

Вищий державний навчальний заклад України  
«Українська медична стоматологічна академія»  
Українська Академія наук національного прогресу

---

# Проблеми екології та медицини

Том 21 N 3-4 2017

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Заснований в 1997 році

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

### КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

DYNAMICS OF INDICATORS IN THE CELL-MEDIATED AND HUMORAL LINKS OF THE IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH THYROID CANCER

**Bagmut I.Yu., Galmiz O.O.**..... 3

ДИНАМІКА ПАРАМЕТРІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ГОМЕОСТАЗУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

**Граматюк С.М.**..... 6

ENGLISH VERSION: DYNAMICS OF INTRACELLULAR HOMEOSTASIS PARAMETERS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRUS HEPATITIS C

**Gramatyuk S.M.**..... 10

THE STUDY OF PATHOPHYSIOLOGICAL LINK OF AUTOIMMUNIZATION IN PATIENTS WHO USE SOFT CONTACT LENSES

**Bagmut I.Yu., Kuzmenko O.A., Titkova A.V.**..... 14

PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF CREATION OF CRYOPRECIPITATE IN PATIENTS WITH INOPERABLE CANCER IN DISTURBANCES FROM MICROSATELLITE INSTABILITY

**Movchan O.V., Titkova A.V.**..... 18

РЕЗУЛЬТАТИ КЛІНІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКУВАННЯ ТА РЕАБІЛІТАЦІЇ ХВОРИХ З БЕЗПЛІДДЯМ, ЗУМОВЛЕНИМ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ДОДАТКІВ МАТКИ

**Риженко Ю.В.**..... 22

ENGLISH VERSION: CLINICAL FINDINGS ON TREATMENT AND REHABILITATION OF PATIENTS WITH INFERTILITY CAUSED BY INFLAMMATORY DISEASES OF THE UTERINE APPENDAGES

**Ryzhenko Yu.V.**..... 26

ПОЛІМОРФНИЙ АЛЕЛЬ 299GLY ГЕНА TLR4 АСОЦІЮЄТЬСЯ ІЗ ЗНИЖЕНОЮ ЕФЕКТИВНІСТЮ ВКЛЮЧЕННЯ У КОМПЛЕКСНУ ТЕРАПІЮ ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ АЗИТРОМІЦИНУ ТА ПІОГЛІТАЗОНУ

**Скочко О.В.**..... 30

ENGLISH VERSION: THE TLR4 299GLY POLYMORPHIC ALLELE IS ASSOCIATED WITH REDUCED EFFICACY OF AZITHROMYCIN AND PIOGLITAZONE, INCLUDED IN THE COMPREHENSIVE TREATMENT OF PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE

**Skochko O.V.**..... 37

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА**

MANIFESTATIONS OF ENDOGENIC INTOXICATION IN THE LIVER IN EXPERIMENT

**Kolisnyk I.L., RezunenکوYu.K. \*, Voiagina O.D. \***..... 43

CRITICAL ASPECTS OF MALE RAT FERTILITY IN THE ASSESSMENT OF EXPOSURE TO LAPROL-604

**Popova T.M.** ..... 46

SOURCES OF PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES IN TISSUES OF PERIODONTIUM AND SALIVARY GLANDS OF RATS UNDER MODELED SYSTEMIC INFLAMMATION

**Yelins'ka A.M., Shvaykovs'ka O.O., Kostenko V.O.**..... 51

## **СОЦІАЛЬНІ АСПЕКТИ**

METHODOLOGICAL FEASIBILITY OF TEST TECHNOLOGIES IN ASSESSING MEDICAL STUDENTS' PROFICIENCY

**Lysanets Yu., Morokhovets H., Ostrovska L., Purdenko T.** ..... 55

**ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ**..... 59

**INFORMATION FOR AUTHORS**..... 60

# КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Bagmut I.Yu., Galmiz O.O.  
UDK 616.441-006.6-078- 092:612.017

## DYNAMICS OF INDICATORS IN THE CELL-MEDIATED AND HUMORAL LINKS OF THE IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH THYROID CANCER\*

Bagmut I.Yu., Galmiz O.O.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv

*This work is a fragment of research projects of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education: "Cellular-molecular mechanisms of inflammation associated with chronic diseases", the state registration number 015U001186, and "Pathochemical mechanisms of action of radioiodine on the organism and principles of their early diagnosis and correction", state registration number 0117U000589.*

*This paper studied cell-mediated and humoral immunity in patients with thyroid cancer (TC) in terms of evaluation of specific and non-specific immunological resistance of the organism. Non-specific immunological resistance of the body was studied on the basis of determining the phagocytic activity of neutrophils, indices of white and red blood cells. Analysis of the study allows us to judge that under the conditions of oncopathology of the thyroid gland, there is a suppression of the cellular link of the immune system (macrophages, monocytes, histiocytes, T-lymphocytes, dendritic cells) and intercellular mediator interactions that are associated with a decrease in the activity of humoral immune system, which was confirmed by a significant drop in the level of B-lymphocytes and immunoglobulins (JgG, Jg M, JgA). The results of the research revealed the inhibition of non-specific resistance of the body in patients with thyroid cancer, depending on the cellular structure of the tumor, which was characterized by a decrease in phagocytic activity of neutrophils. These changes took place against the background of the development of endogenous intoxication, pathogenic links of erythropoiesis and methemoglobinemia.*

**Keywords:** cell-mediated and humoral immunity, immunological resistance, thyroid cancer

*В роботі вивчали клітинний і гуморальний імунітет у хворих на рак щитоподібної залози за показниками оцінки специфічної і неспецифічної імунологічної резистентності організму. Неспецифічна імунологічна резистентність організму була вивчена на основі визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, показників білої та червоної крові. Аналіз дослідження дозволяє судити про те, що в умовах онкопатології щитовидної залози відбувається пригнічення клітинної ланки імунної системи (макрофаги, моноцити, гістіоцити, Т-лімфоцити, дендритні клітини) та міжклітинних медіаторних взаємодій, які пов'язані зі зниженням активності гуморальної імунної системи, що підтверджувалося значним зниженням рівня В-лімфоцитів та імуноглобулінів (JgG, JgM, JgA). Результати досліджень виявили пригнічення неспецифічної резистентності організму у хворих на рак щитоподібної залози в залежності від клітинної будови пухлини, які характеризувалися зниженням фагоцитарної активності нейтрофілів. Ці зміни відбувались на тлі розвитку ендогенної інтоксикації, патогенетичної ланки еритропоезу і метгемоглобінемії.*

**Ключові слова:** клітинний і гуморальний імунітет, імунологічна резистентність, рак щитоподібної залози

It is known that the physiologic function of the immune system is the protection of the body from bacteria, viruses, fungi, parasitic infections and substances bearing signs of genetically-foreign information [1, 2, 3, 4]. These processes provide support for the cellular composition of the lymphoid organs and the change in the immunocompetence of lymphocytes, according to the antigens that enter the body [5, 6, 7].

The aim of the research was to study the nonspecific and specific immunological resistance in patients with thyroid cancer.

### Materials and methods

We observed 94 patients who were diagnosed with thyroid cancer. We used the classification of the tumor cell structure applied to assess the aggressiveness and rate of growth [8, 9]. According to this classification, patients were divided into 3 groups: group I included 41 patients with papillary adenocarcinoma; group II – 32 patients with follicular adenocarcinoma; group III consisted of 21 patients, diagnosed with low-differentiated thyroid cancer. The comparison group consisted of 27 patients without pathology of the thyroid gland and without a his-

\* To cite this English version: Bagmut I.Yu., Galmiz O.O. Dynamics of indicators in the cell-mediated and humoral links of the immune system in patients with thyroid cancer // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 3-5.

tory of oncological disease. The thyroid gland cancer diagnosis was verified according to histological analysis.

The research program envisaged the study of cellular and humoral immunity in patients with thyroid cancer (thyroid gland cancer) according to indicators of evaluation of specific and non-specific immunological resistance of the organism. Non-specific immunological resistance of the organism was studied on the basis of the determination of phagocytic activity of neutrophils, indices of white and red blood.

In all examined patients, the total number of red blood cells, leukocytes, hemoglobin content, methemoglobin, and phagocytic activity of neutrophils were determined. All studies were conducted on the first or second day of hospitalization, after which patients received immunomodulatory antioxidant, anti-toxic therapy, for a period of three weeks.

Natural non-specific immunobiological resistance of the body of patients with thyroid gland was studied using the activity of phagocytic cells [10, 11].

The study of general population of T lymphocytes (CD3+), the subpopulation of T lymphocytes – T-helpers (CD4), T-suppressor (CD8) and B-lymphocyte (CD19) in serum was carried out using monoclonal antibodies CD3+, CD4, CD8, CD19, TNF- $\alpha$  by immunofluorescence method on the immune enzyme analyzer STAT-FAX303, USA.

The content of immunoglobulins A, M, G (IgA, IgM, IgG) and total immunoglobulin E (IgE) in blood serum was investigated using Sigma Inc. USA. Immune enzyme test systems and the content of allergen specific IgE were tested using immune enzyme test systems of "Sigma Inc." USA.

Statistical analysis of the results was carried out using a computer software package for processing statistical information Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., USA).

### Results and discussion

The study of the dynamics of white and red blood parameters in patients with TC showed a significant decrease in the content of erythrocytes in the group I with papillary adenocarcinoma by 7.1%, in the II group with follicular adenocarcinoma – by 23% and in patients with low-differentiation of thyroid cancer by – 30.5%. The obtained results had a direct correlation with the decrease in hemoglobin in all studied groups. There is a significant increase in the level of methemoglobin, depending on the cellular structure of the tumor, which is the pathogenic link of inhibition of erythropoiesis in thyroid cancer, and this may be due to increased autointoxication, changes in the structure of macromolecules and violations of tissue respiration. As a result of our research, we established reliable ( $p < 0.05$ ) reduction of leukocytes in group II, which finds its confirmation in the hypothesis that non-nuclear cells (erythrocytes), in which significantly reduced reparative and restorative syntheses, are sensitive in the conditions of development of oncopathology.

As a result of the study in all groups of patients there was a significant ( $p \leq 0.05$ ) decrease in phagocyte count, absorption index and digestive index of microbes. The absorption and staphylococcal digestion of one active neutrophil were reduced, and there was a direct correlation with the cellular structure of the tumor.

The obtained results of the study indicate that in case of thyroid cancer, there is inhibition of the cellular immunity level, the severity of which is associated with autointoxication of the body and histological characteristics of the tumor (Fig. 1).

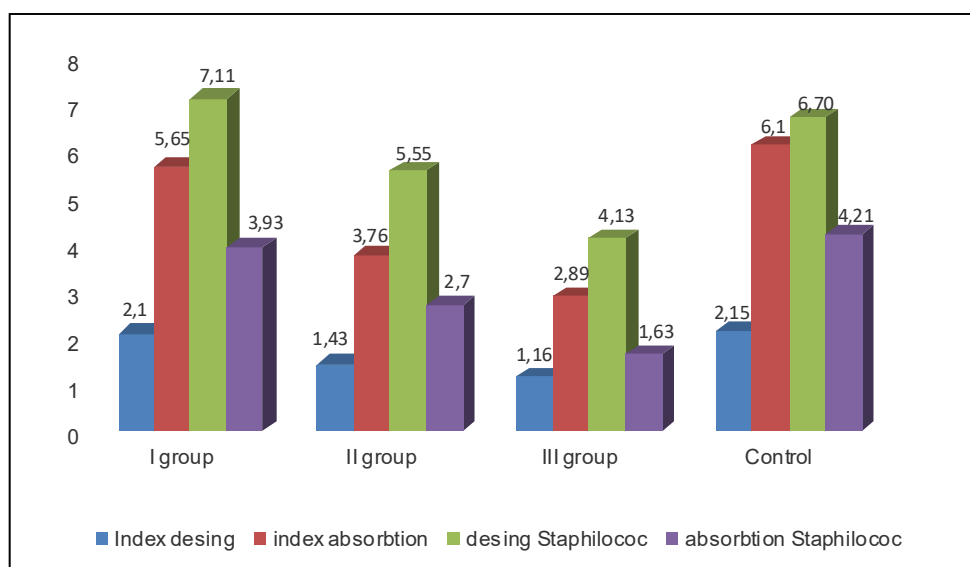


Fig. 1. Phagocytic activity of neutrophils of patients with thyroid cancer.

At the next stage, we examined the nonspecific and specific immunological resistance in patients with thyroid cancer, depending on the type of tumor (Table 1).

The data obtained in Table 1 show that the study of the status of cellular and humoral immunity did not reveal any significant changes in papillary adenocarcinoma of changes in T-lymphocytes (CD 3+), T-helpers (CD4), T-

suppressor (CD8), B-lymphocytes (CD19) and immunoglobulins – JgG, JgM. However, a significant ( $p \leq 0.05$ ) difference was found in the reduction of natural killers (CD16). A correlation between CD16 and TNF- $\alpha$ , JgA, which increased by 15.5% and 12.8% respectively, was also established.

Table 1

Indicators of cell-mediated and humoral immunity in patients with thyroid cancer depending on the type of tumor

Indexes (pkg/ml)	Patients with thyroid cancer			Comparison group (n=27)
	papillary adenocarcinoma (n=41)	follicular adenocarcinoma (n=32)	low-differentiation cancer (n=21)	
T- lymphocytes (CD3+)	888.1±29.9	772.5±41.8*	558.1±25.5*	928.4±26.3
T- helpers (CD4)	311.5±16.2	230.3±12.5*	170.4±8.7*	330.20±12.6
T- suppressor (CD8)	284.4±19.0	254.1±9.1*	161.2±7.7*	295.6±18.2
T- killers (CD16)	238.6±13.7*	179.6±8.6*	134.5±7.1*	275.3±14.3
B-lymphocytes (CD19)	226.8±14.5	187.5±10.2*	160.5±6.5	232.6±19.8
TNF-α	277.3±15.7*	237.5±12.5*	186.7±16.8*	354.2±21.7
JgM	53.5±3.2	45.2±2.5*	37.3±1.5*	54.3±4.5
JgG	44.6±4.0	37.1±2.6*	26.5±2.2*	46.7±3.4
JgA	43.8±3.1*	61.5±5.0*	27.3±1.9*	37.9±2.8

Note: \* probability is reliable  $P < 0.05$

In patients with papillary adenocarcinoma, a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the levels of the studied parameters, secretory immunoglobulin JgA, which increased to  $43.8 \pm 3.1$  pkg/ml was observed as opposed to the data of the comparison group of patients.

Significant inhibition of cellular and humoral immunity was observed in follicular adenocarcinoma in II group, thus, the total number of T-lymphocytes was reduced by 1.7 times, T-helper cells, T-suppressors, T-killers more than 2 times, B-lymphocytes – by 1.5 times. The tumor necrosis factor (TNF-α) was reduced by 2.5 times in the serum of patients with this stage, and immunoglobulins (JgG, JgM, JgA) more than by 1.5 times.

Analysis of the study in the dynamics of these indicators allows us to judge that under the conditions of onco-pathology of the thyroid gland, there is a suppression of the cellular link of the immune system (macrophages, monocytes, histiocytes, T-lymphocytes, dendritic cells) and intercellular mediator interactions that are associated with a decrease in the activity of the humoral immune system, which was confirmed by a significant drop in the level of B-lymphocytes and immunoglobulins (JgG, JgM, JgA).

**Conclusions.** Thus, the results of the research revealed the inhibition of non-specific resistance of the body in patients with thyroid cancer, depending on the cellular structure of the tumor, which was characterized by a decrease in phagocytic activity of neutrophils. These changes took place against the background of the development of endogenous intoxication, pathogenetic links of erythropoiesis and methemoglobinemia. The dynamics of these indicators was closely related to the formation of immunological insufficiency of the cellular and humoral link of the immune system, which requires antioxidant, antitoxic and immunological correction in the implementation of pathogenetic therapy for patients with thyroid cancer.

**References**

1. Ahn D. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. / Ahn D., Heo S.J.,

Park J.H. // J. Acta Oncol. – 2011. – Vol.50. – P.1228–1234.  
 2. Bychkov A. Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry. / Bychkov A., Saenko V., Nakashima M. // J. Thyroid. – 2013. – T.23. – P.817–828.  
 3. French J.D. Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymph nodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. / French J.D., Kotnis G.R., Said S. // J. Clin Endocrinol Metabol. – 2012. – Vol.97:E. – P. 934–943.  
 4. Worden F. Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. // Ther Adv Med Oncol. – 2014. – Vol.6. – P. 267–279.  
 5. Chowdhury S. Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. / Chowdhury S., Veyhl J., Jessa F. // Oncotarget. – 2016. – Vol.7. – P. 32318–32328.  
 6. Bastman J.J. Tumor-infiltrating T cells and the PD-1 checkpoint pathway in advanced differentiated and anaplastic thyroid cancer. / Bastman J.J., Serracino H.S., Zhu Y. // J Clin Endocrinol Metabolism – 2016. – T.101. – P.2863–2873.  
 7. Agata Y. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. / Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H. // Int Immunol. – 1996. – Vol.8. – P.765–772.  
 8. Francisco L.M. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. / Francisco L.M., Sage P.T., Sharpe A.H. // Immunol Rev. – 2010. – Vol. 2. – P.219–242.  
 9. Wang X. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. // J. Onco Targets Ther. – 2016. – Vol.9. – P.5023–5039.  
 10. Papaioannou N.E. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. / Papaioannou N.E., Beniata O.V., Vitsos P., Tsitsilonis O., Samara P. // Ann Transl Med. – 2016. – Vol.4. – P.261-267.  
 11. Romano E. The therapeutic promise of disrupting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in cancer: unleashing the CD8 T cell mediated anti-tumor activity results in significant, unprecedented clinical efficacy in various solid tumors. / Romano E., Romero P. // J. Immunother Cancer. – 2015. – Vol.3. – P.10-

Матеріал надійшов до редакції 03.11.2017

© Граматюк С.М.

УДК 616.36-002. – 022 – 008.9:(612.826.33.015.22 + 577.112.853 + 546.172.6)

## ДИНАМІКА ПАРАМЕТРІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ГОМЕОСТАЗУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С\*

Граматюк С.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти

*В современных условиях внимание клиницистов привлекают вопросы нарушений в системе гомеостаза у больных хроническим вирусным гепатитом С, что объясняется определенным прогрессом знаний в этой области и новыми возможностями распознавания и лечения различных видов этой патологии. Цель исследования – изучение динамики показателей внутриклеточного гомеостаза у больных хроническим вирусным гепатитом С. Результаты проведенных исследований выявили глубокие нарушения обмена ионов металлов у больных хроническим вирусным гепатитом С. В сыворотке крови – отмечалось достоверное ( $p \leq 0,05$ ) повышение железа, меди, цинка, калия, натрия, кальция и снижение ионов магния; в эритроцитах – наблюдалось повышение кальция, магния, натрия, меди и снижение калия, цинка и железа. Установлены нарушения у пациентов с хроническим гепатитом С свидетельствуют о полисистемных структурно-метаболических изменениях и нарушениях внутриклеточного гомеостаза и как следствие развитие при хроническом вирусном гепатитом С мембранной патологии.*

**Ключевые слова:** гомеостаз, хронический вирусный гепатит С, ионы металлов

Вірусний гепатит С (HCV) є однією з основних причин захворювань печінки як у цілому світі, так і в Україні, включаючи цироз та гепатоцелюлярну карциному, для лікування яких необхідна трансплантація органів [1].

Вірус гепатиту С (VHC) був відкритий у 1989 році. З того часу він постійно стимулює вчених до подальшого його вивчення. Широке розповсюдження хронічного вірусного гепатиту С (ХВГС) як одного із результатів інфікування VHC й особливості самого вірусу породжують велику кількість медичних і загальноклінічних проблем: недосконала діагностика гепатиту С; відсутність вакцинації; лікування хворих з цією патологією [2, 3].

Вірусний гепатит С є РНК-вмісним вірусом із родини Flaviviridae, має 6 генотипів і більше 50 субтипів. Нуклеотидні послідовності генотипів різняться в діапазоні 30–50%. VHC має виражені мутаційні властивості. Відсутність активної Т-клітинної імунної відповіді призводить до високої частоти формування хронічної інфекції. Генетична гетерогенність VHC створює діагностичні та клінічні труднощі, ускладнює створення вакцин і ефективних лікувальних препаратів. Для генотипу 1, що в більшості випадків є причиною гепатиту С як у Європі, так і в США, є характерною дуже низька відповідь на проведене лікування [1–3].

В сучасних умовах увагу клініцистів привертають питання порушень в системі гомеостазу у хворих на хронічний вірусний гепатит С, що пояснюється певним прогресом знань в цій області та новими можливостями розпізнавання та лікування різноманітних видів цієї патології у людини.

За даними Атамана О.В. всі показники внутрішньоклітинного гомеостазу можна поділити на три групи: 1. Ті що підтримуються системами організму (температура, напруга кисню та осмотичний тиск) 2.

Ті, що їх підтримують системи організму і частково сама клітина (рН, концентрація глюкози та інших енергетичних субстратів) 3. Ті, що їх підтримує сама клітина (концентрація іонів Na, K, Ca вміст макроергічних сполук, метаболітів [12].

У сучасній клінічній практиці недостатньо обґрунтовані метаболічні критерії оцінки ендогенної інтоксикації у хворих на хронічний гепатит С, що передбачає динамічні зміни та оптимізацію патогенетичної терапії.

Отже для розширення розуміння глибинних патогенетичних механізмів ендогенної інтоксикації, удосконалення діагностики та прогнозування подальшого стану пацієнтів з хронічним перебігом гепатиту С ми поставили мету.

Мета дослідження – вивчення динаміки показників внутрішньоклітинного гомеостазу у хворих на хронічний вірусний гепатит С.

### Матеріали та методи дослідження

Обстежено 73 хворих на хронічний вірусний гепатит С, які проходили планове обстеження у Медико-Діагностичному центрі АСК-Хелс м.Харків. Усім хворим проводили типування вірусного геному, встановлено наявність 3 генотипів HCV-інфекції: За генотип було діагностовано у 13 пацієнтів, 2 генотип – 11, найбільшу групу склали пацієнти з 1b генотипом вірусу – 49. Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб, які не мали в анамнезі хвороб печінки.

Етіологію захворювання встановлювали на підставі виявлення реплікативної активності в сироватці крові RNA HCV якісним та кількісним методом ПЛР із використанням набору тест-систем ELISA kit виробництва США, згідно з інструкцією виробника на ПЛР аналізаторі BIO rad.

Програма дослідження включала визначення вмісту мікроелементів Cu, Fe, Zn та макроелементів

\* Цитування при атестації кадрів: Граматюк С.М. Динаміка параметрів внутрішньоклітинного гомеостазу у хворих на хронічний вірусний гепатит С // Проблеми екології і медицини. – 2017. – Т. 21, № 3-4. – С. 6–9.

K, Na, Ca, Mg у сироватці крові та еритроцитах, а також визначення білків гострої фази гаптоглобіну та церулоплазміну.

Визначення мікро та макроелементів проводили на біохімічному аналізаторі А15, Іспанія, з використанням інструкції виробника.

