of metabolic syndrome: The korean genome and epidemiology study. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, *17*, 3287.

29. Colca JR, Scherer PE. The metabolic syndrome, thiazolidinediones, and implications for intersection of chronic and inflammatory disease. Mol Metab. 2022. Jan;55:101409. DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101409.

30. Bouillon-Minois JB, Dutheil F. Biomarker of stress, metabolic syndrome and human health. Nutrients.2022. Jul.18;14(14):2935. DOI: 10.3390/nu14142935.

31. Wijnant K., Klosowska J., Braet C., Verbeken S., De Henauw S., Vanhaecke L., Michels N. Stress Responsiveness and Emotional Eating Depend on Youngsters' Chronic Stress Level and Overweight. Nutrients. 2021;13:3654. DOI: 10.3390/nu13103654.

32. Bouillon-Minois J.-B., Trousselard M., Thivel D., Benson A.C., Schmidt J., Moustafa F., Bouvier D., Dutheil F. Leptin as a Biomarker of Stress: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients. 2021;13:3350. DOI: 10.3390/nu13103350.

33. Tirandi A, Carbone F, Montecucco F, Liberale L. The role of metabolic syndrome in sudden cardiac death risk: recent evidence and future directions. Eur J Clin Invest. 2022. Feb. 52(2):e13693. DOI:10.1111/eci.13693.

Стасишена Ірина Володимирівна

Факультет хімії, біології і біотехнологій

091 Біологія

Біологія

ДЕКЛАРАЦІЯ АКАДЕМІЧНОЇ ДОБРОЧЕСНОСТІ

Усвідомлюючи свою відповідальність за надання неправдивої інформації, стверджую, що подана кваліфікаційна (магістерська) робота на тему «Маркери запалення в крові людини та їх зв'язок з метаболічним синдромом та ожирінням» є написана мною особисто.

- Одночасно заявляю, що ця робота:
- Не передавалась іншим особам і подається до захисту вперше;
- Не порушує авторських та суміжних прав, закріплених статтями 21-25 Закону України « Про авторське право та суміжні права»;
- не отримувалась іншими особами, а також дані та інформація не отримувались у недозволений спосіб.

Я усвідомлюю, що у разі порушення цього порядку моя кваліфікаційна робота буде відхилена без права її захисту, або під час захисту за неї буде поставлена оцінка «незадовільно».

«_____» _____ 2022 р. _____