Церулоплазмін визначався загальноприйнятим методом за Н.А. Ravin, суть якого ґрунтується на окисненні р-фенілендіаміну церулоплазміном. Ферментативна реакція зупинялась при додаванні фтористого натрію. Рівень церулоплазміну визначали на підставі оптичної щільності продуктів реакції.

Вміст гаптоглобіну в сироватці крові досліджували за методом, запропонованим О.Г. Архіповою, суть якого полягає в тому, що гаптоглобін утворює з гемоглобіном комплекс, який осідає при додаванні риванолу. За рівнем гемоглобіну, що залишився в розчині, фотометрично визначали вміст гаптоглобіну в сироватці крові.

Всі дослідження було проведено згідно всіх норм з етики та по стандартним операційним процедурам затвердженим у Медико Діагностичному центрі АСК-Хелс.

Статистична обробка даних проводилася з використанням пакета прикладних програм Statistics for Windows 8.0. Використовували методи – описової статистики (визначення числових характеристик змінних – середньо арифметичної M, середньої похибки вибірки, визначення достовірності відмінностей p), що перевіряються за критерієм Стьюдента-Фішера в репрезентативних вибірках, метод кореляційних структур.

### Результати та їх обговорення

Вивчення динаміки показників клітинного гомеостазу у хворих на хронічний вірусний гепатит С виявило зміни в обміні іонів  $Ca^{2+}$ , достовірно підви-

щення їх концентрації в сироватці крові на 27%. В еритроцитах зазначалося незначне збільшення іонів  $Ca^{2+}$ , що становило  $(0,67 \pm 0,11)$  ммоль/л, в порівнянні з групою контролю. Така динаміка іонів кальцію в досліджуваних біологічних об'єктах, сироватці крові та еритроцитах, може відображати порушення структурно-метаболических процесів, які пов'язані в основному з мобілізацією, перерозподілом і виведенням даного елемента з організму. Вміст іонів магнію мало протилежну спрямованість динаміки обміну іонів кальцію. Так, концентрація іонів  $Mg^{2+}$  в сироватці крові знижувався на 48,1% тоді як в еритроцитах магній підвищувався на 24,5%, відповідно, що мало достовірну різницю між групами. З огляду на важливу кофакторну функцію іонів магнію і участь їх в забезпеченні ферментативних реакцій анаеробного окислення глюкози, слід полагати, що їх підвищення в еритроцитах може бути пов'язано з посиленням активності анаеробного шляху добування енергії у вигляді АТФ при хронічному вірусному гепатиті С (рис.1).

Отже можна припустити, що у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С на фоні зростання концентрації АТФ в клітині, змінюється робота калій-натрієвого насоса за рахунок внутрішньоклітинне накопичення магнію, що викликає конформаційні зміни  $Na^+ - K^+$ -АТФази. В результаті отриманих результатів дослідження динаміки іонів кальцію і магнію виявлено їх значні зміни, що може бути пов'язано з численними структурно-метаболическими порушеннями і в першу чергу мембранних надмолекулярних структур клітини, що призводять до порушень внутрішньоклітинного гомеостазу у хворих на хронічний вірусний гепатит С.

а)



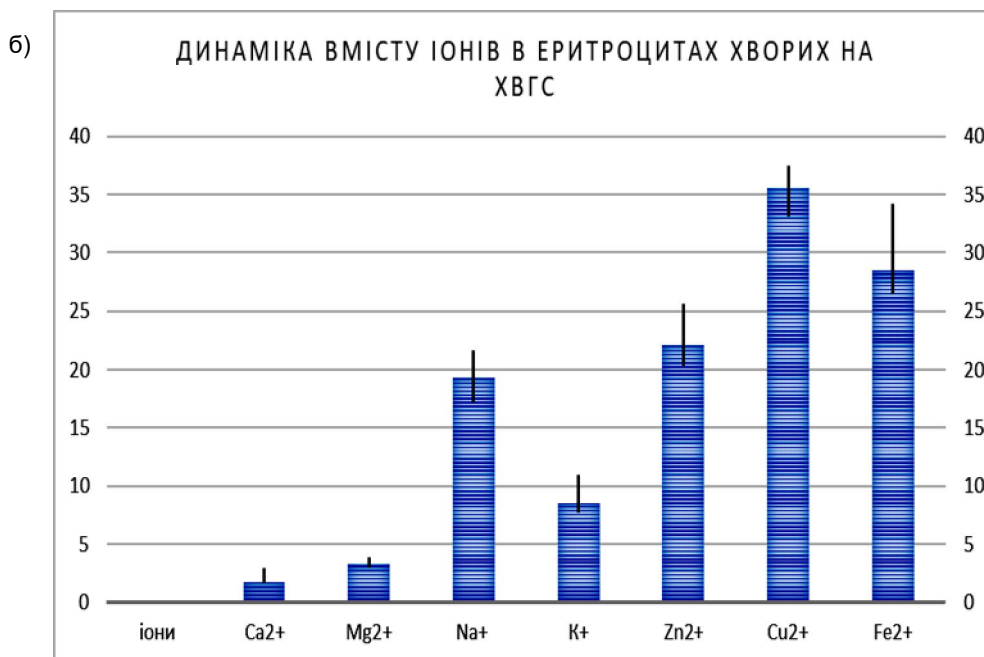


Рисунок 1. Динаміка вмісту іонів в сироватці крові (а) та еритроцитах хворих (б) на хронічний вірусний гепатит С.

Іони  $\text{Na}^+$  підвищувалися в сироватці крові і еритроцитах на 14,5% та 9,5% в порівнянні з контрольною групою. Динаміка обміну іонів калію характеризувалася підвищенням їх в сироватці крові на 25,3%, на тлі зниження в еритроцитах крові на 20,7%. Збільшення  $\text{K}^+$  в сироватці на 73,3%, вказує на порушення стабільності еритроцитів, що забезпечує надходження в кров  $\text{K}^+$  і його виведення з організму хворих на хронічний гепатит С. Спряженість іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  в еритроцитах, супроводжувалася збільшенням концентрації  $\text{Na}^+$  і зниженням  $\text{K}^+$ . Така динаміка цих іонів неминуче призводить до деполяризації еритроцитарних мембран, затримці іонів  $\text{Na}^+$  і втрати  $\text{K}^+$ , що характеризує порушення їх фізико-хімічних і функціональних властивостей. Ці факти вказують на порушення транспортної функції плазматичних мембран у хворих з хронічним гепатитом С.

Вивчення обміну  $\text{Zn}^{2+}$  виявило достовірне ( $p < 0,005$ ) його підвищення в сироватці крові, відповідно на 34,1% і становив ( $29,5 \pm 0,43$  ммоль/л) в порівнянні з контрольною групою. В еритроцитах спостерігалось навпаки, достовірне зниження вмісту іонів цинку ( $16,8 \pm 0,51$  ммоль/л). Дослідження показують, що у хворих на хронічний вірусний гепатит С відбувається істотна втрата іонів цинку. Підвищення рівня цинку в сироватці крові може бути пов'язано зі збільшенням у ній глобулінів з якими він утворює міцні комплекси. Істотну роль в розвитку прояви дефіциту цинку можуть грати структурно-метаболичні порушення біологічних мембран: плазматичної, мітохондріальної, рибосом, лізосом і ін.

Дослідження обміну іонів міді у хворих на хронічний вірусний гепатит С виявило підвищення їх в сироватці крові та еритроцитах, відповідно на 32,1%, 41,6%, в порівнянні з контрольною групою. Мідь бере активну участь в процесах кровотворення, імунних і окислювально-відновлювальних реакціях. У сироватці, вона пов'язана з  $\alpha_2$ -глобулінами і входить до фракції сироваткової оксидази – церулоплазміну. Збільшення в аналізованих об'єктах іонів міді, може бути

пов'язане з активацією кровотворення, імунної системи і окислювальних реакцій, які слід розглядати як фазу адаптації організму в умовах розвитку хронічного гепатиту вірусної етіології.

Вивчення динаміки заліза в органах і тканинах виявило підвищення його концентрації в сироватці крові на 119,4%. В еритроцитах спостерігалось зниження заліза на 11,5%. З огляду на участь заліза у транспорті кисню і процесах клітинного дихання, а також входження до складу гемоглобіну, трансферину, феритину і аналіз динаміки іонів заліза в біологічних об'єктах, дозволяють судити про порушення стабільності еритроцитарних мембран, сполученого з виходом іонів  $\text{Fe}^{2+}$  в сироватку крові.

Багато авторів переконують, що важлива роль в забезпеченні мембран динамічною стабільністю відводиться інтеграційним системам контролю гомеостатичної функції організму (нервовою, ендокринною, імунною, ферментативною), що спостерігається у хворих на ХГС [11 – 15, 17].

Основною причиною порушення гомеостазу може бути структурно-метаболична дезорганізація мембран і як наслідок зміна матеріального, енергетичного і інформаційного балансу клітини, які лежать в основі формування хвороб і розвитку ендогенної інтоксикації [12].

Вивчаючи стан системно-антисистемної взаємодії вірусу гепатиту С, що володіє мембранотропною дією виявлено порушення активності ферментів антирадикального захисту на тлі зменшення показників трансферину (табл.1). При вивченні показників вмісту церулоплазміну визначено, що вони перевищують контрольні значення у 2,5 рази у всіх групах хворих. Однак спостерігається низький рівень трансферину та гаптоглобіну на висоті інтоксикації з нормалізацією симптомів прояву в період ремісії. Низьке значення трансферину на висоті інтоксикації підвищується до періоду ремісії й але вірогідно відрізняється від контрольних значень (табл.1).



Динаміка вмісту білків гострої фази – гаптоглобіну, трансферину і церулоплазміну у хворих на вірусний гепатит С.

Групи хворих на гепатит С	Церулоплазмін ммоль/л	Гаптоглобін г/л	Трансферин мг/л
Хронічний вірусний гепатит С (n =73)	3,112±0,44	*0,211±0,026↓	*2,11±0,26 ↓
Контрольна група (n =20)	2,335±0,65	0,335±0,065	3,5±0,5

**Примітка:** \* – достовірна відмінність від норми

Практично не встановлено змін в динаміці досліджуваних показників в залежності від форми захворювання. Аналіз вмісту білків гострої фази – гаптоглобіну, трансферину і церулоплазміну, виявив значні їх відмінності залежно від генотипу вірусу. Так найбільші зміни спостерігались, у хворих з генотипом 1b, гаптоглобін в сироватці крові зменшувався на 26%, у хворих з генотипом 3a на 14%, від значень контрольної групи. Зменшення в сироватці крові гаптоглобіну у хворих на хронічний вірусний гепатит С, можна розглядати як напруження адаптаційних механізмів забезпечення гомеостазу організму. Церулоплазмін підвищувався на 23,6%; 48% та 19,6% відповідно у хворих з генотипом 3a, 1b та 2. Зниження рівня гаптоглобіну у хворих на хронічний гепатит С, може вказувати на мембранну патологію.

Таким чином, результати проведених досліджень виявили глибокі порушення обміну іонів металів у хворих ХВГС. У сироватці крові – відзначалося підвищення заліза, міді, цинку, калію, натрію, кальцію і зниження іонів магнію; в еритроцитах – спостерігалося підвищення кальцію, магнію, натрію, міді і зниження калію, цинку та заліза, що свідчить про полісистемні структурно-метаболичні зміни та порушення внутрішньоклітинного гомеостазу, як наслідок розвитку при хронічному вірусному гепатиті С мембранної патології.

#### Перспективи подальших досліджень

Визначити закономірності порушення енергозабезпечення як механізм ушкодження клітин у хворих на хронічний вірусний гепатит С.

#### Література

1. Мороз Л.В. Вітамін Д у хворих на хронічний гепатит С / Л. В. Мороз, Е. Е. О. Мусаєв, О. С. Андросова, О. Гай-

- дук // Проблеми військової охорони здоров'я. – 2015. – Вип. 44(2). – С. 250-255.
2. Войнар А.И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека / А.И. Войнар // – М: Высшая школа. – 1980 – 312с.
3. Ещенко В.А. Блокирование цинка как возможная причина клеточной альтерации // Архив патологии. – 1990 №9. – с. 86-88.
4. Clausznitzer D., Harnisch J. Multi-scale model for hepatitis C viral load kinetics under treatment with direct acting antivirals. // Virus research. – 2016. – Vol. 218. – P.96–101. doi: 10.1016/j.virusres.2015.09.011
5. Poordad F. Daclatasvir with sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C virus infection with advanced cirrhosis or post-liver transplantation recurrence. / Poordad F., Schiff E.R., Vierling J.M., Landis C., Fontana R.J., Yang R. // Hepatology. – 2016. – Vol. 63(5). – P.1493–1505. doi: 10.1002/hep.28446.
6. Репин В.С. Критические факторы химической регуляции развития / В.С. Репин // Медицина. – М.: 1980 – 246с.
7. Кузьмин С.Д. Биохимия митотического цикла опухолевых клеток / С.Д. Кузьмин // Київ. – Наукова думка.- 1984. – 172с.
8. Tanase C.P. Caveolin – 1: a marker for pancreatic cancer diagnosis // Expert. Rev. Mol. Diagn. – 2008. – Vol. 8, N4. – P. 395 – 404.
9. Быць Ю. В. Сравнительно-патолофизиологические аспекты энергообеспечения сосудистой стенки / Ю. В. Быць, В. П. Пишак, А. В. Атаман. — Киев-Черновцы: Прут, 1999. — 330 с.
10. Золотов Ю.А. Концентрирование микроэлементов / Ю.А. Золотов, Н.М. Кузьмин // Київ. Наукова думка, 1984. – 283 с.
11. Лойко Е.А. Спектрохимическое определение микроэлементов в сыворотке и моче / Е.А. Лойко // Лаб. Дело. – 1967. – №7. – с.403-406.
12. Атаман О. В. Артериосклероз Менкеберга. Историчний нарис / О. В. Атаман. — Суми: Вид-во СумДУ, 2010. — 86 с.

## ENGLISH VERSION: DYNAMICS OF INTRACELLULAR HOMEOSTASIS PARAMETERS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRUS HEPATITIS C\*

Gramatyuk S.M.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

*In modern conditions, the attention of clinicians is attracted by the problems of disturbances in the system of homeostasis in patients with chronic viral hepatitis C, which is explained by the progress of knowledge in this area and new opportunities for detection and treatment of various types of this pathology. The aim of the research was to study the dynamics of intracellular homeostasis parameters in patients with chronic viral hepatitis C. Results of the study. The results of the conducted studies revealed profound disturbances in the metabolism of metal ions in patients with chronic viral hepatitis C. In serum, there was a significant ( $p \leq 0.05$ ) increase in iron, copper, zinc, potassium, sodium, calcium and a decrease in magnesium ions; in erythrocytes – there was an increase in calcium, magnesium, sodium, copper and a decrease in potassium, zinc and iron. The established disturbances in patients with chronic hepatitis C indicate the poly-system structural and metabolic changes, intracellular homeostasis disorders and, as a consequence, the development of membrane pathology in chronic viral hepatitis C.*

**Keywords:** homeostasis, chronic viral hepatitis C, metal ions

Viral hepatitis C (VHC) is one of the main causes of liver diseases worldwide and in Ukraine, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma, for treatment of which organ transplantation is required [1].

Hepatitis C virus (HCV) was discovered in 1989. Since that time, it constantly encourages scientists for further research in this area. The widespread occurrence of chronic viral hepatitis C (CVHC) as one of the results of infection with HCV and the peculiarities of the virus itself give rise to a large number of medical and general clinical problems: the misdiagnosis of hepatitis C; lack of vaccination; treatment of patients with this pathology [2, 3]. Viral hepatitis C is a RNA-containing virus from the Flaviviridae family, it has 6 genotypes and over 50 subtypes. Nucleotide sequences of genotypes vary in the range of 30-50%. HCV has pronounced mutational properties. The absence of an active T cell immune response leads to a high frequency of chronic infection formation. Genetic heterogeneity of HCV creates diagnostic and clinical difficulties, complicates the development of vaccines and effective therapeutic drugs. Genotype 1, which in most cases is the cause of hepatitis C, both in Europe and in the United States, is characterized by a very low response to treatment [1-3].

In modern conditions, the attention of clinicians is attracted by issues of disorders in the homeostasis system in patients with chronic viral hepatitis C, due to some progress in knowledge in this area and new possibilities for detection and treatment of various types of this pathology in humans. According to O.V. Ataman, all indicators of intracellular homeostasis can be divided into three groups: 1. Indicators supported by the body systems (temperature, oxygen pressure and osmotic pressure) 2. Indicators supported by the system of the body and, partially, the cell itself (pH, glucose concentration and other energy substrates) 3. Indicators supported by the cell itself (concentration of ions Na, K, Ca content of macroergic compounds, metabolites) [12].

In modern clinical practice, the metabolic criteria for evaluation of endogenous intoxication in patients with chronic hepatitis C are insufficiently grounded, which involves dynamic changes and optimization of pathogenetic therapy. Thus, we have set an objective to expand

understanding of the endogenous pathogenetic mechanisms of endogenous intoxication, to improve diagnostics and to predict the future state of patients with chronic hepatitis C disease. The purpose of the research is to study the dynamics of intracellular homeostasis in patients with chronic viral hepatitis C.

### Materials and methods

A total of 73 patients with chronic viral hepatitis C were screened at the Mediciko Diagnostic Center ASK-Heles in Kharkiv. All patients were vaccinated with the virus genome, the presence of 3 genotypes of HCV infection was detected: 3a genotype was diagnosed in 13 patients, 2 genotypes – 11, the largest group was patients with 1b genotype of the virus – 49. The control group included 20 practically healthy persons who did not have the liver disease in anamnesis. The disease was established based on the detection of RNA HCV serum replicative activity in a qualitative and quantitative PCR method using a set of US ELISA kit test systems, according to the manufacturer's instructions on the BIO-rad analyzer.

The study included the determination of the content of Cu, Fe, Zn, and macrocells K, Na, Ca, Mg in blood serum and red blood cells, as well as the determination of the acute phase proteins of haptoglobin and ceruloplasmin.

The determination of micro- and macro elements was carried out on the biochemical analyzer A15, Spain, using the manufacturer's instructions.

Ceruloplasmin was determined via the generally accepted method by H.A. Ravin, the essence of which is based on the oxidation of p-phenylenediamine ceruloplasmin. An enzymatic reaction was stopped by the addition of sodium fluoride. The level of ceruloplasmin was determined based on the optical density of the reaction products. The content of haptoglobin in serum was investigated according to the method proposed by O.G. Archipelago, the essence of which is that haptoglobin forms a hemoglobin complex, which precipitates with the addition of rivanol. By the level of hemoglobin remaining in the solution, the content of haptoglobin in the serum was determined photometrically.

All studies were conducted in accordance with all norms of ethics and standard operating procedures approved at the Medical Diagnostic Center ASK-Hells. Sta-

\* To cite this English version: Gramatyuk S.M. Dynamics of intracellular homeostasis parameters in patients with chronic virus hepatitis C // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 10–13.

tistical data processing was performed using the application package for Statistics for Windows 8.0. The following methods were used – descriptive statistics (the definition of numerical characteristics of variables – arithmetic mean  $M$ , average sample error, determination of the reliability of differences  $p$ ), checked by the criterion of Student-Fisher in representative samples, the method of correlation structures.

**Results and discussion**

The study of the dynamics of cell homeostasis in patients with chronic viral hepatitis C revealed changes in the exchange of  $Ca^{2+}$  ions, a significant increase in their serum concentration of 27%. In erythrocytes, a slight increase in  $Ca^{2+}$  ions was noted ( $0.67 \pm 0.11$  mmol / L) as compared with the control group. Such dynamics of calcium ions in the investigated biological objects, blood se-

rum and erythrocytes, can reflect the disruption of structural and metabolic processes, which are mainly associated with the mobilization, redistribution and withdrawal of this element from the body. The content of magnesium ions had the opposite orientation of the dynamics of exchange of calcium ions. Thus, the concentration of ions  $Mg^{2+}$  in serum decreased by 48.1% while in erythrocytes magnesium increased by 24.5%, respectively, which had a significant difference between the groups. Given the important cofactorial function of magnesium ions and their involvement in providing enzymatic reactions of anaerobic oxidation of glucose, it should be noted that their increase in erythrocytes may be due to an increase in the activity of an anaerobic pathway of energy in the form of ATP in chronic viral hepatitis C (Fig. 1).

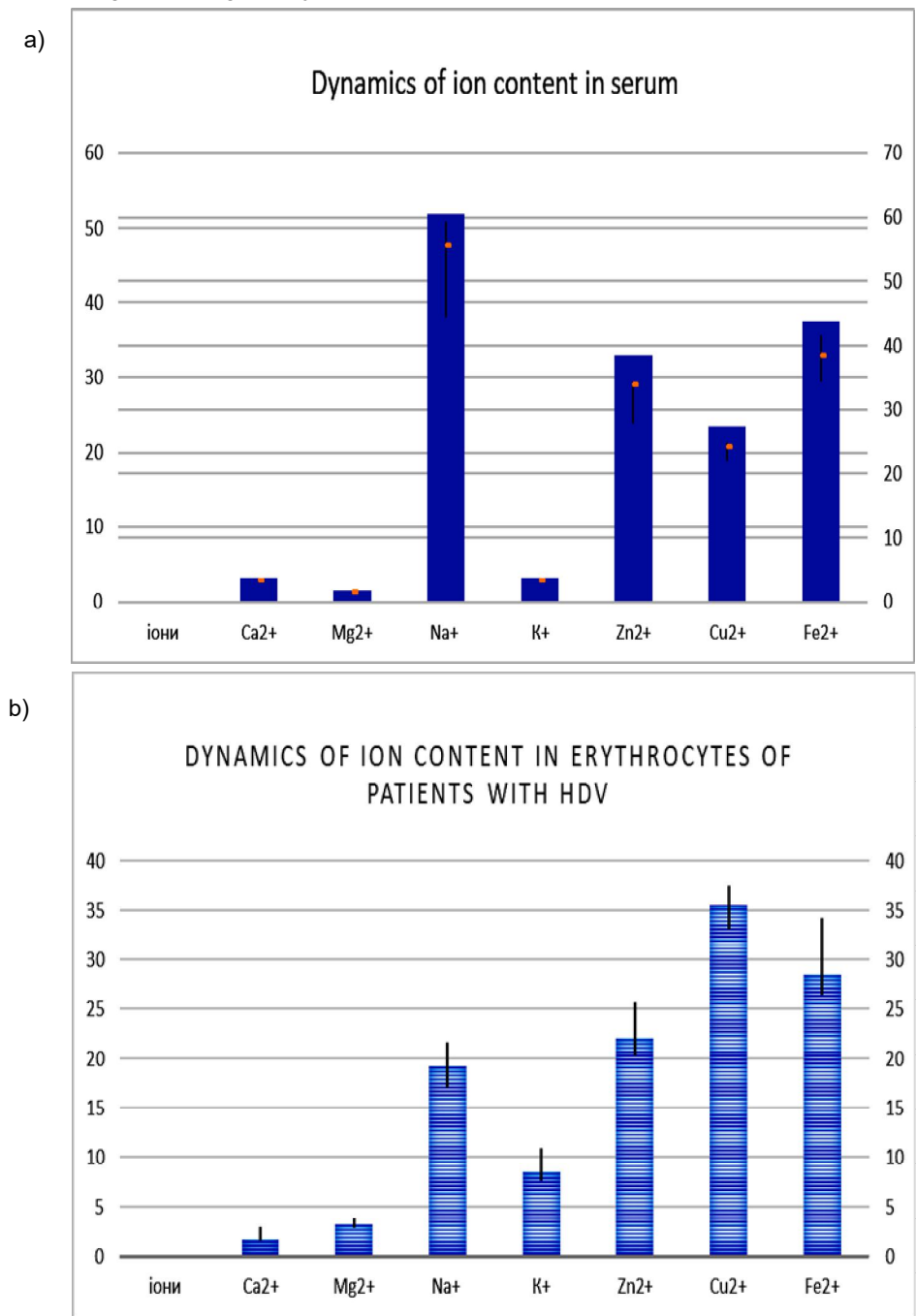


Figure 1. Dynamics of ion content in serum (a) and red blood cells (b) in patients with chronic viral hepatitis C.

Consequently, it can be assumed that in patients with chronic viral hepatitis C against the background of increase in the concentration of ATP in the cell, the work of potassium-sodium pump changes due to intracellular accumulation of magnesium, causing conformational changes in Na + – K + -ATPase. As a result of the study, the dynamics of calcium and magnesium ions, significant changes were detected that could be due to numerous structural and metabolic disorders and, in particular, membrane supramolecular cell structures, leading to intracellular homeostasis in patients with chronic viral hepatitis C.

Na + ions were elevated in blood serum and erythrocytes by 14.5% and 9.5%, as compared with the control group. The dynamics of exchange of potassium ions was characterized by an increase in blood serum of 25.3%, against a background of red blood cell counts of 20.7%. Increase in serum K + by 73.3% indicates a disruption of the stability of erythrocytes, which ensures the entry into the blood of K + and its withdrawal from the body of patients with chronic hepatitis C. Conjugation of Na + and K+ ions in erythrocytes was accompanied by an increase in the concentration of Na + and decrease K +. Such dynamics of these ions inevitably leads to depolarization of erythrocytic membranes, delayed Na+ ions and loss of K+, which characterizes the disruption of their physical, chemical and functional properties. These, the facts indicate a disruption of the transport function of plasma membranes in patients with chronic hepatitis C.

The study of the exchange of Zn2 + revealed a significant increase (p. 0.005) in its blood serum, 34.1%, and was (29.5 ± 0.43 mmol / l) in comparison with the control group. In red blood cells, on the contrary, a significant decrease in the content of zinc ions (16.8 ± 0.51 mmol / l) was observed. Studies show that patients with chronic viral hepatitis C have a significant loss of zinc ions. Increased level of zinc in the blood serum may be due to an increase in her globulins with which he forms strong complexes. A significant role in the development of the manifestation of zinc deficiency can belong to structural and metabolic disorders of biological membranes: plasma, mitochondrial, ribosomes, lysosomes, etc.

The study of the exchange of copper ions in patients with chronic viral hepatitis C showed an increase in their serum and red blood cells, respectively, by 32.1%,

41.6%, as compared with the control group. Copper is actively involved in the processes of hematopoiesis, immune and oxidative-reducing reactions. In serum, it is linked to α2-globulins and is part of the serum oxidase fraction – ceruloplasmin. An increase in the analyzed objects of copper ions, may be associated with the activation of hematopoiesis, the immune system and oxidative reactions, which should be considered as the phase of adaptation of the organism in the development of chronic hepatitis viral etiology.

The study of the dynamics of iron in organs and tissues revealed an increase in its concentration in serum on 119.4%. In erythrocytes there was a decrease in iron by 11.5%. Given the involvement of iron in oxygen transport and processes of cellular respiration, as well as the entry of hemoglobin, transferrin, ferritin and the analysis of the dynamics of iron ions in biological objects, one can judge the disruption of the stability of erythrocytic membranes, which is connected with the release of Fe2+ ions in the blood.

Many authors are convinced that an important role in providing the membranes with dynamic stability is given to the integration systems for controlling the homeostatic function of the organism (nervous, endocrine, immune, enzymatic), which is observed in patients with CSF [11 – 15, 17].

The main reason for the disruption of homeostasis may be the structural and metabolic lesion of membranes and, as a consequence, a change in the material, energy and information balance of cells, which underlie the formation of diseases and the development of endogenous intoxication [12].

Studying the condition of the systemic and antisystem interaction of the hepatitis C virus, which has membranotropic action, the disruption of the activity of enzymes of antiradical protection was detected against the background of reduction of transferrin (Table 1).

When studying the contents of ceruloplasmin, it is determined that they exceed the control values by 2.5 times in all groups of patients. However, there is a low level of transferrin and haptoglobin at the height of intoxication with the normalization of manifestation symptoms in the remission period. The low value of transferrin at the height of intoxication increases to the remission period, but it is significantly different from the control values (Table 1).

Table 1  
Dynamics of the content of acute phase proteins – haptoglobin, transferrin and ceruloplasmin in patients with viral hepatitis C.

Groups of patients with hepatitis C	Ceruloplasmin mmol / l	Haptoglobin g / l	Transferrin mg / l
Chronic viral hepatitis C (n =73)	3.112±0.44	*0.211±0.026↓	*2.11±0.26 ↓
Control group (n =20)	2.335±0.65	0.335±0.065	3.5±0.5

Note: \* – a significant difference from the norm

Practically no changes were found in the dynamics of the studied parameters, depending on the form of the disease. Analysis of the content of acute phase proteins – haptoglobin, transferrin and ceruloplasmin, revealed significant differences, depending on the genotype of the virus. So the biggest changes were observed, in patients with genotype 1b, haptoglobin in serum decreased by 26%, in patients with genotype 3a by 14%, from the values of the control group. The decrease in serum of haptoglobin in patients with chronic viral hepatitis C can be considered as the strain of adaptive mechanisms for pro-

viding homeostasis of the body. Ceruloplasmin increased by 23.6%; 48% and 19.6%, respectively, in patients with genotype 3a, 1b and 2. Decreased levels of haptoglobin in patients with chronic hepatitis C, may indicate membrane pathology.

Thus, the results of the conducted research revealed deep disturbances in the metabolism of metal ions in patients with HBGS. In serum, there was an increase in iron, copper, zinc, potassium, sodium, calcium and magnesium ions; in erythrocytes – there was an increase in calcium, magnesium, sodium, copper, and a decrease in

potassium, zinc and iron, indicating polysystem structural and metabolic changes and intracellular homeostasis, as a consequence of development in chronic viral hepatitis C membrane pathology.

Prospects for further research consist in determining the laws of energy supply disturbance as a mechanism of damage to cells in patients with chronic viral hepatitis C.

#### References

1. Moroz L. Vitamin D in patients with chronic hepatitis C / L.V. Moroz, E. E.O. Musaev, O.S. Androsov, O.Haiduk // Problems of military health. – 2015. – Is. 44 (2). – P. 250-255.
2. Voynar A.I. The biological role of microelements in the organism of animals and humans / A.I. Voynar // – M: Higher school. – 1980 – 312 p.p.
3. Eshchenko V.A. Blocking zinc as a possible cause of cellular alteration // Archive of pathology. – 1990 No. 9. – 86-88 p.p.
4. Clausnitzer D., Harnisch J. Multi-scale model for hepatitis C viral load kinetics under treatment with direct acting antivirals // Virus research. – 2016 – Vol. 218. – p. 96-101. doi: 10.1016 / j.virusres.2015.09.011
5. Pozdad F. Daclatasvir with sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C virus infection with advanced cirrhosis or post-liver transplantation recurrence. / Poordad F., Schiff E. R., Vierling J. M., Landis C., Fontana R. J., Yang R. // Hepatology. – 2016 – Vol. 63 (5). – P.1493-1505. doi: 10.1002 / hep.28446.
6. Repin V.S. Critical factors of chemical regulation of development / VS Repin // Medicine. – Moscow: 1980 – 246 p.
7. Kuzmin S.D. Biochemistry of the mitotic cycle of tumor cells / SD Kuzmin // Kiev. – Scientific thought.-1984. – 172 p.
8. Tanase C.P. Caveolin – 1: a marker for pancreatic cancer diagnosis // Expert. Rev. Mol Diagn – 2008. – Vol. 8, N4. – P. 395 – 404.
9. Byts Yu. V. Comparative-Pathophysiological Aspects of Power Supply to the Vascular Wall / Yu. V. Byts, V. P. Pishak, A. V. Ataman. – Kiev-Chernivtsi: Prut, 1999. – 330 p.
10. Zolotov Yu.A. Concentration of microelements / Yu.A. Zolotov, NM Kuzmin // Kiev. Scientific Opinion, 1984. – 283 p.p.
11. Loiko E.A. Spectrochemical determination of trace elements in serum and urine / E.A. Loiko // Lab. Case. – 1967. – No. 7. – pp. 403-406.
12. Ataman O. V. Arteriosclerosis Menkeberg. Historical essay / O. V. Ataman. – Sumy: Sumy State University, 2010. – 86 p.

*Матеріал надійшов до редакції 25.10.2017*

© Bagmut I.Yu., Kuzmenko O.A., Gramatiuk S.M., Titkova A.V.  
UDK 616.211 – 002 – 008.9 – 092 – 085.238

## THE STUDY OF PATHOPHYSIOLOGICAL LINK OF AUTOIMMUNIZATION IN PATIENTS WHO USE SOFT CONTACT LENSES\*

Bagmut I.Yu., Kuzmenko O.A., Titkova A.V.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv

*In this work, the state of the immune system was studied in the patients using soft contact lenses for various variants of the normal microflora eyes. Analyzing the absolute number of lymphocytes in the peripheral blood, we found that these indices are within the limits of normal physiological fluctuations and do not have a significant difference between the groups. The same tendency was observed in the study of the content of common T-lymphocytes, and their number in all groups is within the limits of normal physiological parameters. The inhibition of the IL-2 expression activator confirms our assumption of latent suppression of the T-immune system, especially in patients who have a smoking habit. It has been found that in patients who use soft contact lenses and have a habit of smoking there is a decrease in the level of B-lymphocytes. However, despite the normal immunological parameters of B-lymphocytes, in the 1st group as well as in the 2nd group there is a hidden inhibition of the T-immune system.*

**Keywords:** immune system, soft contact lenses, normal microflora

*У роботі вивчали стан імунної системи у пацієнтів, що використовують м'які контактні лінзи при різних варіантах стану нормальної мікрофлори ока. Аналізуючи абсолютну кількість лімфоцитів у периферичній крові, ми виявили, що ці показники знаходяться в межах нормальних фізіологічних коливань і не мають суттєвої різниці між групами. Така ж тенденція спостерігалася при вивченні вмісту загальних Т-лімфоцитів, а їх кількість у всіх групах перебуває в межах нормальних фізіологічних параметрів. Інгібування активатора експресії ІЛ-2 підтверджує наше припущення про приховане пригнічення Т-імунної системи, особливо у пацієнтів, які палять. Було виявлено, що у пацієнтів які використовують м'які контактні лінзи та мають звичку паління має місце зниження рівня В-лімфоцитів. Однак незважаючи на нормальні імунологічні показники В-лімфоцитів, в I групі також як і в II групі спостерігається приховане пригнічення Т-системи імунітету.*

**Ключові слова:** імунна система, контактні лінзи, нормальна мікрофлора

Wearing contact lenses increases the risk of eye infections, corneal damage, and changes the natural microflora of the eye. In any case, the results of wearing contact lenses can potentially be either dangerous or catastrophic. In order to understand the risks, it is useful to understand how the eye works and how contact lenses help correct vision. If a patient does not care about the eyes and lenses, one can increase the risk of complete loss of vision.

Contact lenses are literally in “contact” with the eye. These lenses are prescription based, and they are intended for correction of visual errors – in essence, they resemble miniature glasses. They change the place where the light focuses on the retina, which improves vision.

Soft lenses move along with the eye, floating above the surface of the cornea. The concept of contact lenses was demonstrated in 1508 by Leonardo da Vinci. The first lenses were made of glass in 1887.

For many years, they have evolved to plastic, soft lenses, disposable lenses, air-permeable versions; recently, silicone hydrogel has appeared, manufactured on an individual basis.

Air-permeable lenses are made of hard plastic, they have less water, they are less flexible than soft lenses, but are better resistant to bacteria. These lenses keep shaping when you blink and support diopters better than soft lenses.

In a 2016 newsletter from ABC, Dr. William Faulkner of the Eye Institute in Cincinnati warns that 20,000 people annually contract *Pseudomonas aeruginosa*. According to the Center for the control and prevention of diseases, 50% of people do not remove contact lenses overnight.

Unfortunately, this practice leads to an increased risk of eye infections, which can lead to further infection and loss of vision. If not treated, one can lose one's sight.

Faulkner believes that people who sleep in lenses (even those called “overnight”), and who have a habit of smoking, are 10 times more likely to contract eye infections.

Almost every fifth of eye patients has complications due to the use of contact lenses, which include corneal injuries, corneal transplantation, and loss of vision.

However, in the literature we did not find data on the study of the immune system in patients who use soft contact lenses.

The aim of the research is to investigate the state of the immune system in patients who use soft contact lenses in various variants of normal microflora of the eye.

### Materials and methods

The study included 72 patients who have used soft contact lenses for at least one year. All patients were divided into two groups: the 1st group included 32 patients who had a habit of smoking and/or sleeping in lenses; the 2nd group – 40 patients, non-smokers, using soft contact

\* To cite this English version: Bagmut I.Yu., Kuzmenko O.A., Gramatiuk S.M., Titkova A.V. The study of pathophysiological link of autoimmunization in patients who use soft contact lenses // *Problemy ekologiji ta medytsyny*. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 14-17.

lenses. The study group included patients aged 21 to 60 years old, with an average age of  $34 \pm 6.2$  years.

Only patients who have used soft contact lenses for at least 1 year and had no history of infectious eye diseases during the last 6 months have been included in this study. Non-specific protective factors were investigated in all patients, the leading link of which are phagocytic cells, involved in the elimination of foreign antigens due to their intracellular enzyme systems. The patients were evaluated for the total number of leukocytes, relative and absolute number of lymphocytes, phenotypes of lymphocytes at presence of CD antigens on their surface (CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, CD25, CD95); the levels of immunoglobulins of classes A, M, G, E, circulating immune complexes (CIC), hemolytic activity of the complement (CH 50), phagocytosis parameters of neutrophil granulocytes with latex, lysosomal cationic proteins (LCP) and NST spontaneous and stimulated tests were studied.

CIC was determined in serum of blood by spectrophotometric method for Dijon RN. The method is based on the ability of polyethylene glycol (PEG 6000) at low concentrations to precipitate immune complexes in serum. The concentration of the protein in the precipitate was determined by the level of the CIC. Measurements were made using a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm; the levels of the CIC were expressed in units of optical density. Determination of complement hemolytic activity was performed by the method of 50% hemolysis in the modification of Reznikova L. C. The principle is based on the phenomenon of erythrocyte lysis in the presence of antierythrocytic antibodies and complement. To evaluate the complement activity, the hemolytic system was introduced into the serum. The detection of lysosomal cationic proteins (LCP) was performed by the cytochemical

method according to MG Shubichik. Microscopy of the smears was performed under a microscope with an increase of  $\times 90$  in the immersion system, 100 neutrophils were counted, and % of NST-positive cells containing the dyformasan was determined. In the spontaneous NST test, the norm is 10%, in the stimulated – from 40%. In addition, the neutrophil activity index (IAN) was calculated according to the Astaldy-Berg formula.

The microbiological study was performed on all patients using soft contact lenses. Identification of bacteria was carried out according to generally accepted criteria. The culture of bacteria was grown on a liquid nutrient medium for 1-2 days at 37 °C to a concentration of 2 billion cells / ml.

All stages of the study were performed on the clinical basis of the medical diagnostic center "ASK-Health".

The research was conducted in compliance with all ethical and legal norms and protocols, in accordance with the legislation of Ukraine.

The results of the study were processed using the EXCEL and STATISTICA 6 applications.

### Results and discussion

The lack of data on the state of immunity of patients using soft contact lenses in the literature was the basis for its study, the study may contribute to the resolution of the pathophysiologic formation of immunological disorders and as a consequence of infectious complications. The analysis of the state of the immune system provided for the determination of the total number of all lymphocytes and their varieties in peripheral blood in absolute and relative values (Table 1).

Table 1  
The state of cellular immunity in patients who use soft contact lenses

Patients' groups	Indicators of the state of the immunity system							
	The number of lymphocytes, %	The absolute number of lymphocytes $\times 10^9/L$	CD3, %	CD3, $\times 10^9/L$	CD4, %	CD4, $\times 10^9/L$	CD8, %	CD8, $\times 10^9/L$
Comparison group	18-38	0.72-3.42	67-76	1.1-1.7	38-46	0.7-1.1	31-40	0.5-0.9
Ist group (smokers)	53.4± 2.45*	2.45± 0.24	75.7± 1.6	1.8± 0.25	38.1± 1.5	1.2± 0.20	30.9± 1.1	0.56± 0.04
IInd group	43.6± 3.35	2.31± 0.15	75.1± 1.25	1.73± 0.13	46.8± 1.3	1.0± 0.11	31.2± 2.1	0.81± 0.10

Notes:  $P < 0.05$  – differences in values when compared between groups.

The study found that the relative number of lymphocytes varies widely and tends to increase, on average, ( $44.73 \pm 5.1$ )%. However, patients with a smoking habit of the 1st group have a significantly higher incidence ( $p \leq 0.05$ ) the reaction voltage from the lymphoid system, while the number of lymphocytes in such persons was ( $53.4 \pm 2.45$ )%. High indicators of the relative number of lymphocytes are also observed in the second group – ( $43.6 \pm 3.35$ )%. The increased relative numbers of lymphocytes in both groups of study, in our opinion, show a different pathophysiologic mechanism of the reaction of the lymphoid system. In group II, lymphocytes can reflect the expressed reactivity of the immune system on the pathological process, and in group I – indicates the presence of chronic inflammatory reaction in the body due to smoking.

Analyzing the absolute number of lymphocytes in the peripheral blood, we found that these indices are within the limits of normal physiological fluctuations and do not

have a significant difference between the groups. The same tendency was observed in the study of the content of common T-lymphocytes, and their number in all groups is within the limits of normal physiological parameters. There was a stable uniform content of total T-lymphocytes at the upper limit of the norm – (from  $75.7 \pm 1.6\%$  to  $75.1 \pm 1.25\%$ ).

As a result of the study, the absolute number of CD-3 T lymphocytes in the 1st group was  $1.82 \times 10^9/L$ , which is significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than in the comparison group. The obtained results of the study suggest that the main population of common T-lymphocytes (CD3) is represented by T-helper. Indicators of the second group were significantly higher than normal, however, the difference between patients and both groups was not detected. The analysis of the relative level of T-helper cells – CD4 in the blood corresponds to the normal value in patients of group II and remains at the level of the upper limit of norm – ( $46.8 \pm 1.3$ )%. In patients of group I, the

relative level of CD4 is at the lower limit of the norm and has no significant difference when compared with the control values. However, it should be noted that the absolute number of T-helper (CD4) in patients of group I deviates from the control values in both directions, as in the direction of decrease – 26.78% in comparison with the norm, and in the direction of increasing their number – at 13.5% of cases. Such a situation may be due to the voltage of the T-system of immunity and the T-helper type 2 immune response at the onset of the disease, that is, in the process of prolonging the disease, the immune status of the organism is suppressed.

Relative content of T suppressors – CD8 did not have a significant difference between the groups.

The absolute number of T suppressors – CD8 in patients of Group I is at the lower limit of the norm –

$0.56 \times 10^9/L$ , while in the second group of patients the number of T suppressors – 1.2 times higher and reaches the upper limit of the norm –  $0.81 \times 10^9/L$ .

Consequently, despite the normal immunological performance in all groups, the latent immune suppression of the T-immune system is nevertheless traced in group I.

The abovementioned data finds its confirmation in the study of the dynamics of other indicators of immunity (Table 2). Absolute content of natural killers CD16 in patients of group I is significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower than in group II, although it corresponds to the norm –  $0.31 \times 10^9/L$ . That is, the content in the blood of natural killers, although consistent with the norm, similar to T-lymphocytes, in the 1st group, this limit is significantly lower.

Table 2  
Some indicators of the state of immunity in patients who use soft contact lenses

Patients' groups	Indicators of the state of the immunity system								
	CD16,%	CD16, $\times 10^9/L$	CD20, %	CD20, $\times 10^9/L$	CD25,%	CD25, $\times 10^9/L$	CIC with 3.5 % PEG, un.	CD95,%	CD95, $\times 10^9/L$
Comparison group	10-19	0.2-0.4	11-16	0.2-0.4	10-18	0.54-1.16	10±2	5-20	0.1-0.5
Group I	18.26±1.68	0.31±0.14**	16.4±0.67	0.27±0.09**	20.7±0.16	0.32±0.05**	12.9±1.15	18.55±2.5*	0.33±0.01
Group II	17.4±0.08	0.45±0.01	14.0±0.01**	0.39±0.05	19.6±1.10	0.47±0.02	10.4±1.42**	13.6±0.14**	0.31±0.02

Notes: \* –  $p < 0.05$  – the differences are significant from the indicators of other age groups;

\*\* –  $p < 0.05$  – the differences are significant from the indicators of other age groups and comparison group.

When analyzing the absolute content of B-lymphocytes in the blood of patients in the studied groups, we found that their lowest rates were found in the group of smokers who use soft contact lenses.

Investigation of the content in the activator of expression of interleukin 2 (IL 2) – CD25 in absolute numbers has established a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in its content in both groups in comparison with the norm. Patients in group I with a habit of smoking, this figure was particularly low, but had a significant difference in comparison between the groups ( $20.7 \pm 0.16$ )%. Interleukin 2 is a mediator of inflammation and an activator of the synthesis of T-lymphocytes, on the one hand, and on the other – participates in the process of differentiation and maturation of T-cells. The inhibition of the IL-2 expression activator confirms our assumption of latent suppression of the T-immune system, especially in patients who have a smoking habit.

Except for the detected dynamics, the rates of circulating immune complexes in the studied patients, in which they exceeded the control values, and in smokers, this figure already ( $12.9 \pm 1.15$ )%.

In the study of apoptosis receptors – CD95, it was found that in absolute numbers in all groups their number was practically the same and did not have a significant difference.

The study of apoptosis receptors on CD95 lymphocytes did not reveal any disturbances in their composition. The number of lymphoid cells with apoptotic receptors, CD95 in both relative and absolute numbers, is within normal physiological oscillations, which suggests that apoptosis does not play a role in the violation of cellular immunity.

Analyzing the obtained data of the state of the T-system of immunity, it should be noted that when using soft contact lenses, there is dissociation of it in general,

and in particular in its various links, as evidenced by the increase and decrease in the number of common T-lymphocytes, the activation of T-helper cells and decrease in the number of T-suppressors. The latter may be the pathophysiologic cause of autoimmunization of the patient's body and accumulation of the CIC.

Summarizing the analysis of the status of the B-immune system in patients under study, we can conclude that there is no significant change in this immune system. One can only note the increase in the absolute number of B-lymphocytes in smokers and the tendency to reduce the local immunity in this group.

**Conclusions.** Based on the obtained results, it can be concluded that in patients who use soft contact lenses and have a habit of smoking there is a decrease in the level of B-lymphocytes. However, despite the normal immunologic parameters of B-lymphocytes, in the 1st group as well as in the 2nd group there is a hidden inhibition of the T-immune system.

### References

1. Dart J.K. Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis. // Dart J.K., Stapleton F., Minassian D. // J. Lancet. – 1991. – Vol.3. – P. 650–653. doi: 10.1016/0140-6736(91)91231-I.
2. Tabbara K.F. Extended wear contact lens related bacterial keratitis. // Tabbara K.F., El-Sheikh H.F., Aabed B. // Br.J. Ophthalmol. – 2014. – Vol.8. – P. 327–328. doi: 10.1136/bjo.84.3.327.
3. Morgan P.B. Incidence of keratitis of varying severity among contact lens wearers. // Br.J. Ophthalmol. – 2015. – Vol.9(4). – P. 430–436. doi: 10.1136/bjo.2004.052688.
4. Robertson D.M. The effects of silicone hydrogel lens wear on the corneal epithelium and risk for microbial keratitis. // Eye Contact Lens. – 2013. – Vol. 3(1). – P.67–72. doi: 10.1097/ICL.0b013e31827c5b73.
5. Stern G.A. Contact lens associated bacterial keratitis: past, present, and future. // CLAO J. – 2008. – Vol.2(1). – P.52–56.



6. McLaughlin-Borlace L. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. /McLaughlin-Borlace L., Stapleton F., Matheson M., Dart J.K. // J.ApplMicrobiol. – 2008. – Vol.4(5). – P.827–838. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00418.x.
7. Percival S.L. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control./Percival S.L., Suleman L., Vuotto C., Donelli G. //J.Med.Microbiol. – 2015. – T.64. – P.323–334. doi: 10.1099/jmm.0.000032.
8. Veerachamy S. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. //ProInstMechEng H J Eng Med. – 2014. – Vol.2(10). – P.1083–1099. doi: 10.1177/0954411914556137.
9. Dutta D. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. /Dutta D., Cole N., Willcox M. // Mol Vis. – 2012. – T.18. – P.14–21.
10. Barraud N. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas Aeruginosa*. // J Bacteriol. – 2006. – T.188(21). – P.7344–7353. doi: 10.1128/JB.00779-06.
11. Bispo P.J. Biofilms in infections of the eye. /Bispo P.J., Haas W., Gilmore M.S.//J. Pathogens. – 2015. – Vol.4(1). – P. 111–136. doi: 10.3390/pathogens4010111.

*Матеріал надійшов до редакції 26.10.2017*

© Movchan O.V., Titkova A.V.  
UDK 616.33 – 006 – 092 : 612.017

## PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF CREATION OF CRYOPRECIPITATE IN PATIENTS WITH INOPERABLE CANCER IN DISTURBANCES FROM MICROSATELLITE INSTABILITY\*

Movchan O.V., Titkova A.V.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv

*The study of the mechanisms of pathophysiological patterns of microsatellite illness in patients with inoperable stomach cancer will improve early diagnosis and improve the ways of correction of the revealed violations. The purpose of the work was to identify the pathophysiological patterns of the formation of cryoprecipitate in patients with inoperable gastric cancer, depending on the microsatellite instability (MSI). Blood serum was examined in 70 patients who received a comprehensive treatment for gastric cancer. The diagnosis of all patients is verified histologically; the prevalence of the process was revealed after performing CT scan with intravenous contrast. The isolation of cryoglobulins from blood serum was performed using A.E. Kalovidoris with modifications. In patients with inoperable gastric cancer, with the presence of instability of microsatellites in the locus of VAT-25 and / or VAT-26, the use of fluorouracil was more effective in patients with cryoprecipitate levels of  $298.6 \pm 2.5$  mg / l, while the index was higher than  $477.3$  mg / l, indicated a low level of efficiency.*

**Key words:** cryoglobulins, serum, patients, stomach cancer.

*Вивчення механізмів патофізіологічних закономірностей мікросателітної нестабільності у хворих з неоперабельним раком шлунка сприятиме ранній діагностиці та вдосконаленню способів корекції виявлених порушень. Метою роботи було виявлення патофізіологічних закономірностей формування кріопреципітату у хворих з неоперабельним раком шлунка в залежності від мікросателітної нестабільності. Була обстежена сироватка крові 70 пацієнтів, які отримували комплексне лікування з приводу раку шлунка. Діагноз у всіх хворих верифіковано гістологічно; розповсюдженість процесу виявлялась після проведення комп'ютерної томографії з внутрішньовенним контрастуванням. Виділення кріоглобулінів із сироватки крові проводили за методом А.Е. Каловідоріс з модифікаціями. У хворих на неоперабельний місцевопоширений рак шлунка, за умов наявності нестабільності мікросателітів за локусами VAT-25 та/або VAT-26, більш ефективним було застосування фторурацилу у пацієнтів з рівнем кріопреципітату  $298,6 \pm 2,5$  мг/л, тоді як показник вищий за  $477,3$  мг/л свідчив про низький рівень ефективності.*

**Ключові слова:** кріоглобуліни, сироватка крові, хворі, рак шлунка.

### Introduction

The study of the mechanisms of pathophysiological patterns of microsatellite illness in patients with inoperable stomach cancer will improve early diagnosis and improve the ways of correction of the revealed violations. It is known that in the structure of oncopathology in Ukraine, stomach cancer is of prime importance [4]. After all, among the first identified patients with gastric cancer, almost 90% of cases are inoperable.

Currently, the task of pathogenetic diagnosis and correction of detected forms of inoperable cancer requires the fastest solution. The long pathological process depletes the immune system of a person, therefore the determination in blood serum of abnormal immunological parameters of disrupted properties of the immune system in the human body indicates the depth and intensity of oncopathology [3, 5]. One of the factors of pathogenesis and laboratory index of immunopathological inflammatory process in cancer patients is the so-called cryoglobulins, which are a heterogeneous group of immunoglobulins characterized by the ability to anomalous deposition or formation of a gel at temperatures below  $37^{\circ}\text{C}$  (cryoprecipitation) [2,3,4]. Precipitate of cryoglobulins (if their concentration is high) leads to blockage of blood vessels, which also contributes to increased blood viscosity. The deposition of immune complexes in the vessel wall, fol-

lowed by the activation of the complement, causes excessive inflammation and, as a consequence, the recurrence of the disease.

The aim of the research was to identify the pathophysiological patterns of the formation of cryoprecipitate in patients with inoperable gastric cancer, depending on the microsatellite instability (MSI).

This work is a part of the research project "Pathochemical mechanisms of action of radioiodine on the organism and principles of their early diagnosis and correction" of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, state registration number 0117U000589.

### Materials and methods

We examined 70 patients with inoperable stomach cancer to determine the level of cryoglobulins and microsatellite instability. Palliative treatment of unresectable localized gastric cancer was performed with the preparation of 5-fluorouracil in all groups.

Patients were divided into two groups depending on the level of cryoglobulins: Ia group – the level of cryoglobulins was  $(298.6 \pm 2.5$  mg/l) – 36 (52%), IIa group – 34 patients – the level of cryoglobulins was  $(477.3 \pm 4.8$  mg/l). Patients in each group were divided into four subgroups depending on the presence of instability of microsatellites in the loci of the VAT-25, VAT-26. Subse-

\* To cite this English version: Movchan O.V., Titkova A.V. Pathophysiological features of creation of cryoprecipitate in patients with inoperable cancer in disturbances from microsatellite instability // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 18–21.

quently, in each subgroup, clinical efficacy was analyzed, followed by a comparison of the latter (Table 1). Patients of the first group used as chemomodification platinum derivative preparations, and of the second group – medications of fluoropyrimidine series. The clinical efficacy of these treatment regimens has been studied, depending on the biological properties of tumor tissue and the formation of cryoprecipitate in the previous stages.

Diagnosis in all patients was verified histologically. The prevalence of the process was manifested after computer tomography with intravenous contrast.

Cryoglobulins, i.e., serum immunoglobulins, are reciprocally precipitated at temperatures below 37°C.

Isolation of cryoglobulins from blood serum was carried out using A.E. Kalovidoris method with modifications. The concentration of cryoglobulins was evaluated spectrophotometrically on a spectrophotometer SF-46 in dynamics on the 1st, 2nd, 3rd, 7th day. The control values of serum cryoglobulins were investigated in 25 healthy patients and ranged from 60 to 80 µg / L, which corresponded to the norm obtained in the works by Ferri C., Zignego A.I. and coauthors (2002).

Table 1  
The distribution of patients depending on the stability of microsatellites VAT-25, VAT-26 and the level of cryoglobulins

Group of patients (drug)	Microsatellite instability, n / Clinical effect, n, (P ± p, %)							
	VAT-25 - VAT-26 - n=35		VAT 25 - VAT 26 + n=10		VAT 25 + VAT 26 - n=20		VAT 25 + VAT 26 + n=5	
	$\chi^2=5.85^*$		$\chi^2=2.74$		$\chi^2=3.52$		$\chi^2=0.31$	
Number of patients, n	Regression or stabilization	Progression	Regression or stabilization	Progression	Regression or stabilization	Progression	Regression or stabilization	Progression
1st n=36	22 (62.86%)	5 (14.29%)	1 (10.00%)	2 (20.00%)	1 (5.00%)	3 (15.00%)	1 (20.00%)	0
2nd n=34	3 (8.57%)	5 (14.29%)	6 (60.00%)	1 (10.00%)	12 (60.00%)	4 (20.00%)	3 (60.00%)	1 (20.00%)

In order to evaluate the effectiveness of treatment depending on the biological properties of the tumor, the presence of microsatellite instability was determined on the locus of VAT-25 and VAT-26.

The studies were carried out on dewaxed sections with a thickness of 4-5 microns, with the previous antidamask decontamination in citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven with a power of 600 W for 10 minutes. An EnVision system (Dako Cytomation, Denmark) was used to visualize the reaction products.

Microsatellite instability was evaluated using a polymerase chain reaction using two quasimorphic monocellular markers, VAT-25 and VAT-26.

In order to obtain a sufficient molecular weight and purity of DNA from the tumor material, the tumor tissue was shredded with eye scissors and then homogenized. Proteinase K was added to homogenizate, in a concentration of 50 µg / ml and SDS to 0.5% with glass rubbing. Homogenizate was incubated at 37 ° C for 12 hours. The volume of the sample was adjusted to 5 ml of a 10 mM Tris-EDTA solution at pH 8.0 and sequential DNA extraction with equal volumes of phenol, a mixture of phenol and chloroform, and finally chloroform. To the sample was added 1/10 of 5M sodium acetate pH 5.3, mixed, and the DNA was precipitated in 2.5 volumes of cold 96% ethanol, keeping the specimen at -70 ° C for 30 minutes. The sample was centrifuged for 15 minutes. The DNA precipitate was dried and then dissolved in 200 µl of 10 mM Tris-EDTA pH 8.0. The quality of the isolated DNA was checked by electrophoresis in a 1.5% agar gel with rendering of ethidium bromide. The isolated DNA was stored at -20 ° C.

Polymerase chain reaction was carried out according to the standard scheme on the thermocycler program Tercyk-2 of DNA production.

The following primers for the microsatellite sequence were used VAT-26: 5'-TGACTACTT' TGGACTTCAGCC-3'; 5'-AACCATTC AACATTTTAAACCC-3', and 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' and 5'-TCTGCATTTAACTATGGCTC-3' for VAT-25:

To the reaction mixture containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 5 pM primers, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µMM dNTP, 10% DMSO, 5 mM mercaptoethanol and 2 units of the thermophilic DNA polymerase.

Then a drop of petroleum jelly was added, the mixture was warmed at 95°C for 10 minutes, and 33 cycles with parameters were performed. Denaturation: 95°C – 30 seconds. Annealing and elongation: 55°C – 30 seconds. The final incubation was carried out at 72°C for 10 minutes.

The PCR result was evaluated in 8% polyacrylamide gel, followed by coloring in a solution of ethidium bromide at a concentration of 1 mg/ml. As a marker of molecular weight, DNA plasmids puc19, hydrolyzed with the enzyme HpaII, were used.

Statistical hypotheses about the presence or absence of significant differences in the results of drug treatment for different variants of the biological status of patients were verified using a four-cell – criterion [11]. For each of the four variants of biological characteristics, a conjugation table was formed.

Criteria for the hypothesis:

$H_0$  – there are no statistically significant differences in the effectiveness of drugs  $L_1$  and  $L_2$ ,

$H_1$  – there are statistically significant differences in the effectiveness of drugs  $L_1$  and  $L_2$ .

Examination of hypotheses is carried out by comparing the value of the criterion calculated by the formula:

$$\chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)},$$

$$n = a + b + c + d,$$

with a critical value  $\hat{\chi}^2 = 3,841$ , determined by the table for a given number of degrees of freedom and equal significance  $p < 0.05$ . If at that  $\chi^2 > \hat{\chi}^2$ , then the hypothesis  $H_0$  about the independence of treatment outcome from therapy with a 95% reliability is rejected. Otherwise, this hypothesis is accepted.

**Results and discussion**

The revealed pathophysiological patterns of the formation of cryoprecipitate in patients with inoperable stomach cancer, influenced the effectiveness of therapy. Among the patients of the 1st group with the level of cryoglobulins ( $298.6 \pm 2.5$  mg/l) and the lack of instability in both locus, regression and tumor stabilization were observed in 24 patients. Of these, 21 (62.86%) had the level of cryoglobulin  $298.6 \pm 2.5$  mg/l, which corresponded to the 1st group, and 3 (8.57%) – belonged to the 2nd

group. The tumor progression in the absence of ICU for VAT-25 and VAT-26 was noted in 10 cases. Of these, 5 patients (14.29%) were in the 1st group, and the same number of patients in the 2nd group.

When comparing the two samples with the four-cell criterion  $\chi^2$ , it was found that for the indicated biological properties of the tumor, namely, in the absence of instability in both of the studied locus, the efficacy of the chemotherapy in group I ( $p < 0.05$ ) was significantly higher than the similar indices in the 2nd group (Fig. 1).

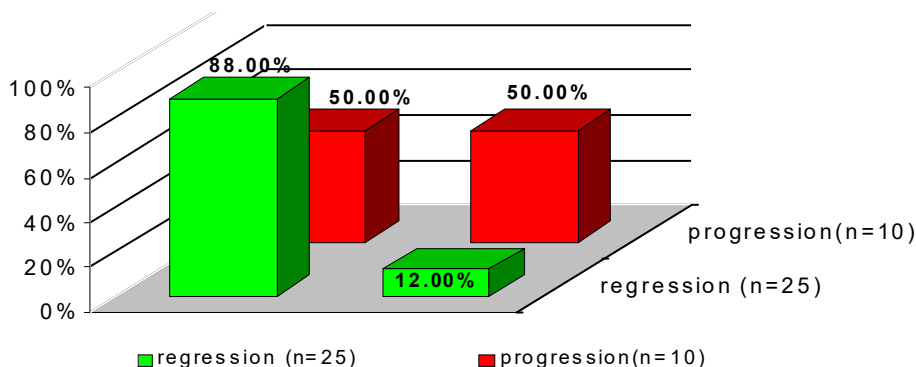


Fig. 1. Clinical efficacy of 5-fluorouracil in the absence of MSI for VAT-25 and VAT-26, depending on the level of cryoglobulins.

Thus, in patients of the 1st group, the proportion of cases of regression and tumor stabilization from their total reached 88.00% and exceeded the proportion of cases of tumor progression, which, from their total, equaled 50.00%. At the same time, in patients of the 2nd group, the ratio of regression and tumor stabilization (12.0%) and its progression (50.00%) was in favor of the latter. That is, in the absence of instability in both locus, at levels of cryoglobulins  $298.6 \pm 2.5$  mg/l, the cases of regression and tumor stabilization were more likely to prevail, and with a cryoprecipitate value higher than  $477.3$  mg/l – progression.

Comparison of two samples according to the four-cell criterion showed that with the use of fluorouracil it was 85.71%. Tumor progression in the II group of patients was recorded in 66.67% of the number of cases with no effect of treatment on the above biological features of the tumor. The same indicator was observed in patients of group I, receiving fluorouracil in 33.33%. Within the same group, these indicators were observed with an indistinguishable frequency. It is worth noting that in patients with unresectable venereal gastric cancer in the presence of MSI for VAT-25 and its absence for VAT-26, clinical efficacy was generally observed with the use of fluorouracil in patients of the 1st group.

Among 10 patients with the lack of MSI for VAT-25 and its availability for VAT-26, reduction and stable tumor size were observed in 7 cases. Tumor progression was noted in 3 patients. Among all patients of the 1st group in  $10.00 \pm 9.49\%$  of cases, tumor regression or stabilization of its size was noted. The lack of clinical effect, in the 2nd group of patients receiving fluorouracil, which was manifested by tumor progression, reached 20.00%.

The next biological variant of the tumors was characterized by the presence of MSI for VAT-25 in the absence of VAT-26, and was noted in 20 patients. For this option, regression or tumor stabilization was observed in 13 cases. The lack of a clinical effect from treatment was in 7 patients (Fig. 2).

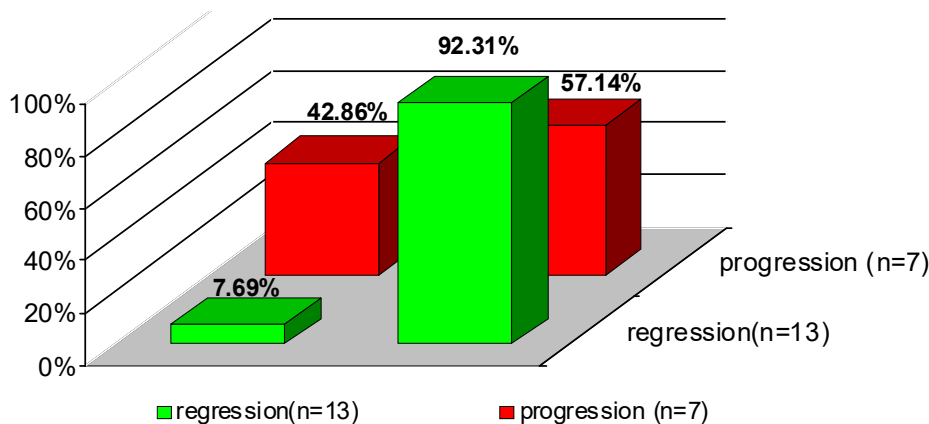


Fig. 2. Clinical efficacy of chemotherapy in the presence of MSI for VAT-25 and absence for VAT-26

Among the total number of patients in the 2nd group with the specified biological features of the tumor, the clinical effect of the use of the drug, that is, the regres-

sion of the tumor or stabilization of its size was observed in 5.00%, did not provide a clinically significant effect in 15.00% of patients.

Regression of the tumor, or a decrease in its size for the use of fluorouracil, was noted in 12 patients in the I group, in 60.00% of cases. The absence of the same clinical effect was observed in 4 patients, in 20.00% of cases.

Comparison of the samples of the two groups according to the four-cell criterion  $\chi^2$  resulted in the absence of a probable difference between them.

Despite the lack of statistical changes, the results suggest that when using fluorouracil as a modifier in group II where the cryoprecipitate is more than 477.3 mg/L, the relative number of cases of regression or stabilization of tumor size was only 7.69% of their total number for the specified biological features of the tumor. At the same time, the relative indicator of tumor growth progression in the II group of patients was 42.86%. Unlike patients in the 2nd group, the use of fluorouracil has allowed clinical effect to be achieved in 12 patients, in

92.31% of cases, while its absence was observed in 57.14% of patients.

That is, in patients with unresectable locally-distributed stomach cancer in the presence of MSI for VAT-25 and its absence in VAT-26, clinical efficacy was generally observed in the use of fluorouracil in patients of group I, where the cryoglobulin value did not exceed 298.6 mg/l.

It was impossible to calculate the efficacy of fluorouracil in the patients with the presence of MSI in both VAT-25 and VAT-26 due to the small absolute number of patients in the subgroup (n=5).

Microsatellite instability for VAT-25 and/or VAT-26 was observed in 35 patients of both groups under study. Of these, partial regression of the tumor or stabilization of its size was noted in 24 patients. The absence of a clinical effect from the treatment that had a manifestation in the form of tumor progression was recorded in 11 cases (Fig. 3).

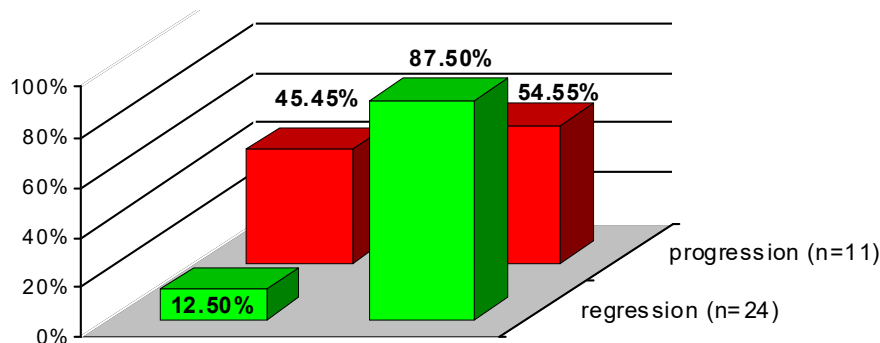


Fig. 3. Clinical efficacy of chemotherapy in the presence of MSI for VAT-25 and/or VAT-26

The distribution of these patients in groups depending on the level of cryoprecipitate showed that among patients in the 2nd group tumor regression or stabilization of its size was achieved in 3 patients, in 8.57% of cases. Tumor progression in patients with the same group was observed in 14.29%.

When using the fluorouracil preparation in patients of the 1st group, regression or stabilization of tumor size was determined in 21 patients, in 60.00% of cases. The absence of a clinical effect from treatment in patients with the same group was observed in 6 cases, in 17.14% of patients.

Comparison of clinical efficacy parameters in the presence of instability of microsatellites in VAT-25 and/or VAT-25 locus by the  $\chi^2$  criterion showed that among patients in the 2nd group, the correlation between the specific gravity of cases of regression or stabilization and tumor progression was in favor of the latter. So regression or stabilization of the size of the tumor was observed in 12.50% of their number, and progression – in 45.45% of cases.

At the same time, among the patients in group I receiving fluorouracil, the ratio of different clinical effects was the opposite. Regression and stabilization of tumor size were observed in 87.50% of all cases of tumor regression under the specified biological features of the tumor. The presence of tumor progression in this group was established in 54.55% of cases of the total number of cases of progression.

Consequently, the combination of all patients with the presence of MSI by the locus of VAT-25 and/or VAT-26 allowed to statistically confirm ( $p < 0.05$ ) the earlier ten-

dencies towards greater clinical efficacy in these patients with fluorouracil. However, it was possible to establish that the level of cryoglobulins significantly ( $p < 0.05$ ) affects the effectiveness of therapy.

**Conclusions.** It should be noted that in patients with inoperable locally advanced stomach cancer, in the presence of instability of microsatellites by VAT-25 and/or VAT-26 locus, it was more effective to use fluorouracil in patients with cryoprecipitate  $298.6 \pm 2.5$  mg/l, while the figure above 477.3 mg/L indicated a low level of efficiency.

### References

1. Berdov B.A. Kombinirovannoye lecheniye raka zheludka s predoperatsionnym i inpraoperatsionnym oblucheniym // B.A. Berdov., V.YU. Skoropad., K.V. Pakhomenko [i dr.] // Prakt. onkologiya. – 2001. – № 33. – S. 35-44.
2. Davydov M.I. Sovremennaya strategiya khirurgicheskogo lecheniya raka zheludka / M.I. Davydov, M.D. Ter-Ovanesov // Sovremen. Onkol. – 2010. – 3 1. – S. 4-10.
3. Dukhanina Ye.A. Sravnitel'nyy analiz vydeleniye metastaticheskogo markera S100A4 immunnymi i opukholevymi kletkami / Ye.A. Dukhanina, T.I. Luk'yanova, Ye.A. Romanova [i dr.] // Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.- 2008. – T.145, №1. – S.85-87.
4. Martling A.L. Stockholm colorectal cancer study group. The Stockholm II trial. Preoperative radiotherapy in rectal carcinoma. Long-term follow-up of a population based study / A.L. Martling, T. Holm, H. Johansson et al. // Cancer. – 2001. – Vol. 92. – P. 896-902.
5. Yurchenko A.A. Klinicheskoye znacheniye nekotorykh tkanevykh markerov metastazirovaniya pri rake zheludka: Avtoreferat dissertatsii na soiskaniye uchenoy stepeni k.m.n. – M. – 2007.

Матеріал надійшов до редакції 03.11.2017

© Риженко Ю.В.

УДК 618.177 – 06:618.11/.12-002]-089.8-072.1-036.82

## РЕЗУЛЬТАТИ КЛІНІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКУВАННЯ ТА РЕАБІЛІТАЦІЇ ХВОРИХ З БЕЗПЛІДДЯМ, ЗУМОВЛЕНИМ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ДОДАТКІВ МАТКИ\*

Риженко Ю.В.

Харківська медична академія післядипломної освіти, Харків, Україна

*Целью клинического исследования была разработка комплекса лечения и реабилитации генеративной функции у женщин с трубно – перитонеальным бесплодием с применением радиоволновой энергии при лапароскопическом лечении, интраоперационной профилактики спайкообразования с применением противоспаечного геля производного карбометилцелюлозы и комплекса физиотерапии в послеоперационный период. Материалы и методы: проведено клиническое исследование на 96 женщинах с трубно-перитонеальным бесплодием воспалительного генеза, которым проведено лапароскопическое лечение и реабилитация в послеоперационном периоде. Результаты предложенного нами комплексного лечения и реабилитации позволили снизить среднюю кровопотерю во время операции, продолжительность послеоперационного койко-дня, необходимость в назначении обезболивающих и антибактериальных препаратов. Предложенная методика позволила повысить процент восстановления проходности маточных труб, наступления маточной беременности, снизить риск наступления внематочной беременности и реоклюзии маточных труб.*

**Ключевые слова:** трубно-перитонеальное бесплодие воспалительного генеза, спаечный процесс, радиоволновая энергия, противоспаечный барьер, реабилитация в послеоперационный период.

### Вступ

Важливою і соціально значимою проблемою в Україні є проблема безпліддя в шлюбі, від якого страждають більше 1 мільйона подружніх пар що впливає на рівень народжуваності та природний приріст населення. В структурі жіночого безпліддя основна роль належить трубно-перитонеальному безпліддю та коливається в межах 30 – 75% [7]. При первинному безплідді частота ураження маткових труб складає 29,5-70%, при вторинному безплідді - 42-83% [1]. Основною причиною вважаються перенесені запальні захворювання органів малого тазу, зумовлені різноманітними інфекціями, які призводять до повної або часткової непрохідності труб внаслідок незворотного пошкодження циліндричного епітелію маткових труб, облітерації стінок, інфільтрації, перегинів, обумовлених перитубарними та яєчниковими зрощеннями [4, 13]. Після одноразового епізоду сальпінгіту непрохідність маткових труб виникає в 11 - 13%, після дворазового - у 23 - 36%, при трьох і більше загостреннях - у 54 - 75% випадків [9]. У 27% хворих з трубно – перитонеальним безпліддям при лапароскопії виявляється спайковий процес II - III ступеня поширеності [2]. У 43% жінок, які перенесли запальні захворювання додатків матки відмічається повна непрохідність маткових труб, а в 49% випадків – часткова [10]. Зрощення, які виникають вже після первинного запального ураження маткових труб, порушують механізми захвату та транспорту яйцеклітини.

Приймаючи до уваги статистичні дані ефективності хірургічного лікування трубно – перитонеального безпліддя [11,12] з використанням препаратів для профілактики спайкової хвороби [6] необхідне подальше дослідження та відбірковий підхід до застосування найбільш ефективних препаратів з антиадгезивними властивостями для покращення результатів профілактики спайкоутворення і реабілітації репродуктивної функції жінок.

Мета дослідження. Розробка комплексу лікування та реабілітації генеративної функції у жінок з трубно – перитонеальним безпліддям запального генезу із застосуванням радіохвильової енергії при лапароскопічному лікуванні, інтраопераційної профілактики протиспайковим гелем, похідним карбометилцелюлози та комплексу фізіотерапії у післяопераційний період.

### Матеріали і методи дослідження

Клінічним матеріалом для проведення дослідження були дані обстеження, лікування та дані катамнезу 96 хворих з трубно – перитонеальним безпліддям, зумовленим запальними захворюваннями додатків матки та 30 гінекологічно і соматично здорових невагітних жінок репродуктивного віку, взятих для контролю. Всі пацієнтки, які приймали участь в дослідженні, проходили лікування на клінічній базі кафедри акушерства та гінекології №2 Харківської медичної академії післядипломної освіти в КЗОЗ «Харківському міському клінічному пологовому будинку №2 ім. М.Х. Гельферіха». У всіх жінок була отримана інформована згода на участь в дослідженні.

Для вирішення поставленої мети і завдань нами було обстежено 126 пацієнток. Всі 96 пацієнток з трубно – перитонеальним безпліддям запального генезу до оперативного лікування пройшли стандартне обстеження в амбулаторних умовах згідно до Наказу МОЗ України №417 від 15.07.2011р. (клінічні, біохімічні аналізи, коагулограма, група крові, РВ, ВІЛ (за зго-

\* Цитування при атестації кадрів: Риженко Ю.В. Результати клінічного дослідження лікування та реабілітації хворих з безпліддям, зумовленим запальними захворюваннями додатків матки // Проблеми екології і медицини. – 2017. – Т. 21, № 3-4. – С. 22–25.

дою), аналіз виділень із піхви, ІПСШ, кольпоскопія, ЕКГ, УЗД, доплер, МСГ, дослідження гормонального фону, дослідження сироватки крові на ІL-1, ІL-6, ТФР – β, фібрoneктин, консультація терапевта і ін.) [8]. З групи жінок з клінічного дослідження були виключені пацієнтки з іншими формами безпліддя, загостренням запального процесу, з тяжкою екстрагенітальною патологією, а також було виключено чоловічий фактор безпліддя. Жінки були розділені на три групи: контрольна група - 30 гінекологічно і соматично здорових невагітних жінок репродуктивного віку;

1-а клінічна група – 48 пацієнток з трубно – перитонеальним безпліддям запального ґенезу, яким проводилась загальноприйнята методика лікування і реабілітації, яка включала: лапароскопію із застосуванням діатермічної енергії, з промиванням черевної порожнини підігрітим до 37°C 0,9% розчином хлориду натрію в об'ємі 200 - 300 мл, розчином дексаметазону 4мг, створення штучного асцити розчином хлориду натрію 0,9% в об'ємі 200-300 мл; активний режим поведінки з першої доби післяопераційного періоду.

2- га клінічна група – 48 пацієнток з трубно-перитонеальним безпліддям запального ґенезу, яким проводилась розроблена нами програма лікування і реабілітації і включала в себе: лапароскопію із застосуванням радіохвильової енергії, інтраопераційного введення протиспайкового бар'єру похідного карбо-метилцелюлози, та розробленою програмою реабілітації. Надалі з другої доби жінкам 2-ої клінічної групи призначали протягом 9 днів ректально супозиторії - комбінація стрептокінази й стрептодорнази за схемою: 1– 3 доба - по 1 свічці 3 рази на добу, 4–6 доба – по 1 свічці 2 рази на добу, 7 – 9 доба - по 1 свічці 1 раз на добу, крім того проводився комплекс запропонованого нами фізіотерапевтичного лікування: ультразвук в імпульсному режимі на низ живота потужністю 0,5 Вт/см<sup>2</sup> тривалістю 10 хвилин, з наступним внутрішньоматковим електрофорезом ферменту гіалуронідази № 10 по дерматопарамібній методиці силою струму 10–15 мА протягом 20 хвилин, через день, починаючи з другої доби післяопераційного періоду. Процедури доповнювалися сеансами стимуляції маткових труб за методикою В. М. Стругацького (2005) протягом 20 днів по 5 хвилин з використанням апарата «Ендотон-01Б» (Болгарія) по піхво-крижовій методиці починаючи з шостої доби післяопераційного періоду.

### Результати та їх обговорення

Середній вік жінок 1-ої клінічної групи був 32,5±3,9 роки, 2-ої клінічної групи - 32±4,8 роки, у контрольній групі - 30,4±6,3 роки. Всі жінки клінічних груп звернулися зі скаргами на безпліддя. Первинним безпліддям до 5 років страждали 7 (14,6 %) жінок, первинним безпліддям більше 5 років страждали 9 (18,7%), вто-

ринним безпліддям до 5 років – 12 (25,0 %), вторинним безпліддям більше 5 років страждали 20 (41,7 %) пацієнток. Тобто, показник як первинного безпліддя тривалістю більше 5 років, так і вторинного безпліддя тривалістю більше 5 років визначено у 1,5 рази вище, ніж первинного безпліддя і вторинного тривалістю до 5 років. Всі жінки з трубно – перитонеальним безпліддям мали в анамнезі запальні захворювання додатків матки – 96 (100 %), із них тривалістю до 5 років - 24 (25 %), а тривалістю більше 5 років - 72 (75 %).

При клініко-лабораторному обстеженні 96 жінок з трубно – перитонеальним безпліддям запального ґенезу змін не було виявлено. Під час ультразвукового дослідження та при визначенні середніх розмірів матки та придатків вірогідних змін у жінок контрольної не виявлено. У жінок із трубно – перитонеальним безпліддям виявили ряд структурних змін у репродуктивних органах: у 18 (18,75 %) гідросальпінксі з товщиною маткової труби не більше 5 мм, наявність фолікулярних кіст яєчників у 2 (2,1%) жінок. У більшості жінок з трубно – перитонеальним безпліддям - 27 (28,1%) були виявлені ультразвукові ознаки спайкового процесу у вигляді гіперехогенних лінійних утворень та у 43 (44,8 %) жінок у вигляді обмеження при зміщенні яєчників [3]. При доплерометрії відмічено зниження кровопостачання стінок маткових труб, індекс резистентності у маткових артеріях при цьому перевищував 0,62±0,06 (при порівнянні в контрольній групі 0,46±0,02) при p<0,05.

З метою визначення стану порожнини матки й маткових труб усім 96 хворим з трубно – перитонеальним безпліддям виконана метросальпінгографія (МСГ) з використанням контрастних водорозчинних препаратів (тріомбрас – 76 %) на 7-11 день менструального циклу, а також проведення порівняння ефективності МСГ дослідження з хромосальпінгографією (ХСГ) на початку лапароскопічної операції. Непрохідність обох (або єдиної) маткових труб виявлена при МСГ у 77 і 79,2 % відповідно жінок 1-ої та 2-ої клінічних груп, а при ХСГ виявлена непрохідність у 62,5 % і 64,6 % відповідно. Також при лапароскопічному обстеженні у пацієнток 1-ої та 2- ої клінічних груп виявлені грубі перитубарні спайки, петелькоподібні перегиби маткових труб, підтягнутість кінцевих відділів маткових труб, часткове проникнення контрастної речовини в обмежені порожнини однієї (єдиної) з непрохідністю другої маткової труби, які їх деформували, і можливо, порушували їх транспортну функцію. Ці показники вказують на більшу діагностичну інформативність лапароскопії, ніж МСГ.

Показники, які ми використовували для оцінки наявності спайкового процесу у жінок контрольної групи, 1-ої та 2-ої клінічних груп до операції та надані в таблиці 1.

Таблиця 1  
Показники рівня фібрoneктину, ТФР-β, ІL-1, ІL-6 у жінок контрольної групи, 1 - ої та 2-ої клінічних груп до операції

Показник	Контрольна група (n=30)	а клінічна група (n=48)	
		до операції	2 - а клінічна група (n=48) до операції
фібрoneктин, мкг/мл	324±8,5	461,7±7,8 p<0,05	461,4±7,7 p<0,05
ТФР-β мкг/мл	10,79±1,56	23,5±2,42 p<0,05	26,98±2,2 p<0,05
ІL1b пг/мл	15,81±2,08	44,35±2,4 p<0,05	50,88±2,59 p<0,05
ІL6 пг/мл	17,62±1,5	60,99±3,29 p<0,05	65,42±3,43 p<0,05

Примітка: p - вірогідність розходжень показників у порівнянні з контрольною групою.

Як видно з даних таблиці 1 рівень показників фібрoneктину, ТФР - β, ІL-1, ІL-6 в сироватці крові у жінок

1-ої та 2-ої клінічних груп до операції у порівнянні з показниками жінок контрольної групи був підвищений

майже у 3 рази, що було статистично достовірно ( $p < 0,05$ ).

Під час лапароскопічного втручання оцінювався ступінь спайковий процес згідно із класифікацією Американського суспільства фертильності (1988) [2]. У пацієток 1-ої клінічної групи під час лапароскопії виявлено: I ступінь – 17 (35,4%), II ступінь – 10 (20,8%), III ступінь – 7 (14,6%), IV ступінь – 14 (29,2%).

У пацієток 2-ої клінічної групи при лапароскопії був виявлений спайковий процес: I ступеню – 9 (18,75%), II ступеню – 14 (29,1%), III ступеню – 8 (16,6%), IV ступеню – 17 (35,4%).

Всім 96 жінкам з трубно–перитонеальним безпліддям запального ґенезу проведено оперативне лікування, яке включало (табл. 2):

Таблиця 2  
Види оперативного втручання під час лапароскопії

Показник	1 - а клінічна група (n=48)	2 - а клінічна група (n=48)
Сальпінголізис	12 (25%)	6 (12,5%)
Сальпінголізис, оваріолізис	14 (29,2%)	15 (31,2%)
Сальпінголізис, фімбріопластика обох або єдиної маткової труби	3 (6,3%)	8 (16,7%)
Сальпінголізис, оваріолізис з проведенням сальпінгостомії обох або однієї маткової труби	19 (39,6%)	19 (39,6%)
Всього	48 (100%)	48 (100%)

В післяопераційному періоді нами порівнювалась тривалість антибактеріальної терапії, необхідність в знеболюючих препаратах, післяопераційній ліж-

ко/день та середню крововтрату при оперативному втручанні. Дані подані в таблиці 3.

Таблиця 3  
Порівняння тривалості антибактеріальної терапії, призначення знеболюючої терапії, післяопераційного ліжка/дня та середньої крововтрати у жінок 1-ої та 2-ої клінічних груп

Показник	1-а клінічна група, (n=48)	2-а клінічна група, (n=48)
Тривалість антибактеріальної терапії (доба)	4,94±1,04	4,08±1,3 $p < 0,05$
Тривалість призначення знеболюючих (доба)	2,56±0,74	1,25±0,48 $p < 0,05$
Тривалість післяопераційного, ліжка/день	4,94±1,04	3,88±1,09 $p < 0,05$
Середня крововтрата під час операції (мл)	42,29±26,36	31,88±17,09 $p < 0,05$

Примітка:  $p$  - вірогідність розходжень показників у жінок 2-ої клінічної у порівнянні з жінками 1-ої клінічної групи.

При застосуванні мінімальної потужності радіохвильової енергії, зменшення зони впливу ушкодження тканин - зберігається оптимальний коагуляційний ефект, що сприяє зниженню середньої крововтрати під час операції майже у 1,3 рази. У післяопераційному періоді середня тривалість антибактеріальної терапії у жінок 2-ої клінічної групи складала 4,08±1,3 доби, необхідність в призначенні знеболюючих препаратів складала 1,25±0,48 доби та тривалість післяопераційного ліжка дня складала 3,88±1,09 доби ( $p < 0,05$ )

у порівнянні з 1-ою клінічною групою у пацієток 2 - ої клінічної групи статистично достовірно знизилась тривалість антибактеріальної терапії, знизилась необхідність призначення знеболюючих препаратів та тривалість післяопераційного ліжка дня, що на нашу думку є проявами і перевагами застосування радіохвильової енергії під час оперативного втручання.

Показники рівня фібрoneктину, ТФР- $\beta$ , IL-1, IL-6 у жінок контрольної групи, 1-ої та 2-ої клінічних груп до та після операції, надані у таблиці 4.

Таблиця 4  
Показники рівня фібрoneктину, ТФР- $\beta$ , IL-1, IL-6 у жінок контрольної, 1-ої та 2-ої клінічних груп до і після операції на 7 добу

Показник	Контрольна група, (n=30)	1 – а клінічна група, (n=48)		2 - а клінічна група (n=48)	
		до операції	після операції	до операції	після операції
фібрoneктин, мкг/мл	324±8,5	461,7±7,8 $p < 0,05$	427,3±18,8 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$	461,4±7,7 $p < 0,05$	397,9±22,4 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$
ТФР- $\beta$ , мкг/мл	10,79±1,56	23,5±2,42 $p < 0,05$	19,04±1,92 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$	26,98±2,2 $p < 0,05$	17±1,56 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$
IL1 $\beta$ пг/мл	15,81±2,08	44,35±2,43 $p < 0,05$	27,14±3,96 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$	50,88±2,59 $p < 0,05$	21,38±3,91 $p > 0,05$ , $p_1 < 0,05$
IL6, пг/мл	17,62±1,5	60,99±3,29 $p < 0,05$	38,47±5,67 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$	65,42±3,43 $p < 0,05$	31,29±4,71 $p < 0,05$ , $p_1 < 0,05$

Як видно з даних таблиці 4, показники до оперативного лікування були підвищені ( $p < 0,05$ ) майже у 3 рази у жінок 1-ої та 2-ої клінічних груп у порівнянні з жінками контрольної групи. Після проведення оперативного лікування їх показники ТФР, IL-1, IL-6, фібрoneктину у порівнянні з передопераційними даними статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) знизився у 2 рази. Але все одно всі показники були декілька підвищеними (статистично достовірно) у порівнянні з їх показниками жінок контрольної групи, тобто здорових жінок. При

порівнянні у жінок 1-ої та 2-ої клінічних груп виявлено більш значне зниження даних показників у жінок 2-ої клінічної групи.

Катамнез 31 пацієтки 1-ої клінічної групи та 38 пацієток 2 - ої клінічних груп вивчався через 1 рік після закінчення реабілітаційної терапії. Критерієм ефективності лікування хворих з безпліддям були показники ультразвукового дослідження, доплерографії, метросальпінгографії, а також настання вагітності.



### Результати та їх обговорення

При порівнянні даних результатів метросальпінгографії через 3 місяці після операції та з даними хромосальпінгографії наприкінці операції виявлено: прохідність маткових труб, відновлена під час операції майже у всіх жінок 25 – 96,1 % 2 - ої клінічної групи залишилась прохідною, окрім 1 жінки, в той же час у жінок 1 - ої клінічної групи прохідність залишилась тільки у 12 (38,7 %) жінок.

Показники настання маткової й трубної вагітності у пацієнток 2 - ої клінічної групи порівнювали з показниками фертильності 30 практично здорових жінок контрольної та 1-ої клінічної групи: вагітність настала у 18 (47,4 %) пацієнток II клінічної групи, у т. ч. маткова у 15 жінок (39,5 %), а трубна у 3 (7,9 %) пацієнток із 38 жінок, взятих нами для подальшого лікування. За даними літератури частота настання вагітності після реконструктивно – пластичних операцій, виконаних навіть лапароскопічним доступом, не перевищує 21-28%. При порівнянні показників у жінок 1 - ої клінічної групи та 2 - ої клінічної групи – настання вагітності у пацієнток 2-ої клінічної групи було в 1,6 разів вище, ніж у пацієнток 1 - ої клінічної групи, а також у жінок 1-ої клінічної групи зниження настання позаматкової вагітності в 1,6 разів, а також залишилися відновними маткові труби в 2,5 рази вище у пацієнток 2-ої клінічної групи, ніж у жінок 1-ої клінічної групи, що підтверджено даними метросальпінгографії через 3 місяці після операції.

### Висновки

Застосування запропонованого методу оперативного лікування з використанням радіохвильової енергії, інтраопераційної профілактики спайкоутворення з використанням протиспайкового гелю похідного карбометилцелюлози та комплексу ранньої поетапної реабілітації привело до зниження маркерів спайкового процесу (фібронектину, IL-1b, IL-6, ТФР-β) у майже 2 рази, зниження післяопераційного ліжко/дня у 1,3 рази, зниження необхідності тривалості знеболюючих та антибактеріальних препаратів у ранньому післяопераційному періоді майже у 1,5 рази, підвищило відсоток відновлення прохідності маткових труб, знизило ризик настання позаматкової вагітності у 1,6 рази та підвищило відсоток настання маткової вагітності у 1,6 рази у порівнянні із застосуванням загальноприйнятих методів лапароскопічного лікування та профілактики спайкового процесу не дивлячись на те, що жінки 2-ої клінічної групи мали спайковий процес III – IV ступеню

та клінічні прояви спайкового процесу були більш виражені.

### Література

1. Адамян А. В. Спаечный процесс в брюшной полости: история изучения, классификация, патогенез: (обзор литературы) / А. В. Адамян А. В. Козаченко, Л. М. Кондратович // Проблемы репродукции. – 2013. – № 6. – С. 7-13.
2. Гаспаров А. С. Тазовые перитонеальные спайки: этиология, патогенез, диагностика, профилактика / А. С. Гаспаров, Е. Д. Дубинская. – Москва: МИА, 2013. – 168 с.
3. Диагностические возможности эхографического исследования в определении распространенности спаечного процесса в малом тазу / Е. Д. Дубинская, А. С. Гаспаров, А. Н. Хачатрян и др. // Врач. – 2012. – № 1. – С. 84-87.
4. Дубоссарская З. М. Роль про- и противовоспалительных цитокинов в возникновении синдрома хронической тазовой боли у пациенток с воспалительными процессами органов малого таза / З. М. Дубоссарская, Л. П. Грек // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2016. – № 3. – С. 322-330.
5. Использование противовоспалительных средств при трубно-перитонеальном факторе бесплодия / Т. Н. Мананникова, А. А. Попов, Н. А. Колесник и др. // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – № 4. – С. 66-70.
6. Нікітін О. Д. Діагностика безпліддя в сучасних умовах: (трубно-перитонеальний фактор) / О. Д. Нікітін, Л. А. Жабіцька // Здоровье женщины. – 2011. – № 3. – С. 234-237.
7. Про організацію амбулаторної акушерсько-гінекологічної допомоги в Україні: Наказ МОЗ України № 417 від 15.07.2011 р.
8. Юзько А. М. Женское бесплодие трубного происхождения: (обзор литературы) / А. М. Юзько // Здоровье женщины. – 2017. – № 2. – С. 126-131.
9. International federation of Fertility Society. Global Standarts of infertility Care. Standart 9. Tubal Surgery. Recommendations for Practice [електронний ресурс]. – 2016. – Режим доступу:iffrs-reproduction.org/resource/resmgr/Police\_Statements/Standart\_9\_Tubal\_surgeryJuly\_.pdf (last access:05.12.16).
10. Koninckx Ph. R. Role of the peritoneal cavity in the prevention of postoperative adhesions, pain and fatigue / Ph. R. Koninckx // Fertility and Sterility. – 2016. – Vol. 106, N 5. – P. 998-1010.
11. Predicting formation of adhesions after gynaecological surgery: development of a risk score / Per Lundorff, Hans Brölmann, Philippe Robert Koninckx et al. // Arch Gynecol Obstet. – 2015. – Vol. 292 (4). – P. 931–938.
12. The prevalence of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium tubal infections and their effects on the expression of IL-6 and leukaemia inhibitory factor in Fallopian tubes with and without an ectopic pregnancy / B. Refaat, A. M. Ashshi, S. A. Batwa et al. // Innate Immunity. – 2016. – Vol. 22 (7). – P. 534-545.

## ENGLISH VERSION: CLINICAL FINDINGS ON TREATMENT AND REHABILITATION OF PATIENTS WITH INFERTILITY CAUSED BY INFLAMMATORY DISEASES OF THE UTERINE APPENDAGES\*

Ryzhenko Yu.V.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

*The aim of the clinical study was to develop a complex of treatment and rehabilitation of the reproductive function in women with tubal-peritoneal infertility using radiowaves energy during laparoscopic treatment, intraoperative prevention of adhesion with the use of an antiadhesion gel of derivative carbomethylcellulose and a complex of physiotherapy in the postoperative period. Materials and methods: the clinical study was performed in 96 women with tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis, which included laparoscopic treatment and rehabilitation in the postoperative period. The results of our proposed clinical study allowed us to reduce the average blood loss during the operation, the duration of the postoperative bed day, the need for the prescription of analgesic and antibacterial drugs. The proposed method of treatment and rehabilitation of women with tubal-peritoneal infertility allowed us to increase the percentage of restoration of uterine tubes patency, the onset of uterine pregnancy, to reduce the risk of an ectopic pregnancy and reocclusion of the fallopian tubes.*

**Key words:** tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis, adhesive process, radio-wave energy, antiadhesion barrier, rehabilitation in the postoperative period.

### Introduction

An important and socially significant problem in Ukraine is the problem of infertility in marriage, which afflicts more than 1 million couples, which affects the birth rate and natural population growth. In the structure of female infertility, the main role belongs to the tubal-peritoneal infertility (TPI) which fluctuates within 30-75% [7]. In primary infertility, the incidence of fallopian tubes lesion is 29.5-70%, in secondary infertility – 42-83% [1]. The main cause of the tubal-peritoneal infertility is the transient inflammatory diseases of the pelvic organs due to various infections that lead to complete or partial obstruction of tubes due to irreversible damage to the cylindrical epithelium of the fallopian tubes, obliteration of the walls, infiltration, inflammation caused by peritubal and ovary fusion [4, 13]. After a single episode of salpingitis, uterine tube obstruction occurs in 11-13%, after a double – in 23-36%, with three or more exacerbations – in 54-75% of cases [9]. In 27% of patients with TPI in laparoscopy revealed adhesive process II-III degree of prevalence [2]. In 43% of women who have suffered from inflammatory diseases of the uterine appendages, complete obstruction of the fallopian tubes is observed, and in 49% of cases it is partial [10]. The irregularities that occur after the primary inflammatory lesion of the fallopian tubes disrupt the mechanisms of the ovum pick-up and transport.

### Substantiation for the study

Taking into account the statistical data on the efficacy of tubal-peritoneal infertility surgical treatment [11, 12] with the use of drugs for prevention of adhesive disease [6] further research and a selective approach to the use of the most effective drugs with anti-adhesive properties are needed to improve the results of prevention of adhesion and rehabilitation of reproductive function of women. The aim of the research is development of comprehensive treatment and rehabilitation of reproductive function in women with tubal-peritoneal infertility, using radio-waves energy in the laparoscopic treatment, intraoperative prophylaxis with antiadhesion gel, derivatives of car-

bomethylcellulose and a complex of physiotherapy in the postoperative period.

### Materials and methods

Clinical material for the study was data elicited during examination and treatment, data from catamnesis of 96 patients with tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis of the uterus and 30 gynecological and somatically healthy non-pregnant women of childbearing age taken for monitoring. All patients who took part in the study were treated at the clinical basis of the department of obstetrics and gynecology No.2 of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education in the hospital "M. H. Gelferikh City Clinical Maternity Hospital No.2 of Kharkiv". All women signed the informed consent to participate in the study.

To address our goals and objectives, we examined 126 patients. All 96 patients with of tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis before the operative treatment were standardized in outpatient settings in accordance with the Order of the Ministry of Public Health of Ukraine No. 417 as of July 15, 2011 (clinical, biochemical analyses, coagulogram, blood group, RW, VID (by consent), vaginal discharge analysis, sexually transmitted infections, colposcopy, ECG, ultrasound, doppler method, MSG, hormonal background study, blood serum test for IL-1, IL-6, TGF- $\beta$ , fibronectin, consultation of a therapist, etc.) [8]. From the group of women with tubal-peritoneal infertility we excluded patients with other forms of infertility, exacerbation of the inflammatory process, severe extragenital pathology, and also excluded the male factor infertility. Women were divided into three groups: comparison group – 30 gynecological and somatically healthy non-pregnant women of reproductive age;

1 – study group – 48 patients with tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis, who underwent usual methods of treatment and rehabilitation, which included: laparoscopy with the use of diathermic energy, with washing of the abdominal cavity heated to 37° C with 0.9% sodium chloride solution in volume 200-300 ml,

\* To cite this English version: Ryzhenko Yu.V. Clinical findings on treatment and rehabilitation of patients with infertility caused by inflammatory diseases of the uterine appendages. // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 26–29.

dexamethasone solution 4 mg, artificial ascites creation with sodium chloride solution 0.9% in volume 200-300 ml; active mode of behavior from the first day of the postoperative period.

2 – study group – 48 patients with tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis, who underwent our program of treatment and rehabilitation, which included: laparoscopy with the use of radiowaves energy, intraoperative introduction of the antiadhesion barrier derivative of carboxymethylcellulose, and developed program of rehabilitation. Later on, from the second day, women of the 2nd study group were prescribed rectal suppositories for 9 days – a combination of streptokinase and streptodornase according to the scheme: days 1-3 – 1 suppository 3 times a day, days 4-6 – 1 suppository 2 times a day, days 7-9 – 1 suppository 1 time a day. In addition, the complex of physiotherapy suggested by us was carried out: ultrasound in pulsed mode on the lower abdomen with a power of 0.5 W / cm<sup>2</sup> for 10 minutes duration followed by intrauterine electrophoresis of the hyaluronidase enzyme № 10 on dermatoparabic technique by force of current m 10-15 mA for 20 minutes, one day from the second day of the postoperative period. The procedures were supplemented by uterine tube stimulation sessions using V.M. Strugatsky's (2005) technique for 20 days for 5 minutes using the Endoton-01B apparatus (Bulgaria) in the vaginal and sacral technique from the sixth day of the postoperative period.

### Results and discussion

The average age of women in the 1st study group was 32.5 ± 3.9 years, in the second study group – 32 ± 4.8 years, in the comparison group – 30.4 ± 6.3 years. All women with tubal-peritoneal infertility complained of infertility. 7 (14.6%) women suffered from primary infertility, 9 (18.7%) with primary infertility for more than 5 years, 12 (25.0%) with secondary infertility for 5 years, 25 (5%) with secondary infertility, 20 (41.7%) patients for more than 5 years. That is, the indicator of primary infertility of more than 5 years of duration, and secondary infertility of more than 5 years, is determined to be by 1.5 times higher than that of primary infertility and secondary duration of up to 5 years. All women with of tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis had in history the inflammatory

diseases of the uterus – 96 (100%), of which up to 5 years – 24 (25%), and more than 5 years – 72 (75%).

In the clinical and laboratory examination of 96 women with TPI of inflammatory genesis, no changes were found. During ultrasound examination and in determining the average size of the uterus and appendages, no probable changes in comparison group were detected. In women with TPI, we revealed a number of structural changes in reproductive organs: in 18 (18.75%) hydrosalpinges with the thickness of the fallopian tube not more than 5 mm, the presence of follicular ovarian cysts in 2 (2.1%) women. In the majority of women with TPI – 27 (28.1%) – ultrasound signs of adhesive process in the form of hyperechoic linear formations and in 43 (44.8%) women in the form of restriction in case of ovarian displacement were revealed [3]. On dopplerometry, the decrease of blood supply to the walls of the fallopian tubes was observed, while the index of resistance in the uterine arteries exceeded 0.62 ± 0.06 (as contrasted with the comparison group 0.46 ± 0.02) at p < 0.05.

In order to determine the state of the cavity of the uterus and fallopian tubes, 96 patients with TPI underwent metrosalpingography (MSG) using contrasting water-soluble drugs (triombrast – 76%) on 7-11 days of the menstrual cycle, as well as the comparison of the effectiveness of MSG to chromosalpingography (CSG) at the beginning of the laparoscopic surgery. The obstruction of both (or single) fallopian tubes was detected on MSG in 77 and 79.2%, respectively, in women of the 1st and 2nd clinical groups, and obstruction of CSG 62.5% and 64.6% respectively. Also, during laparoscopic examination, patients from the 1st and 2nd clinical groups presented coarse peritubal adhesions, loop-shaped edema of the fallopian tubes, retraction of the terminal regions of the fallopian tubes, partial penetration of the contrast medium into the limited cavities of the one (single) with the obstruction of the second uterine tube, which they deformed, and possibly disrupted their transport function. These parameters indicate a greater diagnostic informativeness of laparoscopy than MSG.

Indicators that we used to assess the presence of the adhesive process in women in the comparison group, 1st and 2nd clinical groups prior to surgery are presented in Table 1.

Table 1  
Indicators of the level of fibronectin, TGF-β, IL-1, IL-6 in women of comparison group, 1st and 2nd clinical groups prior to surgery

Indicator	Comparison group (n=30)	1st clinical group (n=48)	2nd clinical group (n=48)
		before surgery	before surgery
fibronectin, mcg/ml	324±8.5	461.7±7.8 p<0.05	461.4±7.7 p<0.05
TGF-β mcg/ml	10.79±1.56	23.5±2.42 p<0.05	26.98±2.2 p<0.05
IL-1b pg/ml	15.81±2.08	44.35±2.4 p<0.05	50.88±2.59 p<0.05
IL-6 pg/ml	17.62±1.5	60.99±3.29 p<0.05	65.42±3.43 p<0.05

Note: p – probability of difference of indicators as contrasted with the comparison group.

As it can be seen from Table 1, the level of incidence of fibronectin, TGF – β, IL – 1, IL – 6 in the serum of women of the 1st and 2nd clinical groups before surgery as contrasted with the comparison group women was increased by almost 3 times, which was statistically significant (p < 0.05).

During the laparoscopic intervention, the degree of adhesive process according to the classification of the American Society for Fertility (1988) [2] was assessed.

Patients of the 1st clinical group during the laparoscopy revealed the following results: I. – 17 (35.4%), II. – 10 (20.8%), III. – 7 (14.6%), IV. – 14 (29.2%). In patients of the 2nd clinical group during laparoscopy, the following was revealed: I. – 9 (18.75%), II. – 14 (29.1%), III. – 8 (16.6%), IV. – 17 (35.4%).

All 96 women with tubal-peritoneal infertility of inflammatory genesis underwent operative treatment, which included (Table 2):

Table 2  
Types of surgical intervention during laparoscopy

	1 <sup>st</sup> clinical group (n=48)	2 <sup>nd</sup> clinical group (n=48)
Salpingolysis	12 (25%)	6 (12.5%)
Salpingolysis, ovariolysis	14 (29.2%)	15 (31.2%)
Salpingolysis, fimbrioplastic of either uterine tube	3 (6.3%)	8 (16.7%)
Salpingolysis, ovariolysis with salpingotomy of both or one uterine tube	19 (39.6%)	19 (39.6%)
Total	48 (100%)	48 (100%)

In the postoperative period, we compared the duration of antibiotic therapy, the need for pain relievers,

postoperative bed / day and average blood loss during surgical intervention. Data are presented in Table 3

Table 3  
Comparison of duration of antibiotic therapy, prescription of analgesic therapy, postoperative bed-days and average blood loss in women in the 1st and 2nd clinical groups

Indicator	1 <sup>st</sup> clinical group (n=48)	2 <sup>nd</sup> clinical group (n=48)
Duration of antibiotic therapy (days)	4.94±1.04	4.08±1.3 p<0.05
Duration of anesthetic prescription (days)	2.56±0.74	1.25±0.48 p<0.05
Duration of postoperative bed-days	4.94±1.04	3.88±1.09 p<0.05
Average blood loss during surgery (ml)	42.29±26.36	31.88±17.09 p<0.05

Note: p – the probability of differences in the rates of women in the 2nd clinical as compared with women in the 1st clinical group.

When applying the minimum power of radiowaves, reducing the area of influence of tissue damage – the optimal coagulation effect is maintained, which reduces the average blood loss during the operation by almost 1.3 times. In the postoperative period, the average duration of antibiotic therapy in women of the 2nd clinical group was 4.08 ± 1.3 days, the need for anesthetic preparations was 1.25 ± 0.48 days, and the duration of postoperative bed-days was 3.88 ± 1.09 days (p <0.05) as compared

with the 1st clinical group in patients of the 2nd clinical group, the duration of antibiotic therapy has been statistically significantly reduced, the need for anesthetic preparations and the duration of the postoperative bed-days decreased, which in our opinion are the advantages of using radiowaves during surgical intervention.

Indicators for the level of fibronectin, TGF-β, IL-1, IL-6 in women in the comparison group, 1st and 2nd clinical groups before and after surgery are presented in Table 4.

Table 4  
Indicators of fibronectin, TGF-β, IL-1 and IL-6 levels in women of the comparison, 1st and 2nd clinical groups before and after 7 days of surgery

Indicator	Comparison group (n=30)	1st clinical group (n=48)		2nd clinical group (n=48)	
		before surgery	after surgery	before surgery	after surgery
fibronectin, mcg/ml	324±8.5	461.7±7.8 p<0.05	427.3±18.8 p<0.05 p1<0.05	461.4±7.7 p<0.05	397.9±22.4 p<0.05 p1<0.05
TGF-β mcg/ml	10.79±1.56	23.5±2.42 p<0.05	19.04±1.92 p<0.05 p1<0.05	26.98±2.2 p<0.05	17±1.56 p<0.05 p1<0.05
IL-1b pg/ml	15.81±2.08	44.35±2.4 p<0.05	27.14±3.96 p<0.05 p1<0.05	50.88±2.59 p<0.05	21.38±3.91 p>0.05 p1<0.05
IL-6 pg/ml	17.62±1.5	60.99±3.29 p<0.05	38.47±5.67 p<0.05 p1<0.05	65.42±3.43 p<0.05	31.29±4.71 p<0.05 p1<0.05

As can be seen from the data in Table 4, the rates for surgical treatment were elevated (p <0.05) almost by 3 times in women of the 1st and 2nd clinical groups as contrasted with the comparison group of women. After conducting the operative treatment, the indicators of TGF, IL-1, IL-6, fibronectin in comparison with preoperative data statistically showed a significant decrease (p <0.05) by 2 times. However, all indicators were somewhat elevated (statistically significant) as contrasted with the comparison group, that is, healthy women. Comparison of women in the 1st and 2nd clinical groups revealed a more significant decrease in these parameters in women of the 2nd clinical group.

The catamnesis of 31 patients of the 1st clinical group and 38 patients of the 2nd clinical group was studied 1 year after the end of rehabilitation therapy. The criteria for the effectiveness of treatment of infertility were indicators of ultrasound, doppler method, MSG, and pregnancy.

Discussion of results. When comparing the results of MSG after 3 months after the operation with the data of CSG at the end of the operation, it was found that the fallopian tubes recovered during the operation remained passable in almost all women from 25 to 96.1% of the 2nd clinical group, except for 1 woman. At the same time, in women of the 1st clinical group, in only 12 women (38.7%) fallopian tubes remained passable.

Indicators of the onset of uterine and tubal pregnancy in patients of the 2nd clinical group were compared with the fertility indices of 30 healthy women in the comparison and 1st clinical group: pregnancy occurred in 18 (47.4%) patients of the 2nd clinical group, including the uterine – in 15 women (39.5%), and tubal in 3 (7.9%) patients from 38 women who were taken for further treatment. According to the literature, the incidence of pregnancy after reconstructive and plastic operations performed even by laparoscopic access does not exceed 21-28%. When comparing the rates in women of the 1st clinical group and the 2nd clinical group, the onset of

pregnancy in patients of the 2nd clinical group was by 1.6 times higher than in patients of the 1st clinical group. Furthermore, in women of the 1st the clinical group the onset of ectopic pregnancy reduced by 1.6 times, as well as the restoration of fallopian tubes was by 2.5 times higher in patients of the 2nd clinical group than in women of the 1st clinical group, as confirmed by the data of metrorosalpingography 3 months after the operation.

Conclusions. The application of the proposed method of surgical treatment using radiowaves, intraoperative prevention of adhesion using an antiadhesive gel of derivative carbomethylcellulose and a complex of early phased rehabilitation led to a decrease in the markers of adhesive process (fibronectin, IL-1b, IL-6, TFR-β) almost 2-fold, decrease postoperative bed / day by 1.3 times, reduction of the necessity of the duration of analgesic and antibacterial preparations in the early postoperative period by almost 1.5 times, increased the percentage of FT permeability, reduced the risk of an ectopic pregnancy by 1.6 times, and increased the incidence of uterine pregnancy by 1.6 times as compared with the use of conventional methods of laparoscopic treatment and prevention of the adhesive process, despite the fact that women of the 2nd clinical group had adhesive process of III-IV degrees, and the clinical manifestations of the adhesive process were more pronounced.

#### References

1. Adamyan A.V. Spaechniy process v brushnoy polosti: istoriya izucheniya, klassifikatsiya, patogenes: (obzor literatury) / A.V. Adamyan, A.V. Kozachenko, L. M. Kondratovich // Problemu reprodukcii. – 2013. – № 6. – P. 7-13.
1. Gasparov A. S. Tazovye peritonealnye spayki: etiologiya, patogenes, diagnostika, profilaktika / A.S. Gasparov, E. D. Dubinskaya. – Moscow: MIA, 2013. – 168 p.
2. Diagnosticheskie vozmozhnosti echographiceskogo issledovaniya v opredelenii rasprostranennosti spaechnogo processa v malom tazu / E. D. Dubinskaya, A. S. Gasparov, A. N. Khachatryan, etc. // The doctor. – 2012. – No. 1. – P. 84-87. 3.
3. Dubosarskaya Z. M. Role pro- i protivovospalitelnykh cytokinov v vozniknovenii sindroma chronicheskoy tazovoy boli u pacientok s vospalitelnyimi processami organov malogo taza / Z. M. Dubosarskaya, L.P. Grek // Reproductivnoe zdorovie. Vostochna Europa – 2016. – No. 3. – P. 322-330.
4. Ispolzovanie protivospaechnykh sredstv pri trubno – peritonealnom faktore besplodiya / T. N. Manannikova, A. Popov, N. A. Kolesnik, and others. // Russian vestnik akusher – ginekologa. – 2012. – No. 4. – P. 66-70. 5.
5. Nikitin O. D. Diagnostika bezpliddya v suchasnich umovah: (trubno-peritonealniy factor) / O. D. Nikitin, L. A. Zhabitskaya // Zdoroviya zhenshchiny. – 2011. – No. 3. – P. 234-237.
6. Pro organizatiu ambulatornoy akushersko – gynecologichnoy dopomogy v Ukraine: Nakaz e Ministerstva Zdorovia Ukraine No. 417 dated July 15, 2011
7. Yuz'ko A.M. Zhenskoe besplodie trubnogo proishozhdeniya: (obzor literatury) / AM Yuz'ko // Zdoroviya zhenshchiny. – 2017. – No. 2. – P. 126-131. 8.
8. International federation of Fertility Society. Global Standards of infertility Care. Standart 9. Tubal Surgery. Recommendations for Practice [електронний ресурс]. – 2016. – Режим доступу: [iffs-reproduction.org/resource/resmgr/Police\\_Statements/Standart\\_9\\_TubalsurgeryJuly\\_.pdf](https://www.iffs-reproduction.org/resource/resmgr/Police_Statements/Standart_9_TubalsurgeryJuly_.pdf) (last access:05.12.16).
9. Koninckx Ph. R. Role of the peritoneal cavity in the prevention of postoperative adhesions, pain and fatigue / Ph. R. Koninckx // Fertility and Sterility. – 2016. – Vol. 106, N 5. – P. 998-1010.
10. Predicting formation of adhesions after gynaecological surgery: development of a risk score / Per Lundorff, Hans Brölmann, Philippe Robert Koninckx et al. // Arch Gynecol Obstet. – 2015. – Vol. 292 (4). – P. 931–938.
11. The prevalence of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium tubal infections and their effects on the expression of IL-6 and leukaemia inhibitory factor in Fallopian tubes with and without an ectopic pregnancy / B. Refaat, A. M. Ashshi, S. A. Batwa et al. // Innate Immunity. – 2016. – Vol. 22 (7). – P. 534-545.

Матеріал надійшов до редакції 18.10.2017

© Скочко О.В.  
УДК 575:616.13-004.6

## ПОЛІМОРФНИЙ АЛЕЛЬ 299GLY ГЕНА TLR4 АСОЦІЮЄТЬСЯ ІЗ ЗНИЖЕНОЮ ЕФЕКТИВНІСТЮ ВКЛЮЧЕННЯ У КОМПЛЕКСНУ ТЕРАПІЮ ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ АЗИТРОМІЦИНУ ТА ПІОГЛІТАЗОНУ\*

Скочко О.В.

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*Полиморфизм Asp299Gly гена TLR4 играет важную роль в патогенезе ишемической болезни сердца (ИБС), но до сих пор остаются не изученными терапевтические стратегии, которые учли его роль при лечении заболевания. Цель работы - проведение сравнительного анализа клинической эффективности азитромицина и пиоглитазона на фоне комплексной терапии с учетом полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 у пациентов с ИБС. Материалы и методы. В исследование включено 40 человек с ИБС в возрасте от 45 до 68 лет, разделенных на 2 группы наблюдения: первая группа (n = 20) получала вместе с комплексной терапией азитромицин в дозе 500 мг/сут в течение 3-х дней, затем по 500 мг/неделю в течение 6 месяцев, вторая группа (n = 20) - вместе с комплексной терапией пиоглитазон в дозе 15 мг 1 раз в сутки, утром в течение 6 месяцев. Длительность наблюдения 12 месяцев. Результаты. Каждая группа наблюдения была разделена на две подгруппы: с генотипом Asp/Asp и с объединенным генотипом Asp/Gly + Gly/Gly. Первая группа наблюдения с генотипом Asp/Asp составила 14 человек (70%), а с объединенным генотипом Asp/Gly + Gly/Gly - 6 человек (30%), вторая группа наблюдения - 17 человек (85%) и 3 (15%), соответственно. Прием азитромицина у носителей аллеля Asp (Asp/Asp) в отличие от носителей аллеля Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) вызвал более эффективное уменьшение размера АСБ, диаметра стеноза и ТКИМ, частичную или полную эрадикацию пародонтопатогенных микрофлоры в ротовой полости. Прием пиоглитазона у носителей аллеля Asp (Asp/Asp) в отличие от носителей аллеля Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) вызвал более отчетливое уменьшение диаметра стеноза, умеренный противовоспалительный и выраженный гипогликемический, гиполипидемическое эффекты. Выводы. Полученные нами данные показали, что у больных ИБС, носителей аллеля Asp (Asp/Asp) обнаружена большая восприимчивость к проводимому лечению, а наличие мутантной аллели Gly (Asp/Gly + Gly/Gly) гена TLR-4 связана с сниженной эффективностью терапии исследуемых препаратов, на фоне стандартного курса лечения, что свидетельствует о фармакогенетической особенности восприимчивости к действию исследуемых препаратов и должно быть учтено в клинической практике.*

**Ключові слова:** полиморфизм гена TLR4 299Gly, азитромицин, пиоглитазон, ишемическая болезнь сердца

Провідні позиції в патогенезі ішемічної хвороби серця (ІХС) та атеросклерозу належать хронічному запаленню із залученням вродженої ланки імунзапальних процесів, зокрема патерн-розпізнавальним рецепторам сімейства Toll-like рецепторів 4 типу (TLR4). TLR4 мають високий рівень експресії в атеросклеротичних бляшках (АСБ) та беруть участь у захисті від бактеріальної інфекції, зокрема і пародонтопатогенної мікрофлори, яка виступає незалежним фактором ризику, формування та прогресування атеросклерозу та ІХС [7].

Поліморфізм гена TLR4, а саме Asp299Gly (rs4986790), є однонуклеотидною заміною аденозина (A) на гуанін (G) у положенні +896 екзону 3, частота якого в популяції людей складає дещо більше 5% [5, 8]. Внаслідок амінокислотної заміни аспарагінової кислоти на гліцин у 299 положенні ланцюга рецептора, позаклітинний домен TLR4 змінюється, що призводить до зниження розпізнавання відповідних лігандів або проведення внутрішньоклітинних сигналів з менш вираженою активацією імунних клітин, так і навпаки, при впровадженні патогенів, формування різного характеру перебігу запальної відповіді і специфічних імунних реакцій, зниження продукції прозапальних цитокінів та ризику формування атеросклерозу.

У попередніх роботах нами показано, що поліморфізм Asp299Gly гена TLR4 відіграє важливу роль у патогенезі атеросклерозу та асоційований з персистенцією пародонтопатогенної мікрофлори у вогнищі запалення – АСБ при ІХС [2, 3]. Носії алелі Gly, більш сприйнятливі до підвищеної мікробної контамінації тканин коронарної артерії (КА) і мають високий ризик розвитку ІХС, ніж особи з алелем Asp [12]. Проте, є протилежні дані про те, що у осіб з поліморфізмом Asp299Gly гену TLR4 менш інтенсивно розвивається запальна реакція в стінці артерії, повільніше формується АСБ і проявляється нижча схильність до ризику розвитку атеросклерозу [15]. Проте, досі залишаються не дослідженими терапевтичні стратегії лікування ІХС, які б врахували роль поліморфізму Asp299Gly гену TLR4 в патогенезі ІХС, що представляє актуальний напрямок сучасної кардіології.

Мета даної роботи - проведення порівняльного аналізу клінічної ефективності азитромицину та піоглітазону на фоні комплексної терапії з врахуванням поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 у пацієнтів з ІХС.

### Матеріали та методи дослідження

У дослідження було включено 40 осіб у віці від 45 до 68 років, які страждали на ІХС. Дослідження проводилося в період з 2012 по 2015 рр. на базі 1-ї місь-

\* Цитування при атестації кадрів: Скочко О.В. Поліморфний алель 299Gly гена TLR4 асоціюється із зниженою ефективністю включення у комплексну терапію хворих на ішемічну хворобу серця азитромицину та піоглітазону // Проблеми екології і медицини. – 2017. – Т. 21, № 3-4. – С. 30–36.

кої клінічної лікарні м. Полтави та Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку аптології та фармакогенетики (НДІ ГІОРПФ). Перед початком дослідження всіма учасниками підписано інформовану згоду та отримано схвалення комісії з біоетики Української медичної стоматологічної академії.

Критерії включення в дослідження: стабільна стенокардія напруги, цукровий діабет (ЦД) 2 типу, без прийому ін'єкційних цукрознижувальних препаратів. Критерії виключення: наявність в анамнезі інфаркту міокарду (ІМ), інтервенційного втручання, злаякісна артеріальна гіпертензія (АГ), хронічна серцева недостатність (СН) III-IV функціонального класів (ФК), системні захворювання сполучної тканини, онкологічні та онкогематологічні захворювання, важкі інфекційні захворювання, хронічні запальні захворювання, які вимагають регулярної антибіотикотерапії, наявність в анамнезі гострого порушення мозкового кровообігу, порушення ритму серця за типом миготливої аритмії. Кінцеві первинні точки дослідження: настання смертельного наслідку в результаті ІМ, проведення ревазуляризаційних коронарних процедур (аортокоронарне шунтування або черезшкірне коронарне втручання) або госпіталізації внаслідок стенокардії.

Діагноз ІХС підтверджували у пацієнтів з наявністю стенокардії напруги I-III ФК за класифікацією Канадської асоціації кардіологів і явищ недостатності кровообігу відповідно до класифікації Нью-Йоркської кардіологічної класифікації (NYHA).

До включення в клінічне дослідження всі хворі отримували загальноприйняте лікування і проходили скринінгове обстеження для верифікації діагнозів ІХС, ЦД 2 типу та запальних захворювань зубощелепного апарату. Після скринінгу були відібрані 40 пацієнтів, які отримували стандартний комплекс медикаментозної терапії: ізосорбиду динітрат 10-20 мг 2 рази на добу, ацетилсаліцилова кислота 75 мг 1 раз на добу на ніч, бісопролол 2,5 мг 1 раз на добу, розувастатин 20 мг 1 раз на добу, раміприл 5 мг 1 раз на добу вранці. Також, хворі отримували рекомендації з приводу дієти, зміни способу життя і дотримання індивідуальної гігієни порожнини рота. Загальноприйняте лікування хворі приймали не менше місяця до досягнення стабільних показників.

При рандомізованому розподілі пацієнтів з ІХС сформовано 2 групи спостереження. Пацієнти першої групи спостереження (n=20) отримували разом з комплексною терапією препарат з групи макролідів - азитроміцин (АЗВ, Туліп Лаб Прайвіт Лімітід, Індія) в дозі 500 мг/добу протягом 3-х днів, потім по 500 мг/тиждень протягом 6 місяців. Пацієнти другої групи спостереження (n=20) отримували разом з комплексною терапією препарат із групи тіазолідиніонів – піоглітазон (Піоглар, Ранбаксі, Індія) в дозі 15 мг 1 раз на добу, вранці протягом 6 місяців. Після 6-місячного терміну лікування пацієнти обох груп продовжили прийом лише препаратів стандартного комплексу терапії ще впродовж наступних 6 місяців. Тривалість спостереження загалом склала 12 місяців. Контроль за ефективністю лікування здійснювали у 6 та у 12 місяців.

Обстеження включало збір анамнестичних і об'єктивних даних, оцінювалися антропометричні показники, вимірювалися показники артеріального тиску (АТ) - систолічного і діастолічного артеріального тиску (САТ і ДАТ), реєстрували електрокардіограму (ЕКГ) і велоергометрію (ВЕМ). ВЕМ проводили на велоергометрі

Велоерготест 05 (Україна) за методикою ступінчастого зростаючого навантаження з подальшим збільшенням потужності кожні 3 хвилини під контролем ЕКГ і АТ. Критеріями припинення ВЕМ були загальноприйнятні клінічні або ЕКГ ознаки ішемії міокарда. У пацієнтів реєструвалися показники частоти серцевих скорочень (ЧСС). Консультація стоматолога включала огляд, інструментальне обстеження, верифікацію діагнозів і взяття зубоясенної рідини з пародонтальних кишень порожнини рота хворого.

Стан судинного русла визначали всім пацієнтам ультразвуковим дослідженням (УЗД) судин шиї на апараті «ULTIMA PA», датчиком L5 - 12/40 відповідно до стандартних протоколів в В-режимі на трьох рівнях судинного русла і білатерально в кінці діастолі: в проксимальній, медіальній і дистальній точках на відстані 1 см від біфуркації по задній стінці правої і лівої загальної сонної артерії (ПЗСА і ЛЗСА, відповідно) як більш віддаленій від датчика. Реєстрували контур сонних артерій, їх внутрішній просвіт, реєстрували показники наявності ознак АСБ (розмір, локалізація). Товщину комплексу інтими-медіа (ТКІМ) сонних артерій визначали як відстань між першою і другою ехогенними лініями локованої ділянки за методикою Рігнолі Р. і співавторів. За нормальну вважали ТКІМ менше 0,9 мм; ТКІМ загальної сонної артерії > 1,4 мм оцінювали як АСБ, а в межах 1,0-1,3 мм як потовщення ТКІМ (ESH, ESC, 2007).

Визначення ДНК представників пародонтопатогенної мікрофлори із зубоясенної рідини пародонтальних кишень та алелей поліморфної ділянки Asp299Gly гену Toll-подібного рецептора 4 хворих на ІХС проводили як описано раніше [2].

Обсяг лабораторних досліджень включав визначення загальноклінічного та біохімічного аналізу крові. Визначення запальної відповіді здійснювали за основними біомаркерами - високочутливим С-реактивним білком (вч-СРБ, «DRG», США) та тканинним інгібітором металлопротеїнази -1 людини (ТІМР-1, «eBioscience», Австрія) імуноферментним методом. Стан вуглеводного обміну визначали за глікемічним профілем рівня глюкози натще і через 1 годину після прийому 75г глюкози (пероральний глюкозо-толерантний тест, ПГТТ) глюкозооксидазним методом, розраховували гіперглікемічний коефіцієнт. Ліпідний спектр визначали за показниками загального холестерину (ХС), тригліцеридів (ТГ) і холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВШ) («Діакон-ДС», Росія), розраховували вміст холестерину в складі ліпопротеїдів низької щільності (ХС ЛПНЦ), вміст холестерину в складі ліпопротеїдів дуже низької щільності (ХС ЛПДНЦ), розраховували коефіцієнт атерогенності (КА).

Статистичну обробку виконували за допомогою програми STATISTICA 6.0 (StatSoft, США) з обчисленням середнього (M) і стандартної помилки середнього (m). Достовірність відмін визначали за допомогою t-критерію Ст'юдента, тестів ів Фішера та  $\chi^2$ . Відмінності між групами вважали статистично достовірними при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Проведено порівняльну оцінку клінічної ефективності та безпечності включення в комплексну терапію хворих на ІХС препарату із групи макролідів та препарату із групи тіазолідиніонів, що може слугувати важливим критерієм при прийнятті обґрунтованого рі-

шення вибору лікування. Підставою для використання, з метою корекції, обраних нами препаратів із групи антибіотиків – азитроміцину та з групи інсулінових сенситайзерів – піоглітазону, послужили виявлені нами раніше зміни у спектрі пародонтопатогенної мікрофлори як в АСБ, так і у вилученому вмісті пародонтальної кишені ротової порожнини, наявності ендотеліальної дисфункції (ЕД), системного запалення та порушення вуглеводного обміну серед хворих на ІХС [3, 13].

Кожна група спостереження залежно від генотипу Asp299Gly гена TLR-4 була розділена на дві підгрупи: з генотипом Asp/Asp та з об'єднаним генотипом Asp/Gly+Gly/Gly. До першої групи спостереження з ге-

нотипом Asp/Asp увійшло 14 осіб (70%), а з об'єднаним генотипом Asp/Gly+Gly/Gly – 6 осіб (30%), а до другої групи спостереження увійшло 17 осіб (85%) та 3 особи (15%), відповідно.

Визначення дії азитроміцину та піоглітазону на фоні стандартної терапії на показники перебігу атеросклеротичних процесів у ПЗСА, ЛЗСА та зовнішній сонній артерії (ЗСА) при ІХС представлено у таблиці 1. Встановлено, що у пацієнтів, які несуть алель Asp (Asp/Asp) під впливом азитроміцину через 12 місяців відбувається вірогідне зниження рівня ТКІМ у ПЗСА та у ЛЗСА у порівнянні з початковими показниками ( $p=0,04$ ;  $p=0,01$ , відповідно).

Таблиця 1

Показники УЗД судин шиї пацієнтів з ішемічною хворобою серця першої та другої груп спостереження

Параметри	До початку лікування	Через 6 місяців	Через 12 місяців	$p_1$	$p_2$	$p_3$	До початку лікування	Через 6 місяців	Через 12 місяців	$p_4$	$p_5$	$p_6$
Перша група спостереження												
Генотип	Ala/Ala (n=14)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=6)					
Права загальна сонна артерія: товщина АСБ, мм	1,43±0,45	0,88±0,21	0,77±0,2	0,1	0,08	0,2	0,77±0,31	0,48±0,19	0,33±0,23	0,07	0,03	0,2
ТКІМ	1,08±0,06	1,04±0,04	1,01±0,04	0,3	0,04	0,1	1,05±0,06	1,0±0,06	0,95±0,03	0,07	0,04	0,2
діаметр стенозу: 2 – 15 %	3	3	3	1,0	1,0	1,0	0	2	1	0,45	1,0	1,0
16-49%	6	6	5	1,0	0,43	0,43	3	1	1	0,54	0,54	1,0
Ліва загальна сонна артерія: товщина АСБ, мм	0,74±0,27	0,59±0,19	0,39±0,15	0,4	0,1	0,06	0,27±0,27	0,22±0,22	0,15±0,15	0,4	0,4	0,4
ТКІМ	1,04±0,03	1,01±0,02	0,98±0,03	0,1	0,01	0,1	1,05±0,04	0,98±0,03	0,95±0,02	0,02	0,07	0,4
Діаметр стенозу: 2 – 15 %	2	1	3	1,0	1,0	0,6	1	0	0	1,0	1,0	-
16-49%	4	6	2	0,2	0,65	0,21	1	1	1	1,0	1,0	1,0
Зовнішня сонна артерія товщина АСБ, мм	0,21±0,21	0,07±0,07	0,07±0,07	0,3	0,3	-	0,18±0,13	0,05±0,05	0	0,2	0,2	0,4
Друга група спостереження												
Генотип	Ala/Ala (n=17)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=3)					
Права загальна сонна артерія: товщина АСБ, мм	0,92±0,53	0,3±0,14	0,94±0,76	0,2	0,99	0,4	1,07±0,67	0,73±0,5	0,87±0,49	0,2	0,4	0,4
ТКІМ	1,06±0,04	1,03±0,03	1,0±0,02	0,6	0,2	0,2	1,23±0,09±	1,16±0,03±	1,1±0,06±	0,4	0,2	0,4
діаметр стенозу: 2 – 15 %	1	0	2	1,0	1,0	0,5	1	1	1			
16-49%	5	4	2	1,0	0,4	0,65	1	1	1			
Ліва загальна сонна артерія: товщина АСБ, мм	0,72±0,2	0,56±0,19	0,3±0,14	0,3	0,03	0,02	0,4±0,4	0,4±0,4	0,37±0,37	--	0,2	0,4
ТКІМ	1,07±0,04	1,04±0,03	1,0±0,02	0,4	0,054	0,02	1,23±0,09	1,16±0,03	1,1±0,06	0,4	0,2	0,4
діаметр стенозу: 2 – 15 %	0	5	2	0,04	0,5	0,4	-	-	-			
16-49%	8	3	2	0,14	0,057	1,0	-	-	-			
Зовнішня сонна артерія товщина АСБ, мм	0,24±0,11	0,17±0,09	0,09±0,06	0,3	0,07	0,1	0,5±0,5	0,5±0,5	0,33±0,33	--	0,4	0,4

Примітка (тут і в табл. 2-4):  $P_1$  – порівняння у першій групі спостереження до початку та через 6 місяців лікування азитроміцином;

$P_2$  – порівняння у першій групі спостереження до початку та через 12 місяців лікування азитроміцином;

$P_3$  – порівняння у першій групі спостереження через 6 місяців та через 12 місяців лікування азитроміцином;

$P_4$  – порівняння у другій групі спостереження до початку та через 6 місяців лікування піоглітазоном;

$P_5$  – порівняння у другій групі спостереження до початку та через 12 місяців лікування піоглітазоном;

$P_6$  – порівняння у другій групі спостереження через 6 місяців та через 12 місяців лікування піоглітазоном

У пацієнтів, які несуть алель Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) під впливом азитроміцину через 6 місяців відзначається достовірне зниження показника ТКІМ у ЛЗСА у порівнянні з початковими показниками ( $p=0,02$ ), через 12 місяців відзначається вірогідне зменшення розміру АСБ та ТКІМ у ПЗСА у порівнянні з початковими показниками ( $p=0,03$ ;  $p=0,04$ , відповідно).

У пацієнтів, які несуть алель Asp (Asp/Asp) під впливом піоглітазону через 12 місяців відзначається вірогідне зниження розміру АСБ та діаметра стенозу у ЛЗСА у порівнянні з початковими показниками ( $p=0,03$ ;  $p=0,04$ ), а також через 12 місяців реєструється вірогідне зменшення розміру АСБ, діаметра стено-



зу та ТКІМ у ЛЗСА у порівнянні з показниками через 6 місяців ( $p=0,02$ ;  $p=0,057$ ;  $p=0,02$ , відповідно).

У пацієнтів, носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) під впливом піоглітазону не відмічено вірогідних змін показників у динаміці лікування через 6 та 12 місяців.

Отже, прийом азитроміцину та піоглітазону на фоні стандартної терапії впродовж 12 місяців викликав більш ефективне пригнічення атеросклеротичних процесів у сонних судинах шиї пацієнтів, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), ніж носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) за рахунок зменшення розміру АСБ, діаметра стенозу та ТКІМ. Проте, азитроміцин найбільш виразно вплинув на зменшення товщини АСБ, тоді як піоглітазон на зменшення діаметру стенозу у сонних артеріях у пацієнтів, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), що може свідчити

про більш ефективний вплив першого препарату вже ранніх стадіях розвитку атеросклерозу, тоді як другого препарату – на дещо пізніших стадіях.

При визначенні спектру пародонтопатогенної мікрофлори у вилученому вмісті пародонтальних кишень після прийому азитроміцину у пацієнтів (табл. 2), носіїв як алелі Asp (Asp/Asp), так і алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) через 6 місяців відмічено тенденцію до зменшення частоти виявлення майже всіх представників, за винятком *Treponema denticola*. Проте, у першій групі спостереження через 12 місяців лише у пацієнтів, носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) відмічено двократне підвищення відсоткового вмісту *Porphyromonas gingivalis* з 33,3% до 66,7% ( $p=0,3$ ).

Таблиця 2

Динаміка частоти показників пародонтопатогенної мікрофлори у вилученому вмісті пародонтальної кишені пацієнтів з ішемічною хворобою серця першої та другої груп спостереження

Параметри	До початку лікування	Через 6 місяців	Через 12 місяців	$p_1$	$p_2$	$p_3$	До початку лікування	Через 6 місяців	Через 12 місяців	$p_4$	$p_5$	$p_6$
Перша група спостереження												
Генотип	Ala/Ala (n=14)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=6)					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5 / 35,7%	3 / 21,4%	4 / 28,6 %	0,34	0,5	0,5	5 / 83,3%	2 / 33,3%	4 / 66,7%	0,12	0,5	0,3
<i>Actinobacillus actinomycetem comitans</i>	2 / 14,3%	0	0	0,2	0,2	-	1 / 16,7 %	0	0	0,5	0,5	-
<i>Prevotella intermedia</i>	1 / 7,14%	0	0	0,5	0,5	-	-	-	-			
<i>Bacteroides forsythus</i>	1 / 7,14%	0	0	0,5	0,5	-	-	-	-			
<i>Treponema denticola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Друга група спостереження												
Генотип	Ala/Ala (n=17)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=3)					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5 / 29,4%	5 / 29,4%	3 / 17,6%	0,65	0,34	0,34	1 / 33,3%	1 / 33,3%	3 / 100,0%	0,8	0,2	0,2
<i>Actinobacillus actinomycetem comitans</i>	-	-	-				-	-	-			
<i>Prevotella intermedia</i>	-	-	-				-	-	-			
<i>Bacteroides forsythus</i>	-	-	-				-	-	-			
<i>Treponema denticola</i>	-	-	-				-	-	-			

Після прийому піоглітазону через 6 місяців у пацієнтів, носіїв як алелі Asp (Asp/Asp), так і алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) не встановлено змін у частоті присутності представників пародонтопатогенної мікрофлори у вилученому вмісті пародонтальних кишень. Проте, у другій групі спостереження через 12 місяців лише у пацієнтів, носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) відмічено трьохкратне підвищення відсоткового вмісту *Porphyromonas gingivalis* з 33,3% до 100,0% ( $p=0,2$ ).

Отже, лише азитроміцин на фоні прийому стандартної терапії впродовж 6 місяців проявляє антибактеріальний ефект переважно у пацієнтів з ІХС, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), на відміну від носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) за рахунок часткової або повної ерадикації пародонтопатогенної мікрофлори у ротовій порожнині.

Аналіз маркерів запалення, вуглеводного та ліпідного обмінів показав (табл. 3), що під впливом азит-

роміцину через 6 місяців у пацієнтів, які несуть як алель Asp (Asp/Asp) відбувається вірогідне зниження рівня холестерину та ЛПВЩ у порівнянні з початковими показниками ( $p=0,04$ ;  $p=0,04$ , відповідно), через 12 місяців відбувається вірогідне зниження рівня ШОЕ, глюкози та ЛПНЩ у порівнянні з початковими показ-

никами ( $p=0,04$ ;  $p=0,02$ ;  $p=0,04$ , відповідно), а також через 12 місяців відбувається вірогідне зниження рівня ШОЕ та КА, підвищення рівня ЛПВЩ у порівнянні з показниками у 6 місяців ( $p=0,04$ ;  $p=0,0003$ ;  $p=0,003$ , відповідно).

Таблиця 3  
Показники лабораторного обстеження в залежності від поліморфізму гена TLR4 при лікуванні пацієнтів з ішемічною хворобою серця першої та другої груп спостереження

Параметри	До початку лікування	Через 6 місяців	Через 12 місяців	$p_1$	$p_2$	$p_3$	До початку лікування	Через 6 місяців	Через 12 місяців	$p_4$	$p_5$	$p_6$
Перша група спостереження												
Генотип	Ala/Ala (n=14)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=6)					
ШОЕ, мм/год	16,14±4,34	9,07±1,02	7,57±0,86	0,08	0,04	0,04	14,0±5,01	9,33±1,2	6,83±0,8	0,28	0,18	0,053
вч-С-реактивний білок, мг/л	5,33±1,69	3,26±0,85	6,57±1,53	0,27	0,58	0,09	5,22±2,58	3,65±0,85	4,27±1,6	0,58	0,77	0,5
ТІМР-1, пг/мл	1713,8±115,3	1926,5±116,7		0,26			1559,9±190,4	2060±234,1		0,006		
Глюкоза крові, ммоль/л	6,42±0,6	5,65±0,3	5,4±0,34	0,17	0,02	0,35	6,59±1,04	5,42±0,23	5,25±0,19	0,33	0,25	0,58
Пероральний глюкозотолерантний тест, ммоль/л	9,91±1,33	8,73±0,47		0,27			9,32±0,64	8,59±0,37		0,21		
Холестерин, ммоль/л	4,89±0,29	4,14±0,18	4,4±0,18	0,04	0,13	0,31	4,57±0,38	4,25±0,19	4,1±0,15	0,46	0,36	0,5
Тригліцериди, ммоль/л	0,82±0,14	0,79±0,12	0,89±0,09	0,62	0,49	0,27	0,63±0,06	0,65±0,07	0,77±0,09	0,8	0,06	0,3
ЛПВЩ, ммоль/л	1,05±0,07	0,88±0,09	1,11±0,07	0,04	0,26	0,0003	0,8±0,07	0,99±0,12	1,09±0,2	0,16	0,11	0,46
ЛПНЩ, ммоль/л	3,52±0,28	2,9±0,2	2,9±0,16	0,07	0,04	0,9	3,49±0,39	2,96±0,18	2,66±0,16	0,13	0,08	0,21
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,35±0,06	0,36±0,05	0,41±0,05	0,92	0,27	0,27	0,27±0,03	0,29±0,03	0,35±0,04	0,55	0,02	0,3
Коефіцієнт атерогенності	4,09±0,67	4,23±0,47	3,17±0,32	0,78	0,06	0,003	5,02±0,92	3,49±0,36	3,3±0,67	0,08	0,04	0,8
Друга група спостереження												
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	6,46±0,3	6,56±0,3	6,6±0,2	0,7	0,6	0,9	6,27±0,77	7,45±0,35	5,08±0,22	0,35	0,35	0,03
ШОЕ, мм/год	16,65±2,9	11,06±0,8	9,65±0,9	0,03	0,01	0,04	8,67±4,25	8,67±1,33	6,67±1,67	1	0,5	0,32
вч-С-реактивний білок, мг/л	3,41±0,61	3,99±0,74	7,74±1,63	0,55	0,01	0,04	11,77±4,9	4,6±2,07	6,9±5,4	0,22	0,4	0,7
ТІМР-1, пг/мл	1447±118,9	1549,2±97,4		0,5			1217±229,03	1920±203,3		0,007		
Глюкоза крові, ммоль/л	6,02±0,15	6,06±0,26	5,49±0,25	0,91	0,09	0,07	5,9±0,03	5,5±0,5	5,03±0,25	0,49	0,09	0,6
Пероральний глюкозотолерантний тест, ммоль/л	12,45±0,69	9,52±0,53		0,0001			10,9±1,44	7,99±0,4		0,25		
Гіперглікемічний коефіцієнт	2,07±0,11	1,59±0,08		0,002			1,84±0,25	1,47±0,11		0,21		
Холестерин, ммоль/л	5,21±0,19	4,48±0,17	4,6±0,2	0,006	0,06	0,6	5,63±0,47	4,97±0,52	4,5±0,4	0,57	0,006	0,7
Тригліцериди, ммоль/л	0,72±0,09	0,72±0,05	0,92±0,09	1,0	0,12	0,02	0,53±0,09	0,7±0,06	0,87±0,09	0,04	0,06	0,13
ЛПВЩ, ммоль/л	0,86±0,06	1,06±0,04	1,12±0,07	0,01	0,002	0,4	0,72±0,06	0,85±0,1	1,03±0,1	0,52	0,18	0,16
ЛПНЩ, ммоль/л	4,03±0,2	3,1±0,16	3,06±0,17	0,001	0,004	0,87	4,69±0,4	3,8±0,4	3,07±0,5	0,4	0,009	0,5
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,32±0,04	0,33±0,02	0,42±0,04	0,79	0,08	0,02	0,23±0,04	0,32±0,03	0,39±0,04	0,03	0,06	0,13
Коефіцієнт атерогенності	5,42±0,5	3,39±0,2	3,29±0,2	0,001	0,0006	0,77	6,83±0,32	4,94±0,48	3,5±0,74	0,14	0,051	0,26

У пацієнтів, які несуть алель Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) під впливом азитроміцину через 6 місяців відзначалось вірогідне підвищення показників ТІМР-1 ( $p=0,006$ ), через 12 місяців відзначалося достовірне зниження КА ( $p=0,04$ ), підвищення ЛПДНЩ ( $p=0,02$ ) у порівнянні з початковими показниками.

Аналіз дії піоглітазону у хворих на ІХС показав, що у пацієнтів, які несуть алель Asp (Asp/Asp) під впливом піоглітазону через 6 місяців відзначалося достовірне зниження рівнів ШОЕ ( $p=0,03$ ), ПГТТ ( $p=0,0001$ ), гіперглікемічного коефіцієнту ( $p=0,002$ ), холестерину ( $p=0,006$ ), ЛПНЩ ( $p=0,001$ ) та КА ( $p=0,001$ ), підвищення рівня ЛПВЩ ( $p=0,01$ ) у порівнянні з початковими показниками, через 12 місяців зниження рівня ШОЕ ( $p=0,03$ ), ЛПНЩ ( $p=0,004$ ) та КА ( $p=0,0006$ ), підвищен-

ня рівня вч-СРБ ( $p=0,01$ ) та ЛПВЩ ( $p=0,002$ ) у порівнянні з початковими показниками, а також через 12 місяців вірогідне зниження рівня ШОЕ ( $p=0,004$ ), підвищення рівня вч-СРБ ( $p=0,04$ ), тригліцеридів ( $p=0,02$ ) та ЛПДНЩ ( $p=0,02$ ) у порівнянні з показниками у 6 місяців.

У пацієнтів, носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) під впливом піоглітазону через 6 місяців відзначалося достовірне підвищення рівня ТІМР-1 ( $p=0,007$ ), тригліцеридів ( $p=0,04$ ) та ЛПДНЩ ( $p=0,03$ ) у порівнянні з початковими показниками, через 12 місяців відмічалось вірогідне зниження рівнів холестерину ( $p=0,006$ ) та ЛПНЩ ( $p=0,009$ ) у порівнянні з початковими показниками, через 12 місяців вірогідне зниження рівня лей-

коцитів ( $p=0,03$ ) у порівнянні з показниками у 6 місяців.

Отже, у пацієнтів з ІХС, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), азитроміцин здійснював більш виражений вплив на показники запалення та ліпідного обміну, тоді як піоглітазон - на показники запалення та вуглеводного обміну.

Отримані дані свідчать, що в результаті проведеного лікування обидва застосовані на фоні стандартної терапії препарати, азитроміцин та піоглітазон, мають як спільні, так і окремі механізми впливу на перебіг ІХС. Застосування антибіотику, азитроміцину, на фоні стандартної терапії протягом 6 місяців у пацієнтів, носіїв алелі Asp (Asp/Asp) призводило до більш ефективного пригнічення розвитку атеросклерозу за рахунок зменшення розміру АСБ, прояву антибактеріального ефекту, більш вираженого протизапального та задовільного гіполіпідемічного впливу, ніж у пацієнтів носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly).

Терапія тіазолідиндіоном, піоглітазоном, на фоні стандартної терапії протягом 6 місяців у пацієнтів, носіїв алелі Asp (Asp/Asp) викликала більш виразне зменшення розвитку атеросклерозу за рахунок зменшення діаметру стенозу, помірного протизапального та вираженого гіпоглікемічного ефекту, а також гіполіпідемічного ефекту за рахунок попередження формування атерогенної дисліпідемії, ніж у пацієнтів носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly).

Аналізуючи літературні дані можна дійти висновку, що серед сучасних терапевтичних засобів при ІХС ефективним протизапальним ефектом володіють макроліди, зокрема азитроміцин, а також альтернативні ефекти проявляють тіазолідиндіони, а саме піоглітазон. Даний ефект обох препаратів реалізується на рівні молекулярних механізмів через пригнічення експресії прозапального ядерного фактора NF- $\kappa$ B [14, 16], що може формувати у пацієнтів з поліморфізмом Asp299Gly гену TLR4 різну клінічну ефективність на терапію даними лікарськими засобами.

Отриманий нами позитивний ефект азитроміцину впродовж піврічного застосування на фоні стандартної терапії у пацієнтів з ІХС, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), ймовірно, обумовлений безпосередньою дією на пародонтопатогенні мікроорганізми у вогнищі запалення, а саме, як у ротовій порожнині, так і в АСБ [1]. Азитроміцин, стимулює фагоцитоз, пригнічення вироблення активних форм кисню, інфільтрацію лейкоцитів в тканини [11], а також активує діяльність TIMP-1, що може попереджати ініціюванню нестабільності і розриву АСБ [4].

В нашому дослідженні отримані дані позитивного впливу піоглітазону впродовж піврічного застосування на фоні стандартної терапії у пацієнтів з ІХС, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), що виражалося у пригніченні атеросклеротичних та запальних процесів, інсулінорезистентності та дисліпідемії у хворих на ІХС. Механізм даного впливу пов'язують з блокуванням прозапальних NF- $\kappa$ B-залежних механізмів, що спричиняє зниження рівня СРБ, адипонектина, MMP-9, моноцитарно-хемотаксичного білка (MCP-1) та розчинного маркера CD40L, що може сприяти попередженню розвитку атеросклерозу та макроваскулярних ускладнень при ІХС [6]. Відомо, що сумарний ефект чинників, на які впливає піоглітазон чинить кардіопротективний ефект за рахунок покращення діастолічної функції лівого шлуночка у пацієнтів з АГ, утилізації глюкози кардіоміоцитами, підвищення потоку крові, попере-

дження запалення КА та коронароспазму, а також мінімізації ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарду [9, 10].

Отримані нами дані показали, що у хворих на ІХС, носіїв алелі Asp (Asp/Asp) виявлена більша сприйнятливості до проведеного лікування, тоді як наявність мутантної алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) гену TLR-4 пов'язана з ризиком зниження ефективності терапії досліджуваними препаратами на фоні стандартного курсу лікування, що свідчить про фармакогенетичні особливості сприйнятливості до дії досліджуваних препаратів та має бути враховано у клінічній практиці.

### Висновки

1. Прийом азитроміцину на фоні стандартної терапії впродовж 6 місяців у пацієнтів, носіїв алелі Asp (Asp/Asp), на відміну від пацієнтів, носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) викликав більш ефективне пригнічення атеросклеротичних процесів за рахунок зменшення розміру АСБ, діаметра стенозу та ТКІМ, антибактеріальний ефект переважно за рахунок часткової або повної ерадикації пародонтопатогенної мікрофлори у ротовій порожнині, більш вираженого протизапального та задовільного гіполіпідемічного впливу.

2. Прийом піоглітазону, на фоні стандартної терапії протягом 6 місяців у пацієнтів, носіїв алелі Asp (Asp/Asp) на відміну від пацієнтів, носіїв алелі Gly (Asp/Gly+Gly/Gly) викликав більш виразне зменшення розвитку атеросклерозу за рахунок зменшення діаметру стенозу, помірного протизапального та вираженого гіпоглікемічного та гіполіпідемічного ефекту за рахунок попередження формування атерогенної дисліпідемії.

### Перспективи подальших досліджень

В нашій роботі вперше показано, що ефективність лікування азитроміцином та піоглітазоном в курсі стандартної терапії залежить від наявності поліморфізму Asp299Gly гену TLR4, що може мати широкі перспективи використання в сучасній кардіології та терапії.

### Література

1. Непокупная-Слободянюк Т.С. Клиническая эффективность длительного курса азитромицина при хроническом генерализованном пародонтите / Т.С. Непокупная-Слободянюк, П.Н.Скрипников // Медицинские новости Грузии. – 2014. - № 11(236). – С. 27-31.
2. Скочко О.В. Количественный анализ некоторых групп микроорганизмов, выделенных из атеросклеротически измененных коронарных артерий больных в зависимости от Asp299Gly полиморфизма гена TLR4 / О.В. Скочко, И.П. Кайдашев, Л.Э. Веснина [та ін.] // Лікарська справа. – 2012. - №3-4 (1113). – С. 82 – 85.
3. Скочко О. В. Роль некоторых парадонтопатогенных микроорганизмов и полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 в патогенезе атеросклероза / О.В. Скочко, Н.А. Боброва, О.В. Измайлова, И.П. Кайдашев // Журн. микробиологии и эпидемиологии. – 2011. – № 5. – С. 83–85.
4. Amantea D. Azithromycin protects mice against ischemic stroke injury by promoting macrophage transition towards M2 phenotype / D. Amantea, M. Certo, F. Petrelli [et al.] // Exp. Neurol. – 2016. – Vol. 275 (Pt 1). – P. 116-125.
5. Chen R. TLR4 Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis / R. Chen, N. Gu, Y. Gao, W. Cen // Peer J. – 2015. – Vol. 3. – P. e1412.
6. Hanefeld M. Anti-inflammatory effects of Pioglitazone and/or Simvastatin in high cardiovascular risk patients with elevated high sensitivity C-Reactive Protein. The PIOSTAT Study / M. Hanefeld, N. Marx, A. Pftzner [et al.] // J. American College of Cardiology. - 2007. - Vol. 49 (3). - P. 290-297.

7. Kiechl S. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis / S. Kiechl, E. Lorenz, M. Reindl [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347. – P. 185–192.
8. Levchenko L. Yu. TLR4 896A/G gene polymorphism, rather than the TLR4 1196C/T and TLR2 2258G/A gene polymorphisms, determines the severe and aggravated course of atopic dermatitis in children / L. Yu. Levchenko, O. V. Izmailova, O. A. Shlykova, I. P. Kaidashev // *Cytology and Genetics.* – 2013. – Vol. 47(3). – P. 167–173.
9. Morita S. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activator, suppresses coronary spasm / S. Morita, Y. Mizuno, E. Harada [et al.] // *Coron. Artery Dis.* – 2014. – Vol. 25(8). – P. 671–677.
10. Nitta Y. Pioglitazone decreases coronary artery inflammation in impaired glucose tolerance and diabetes mellitus: evaluation by FDG-PET/CT imaging / Y. Nitta, N. Tahara, A. Tahara [et al.] // *JACC Cardiovasc. Imaging.* – 2013. – Vol. 6(11). – P. 1172–1182.
11. Schneider C.A. In vivo uptake of azithromycin in human coronary plaques / C.A. Schneider, H. Diedrichs, K.D. [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2000. – Vol. 86 (7). – P. 789–791.
12. Schneider S. Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with age-dependent systolic blood pressure increase in patients with coronary artery disease / S. Schneider, W. Koch, P. Hoppmannet [et al.] // *Immunity Ageing.* – 2015. – Vol. 12. – P. 1–4.
13. Skochko O.V. The relationship of periodontal disease to risk factors for the development of the ischemic heart disease / O.V. Skochko, T.V. Mamontova, L.E. Vesnina, I.P. Kaidashev // *Ukrainian J. Cardiology.* – 2015. – Vol. 2. – P. 87–94.
14. Stellari F.F. Azithromycin inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation during lung inflammation: an in vivo imaging study / F.F. Stellari, A. Sala, G. Donofrio [et al.] // *Pharmacol Res Perspect.* – 2014. – Vol. 2 (5). – P. e00058.
15. Wang W. TLR4 activation induces nontolerant inflammatory response in endothelial cells / W. Wang, M. Deng, X. Liu [et al.] // *J. Inflammation.* – 2011. – Vol. 34(6). – P. 509–518.
16. Wei W.Y. Pioglitazone protected against cardiac hypertrophy via inhibiting AKT/GSK3 $\beta$  and MAPK signaling pathways / W.Y. Wei, Z.G. Ma, S.C. Xu [et al.] // *PPAR Res.* – 2016. – Vol. 2016. – P. 917–941.

## ENGLISH VERSION: THE TLR4 299GLY POLYMORPHIC ALLELE IS ASSOCIATED WITH REDUCED EFFICACY OF AZITHROMYCIN AND PIOGLITAZONE, INCLUDED IN THE COMPREHENSIVE TREATMENT OF PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE\*

Skochko O.V.

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava

*The Asp299Gly polymorphism of the TLR4 gene plays an important role in the pathogenesis of coronary heart disease (CHD). The purpose of the work is to conduct a comparative analysis of the clinical efficacy of azithromycin and pioglitazone against the background of complex therapy taking into account the Asp299Gly polymorphism of the TLR4 gene in patients with CHD. Materials and methods. The study included 40 people with CHD in the age group 45-68 years, divided into 2 groups of observation: the first group (n = 20) received, together with the integrated therapy, azithromycin at a dose of 500 mg/day for 3 days, then 500 mg/week for 6 months, the second group (n = 20) - together with the combined therapy pioglitazone in a dose of 15 mg once daily, in the morning for 6 months. Duration of observation 12 months. Results. Each observation group was divided into two subgroups: the Asp/Asp genotype and the combined genotype Asp/Gly +Gly/Gly. The first observation group with the Asp/Asp genotype was 14 (70%), while the combined genotype Asp/Gly +Gly/Gly was 6 (30%), the second observation group was 17 (85%) and 3 (15%), respectively. The acceptance of azithromycin from Asp (Asp/Asp) allele carriers, led to a more effective reduction in the size of the ACS, the diameter of the stenosis and TSC, partial or complete eradication of the parodontopathogenic microflora in the oral cavity. The use of pioglitazone in carriers of the Asp allele (Asp/Asp) caused a more pronounced decrease in the diameter of the stenosis, moderate anti-inflammatory and pronounced hypoglycemic, hypolipidemic effects. Conclusions The data obtained by us showed that in patients with CHD, carriers of Asp allele, a high susceptibility to treatment was detected, and the presence of the Gly mutant allele of the TLR-4 gene was associated with a reduced therapeutic efficacy of the investigational drugs, against the background of a standard course of treatment, which indicates the pharmacogenetic peculiarity of susceptibility to the action of the investigational drugs and should be taken into account in clinical practice.*

**Key words:** TLR4 299Gly polymorphism, azithromycin, pioglitazone, coronary heart disease

The leading positions in the pathogenesis of coronary heart disease (CHD) and atherosclerosis belong to chronic inflammation with the involvement of the innate link of immune and inflammatory processes, in particular the pattern-recognizing receptors of the Toll-like family type 4 (TLR4). TLR4 has a high level of expression in atherosclerotic plaques (ASPs) and is involved in the protection against bacterial infection, including periodontal pathogenic microflora, which acts as an independent risk factor for the formation and progression of atherosclerosis and coronary artery disease [7].

The polymorphism of TLR4 gene, namely, Asp299Gly (rs4986790), is a single nucleic acid substitution of adenosine (A) for guanine (G) at the position of +896 of exon 3, whose frequency in the human population is slightly more than 5% [5, 8]. As a result of the amino acid replacement of aspartic acid for glycine at the position of 299 of the receptor chain, the extracellular domain of TLR4 is changed, which leads to a decrease in the recognition of the corresponding ligands or intracellular signals with less pronounced activation of the immune cells, and vice versa, with the introduction of pathogens, the formation of different nature of the course of inflammatory response and specific immune responses, reduced proinflammatory cytokine production and the risk of atherosclerosis.

In previous studies, we have shown that the Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and is associated with the persistence of parodontopathogenic mi-

croflora in the inflammation site – ASP in CHD [2, 3]. Carriers of the Gly allele are more susceptible to increased microbial contamination of coronary artery (CA) tissue and have a high risk of developing coronary heart disease than those with the Asp allele [12]. However, there are controversial evidence that in the individuals with the Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene, the inflammatory reaction in the artery wall develops less intensively, ASP is formed slower, and a lower predisposition to the risk of atherosclerosis is manifested [15]. However, therapeutic strategies for treating coronary heart disease, which would take into account the role of the Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene in the pathogenesis of CHD, are still not investigated, which represents the relevant direction of modern cardiology.

The aim of this research is to conduct a comparative analysis of the clinical efficacy of azithromycin and pioglitazone against the background of comprehensive therapy taking into account the Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene in patients with coronary heart disease.

### Materials and methods

The study included 40 people aged 45-68 who suffered from coronary heart disease. The research was conducted in the period from 2012 to 2015 on the basis of the 1st City Clinical Hospital of Poltava and the Research Institute of Genetic and Immunological Foundations of the Development of Pathology and Pharmacogenetics (Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy»).

\* To cite this English version: Skochko O.V. The TLR4 299Gly polymorphic allele is associated with reduced efficacy of azithromycin and pioglitazone, included in the comprehensive treatment of patients with coronary heart disease. // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 37-42.

Before the study, all participants signed the informed consent forms and the approval from the Bioethics Commission of Ukrainian Medical Stomatological Academy was obtained.

Criteria for inclusion in the study were as follows: stable angina pectoris, type 2 diabetes mellitus (DM), without injecting hypoglycemic agents. Exclusion criteria: presence of the history of myocardial infarction (MI), surgical intervention, malignant arterial hypertension (AH), chronic heart failure (CHF) of III-IV functional classes (FC), systemic connective tissue diseases, oncological and oncohematological diseases, severe infectious diseases, chronic inflammatory diseases, which require regular antibiotic therapy, presence in history of acute cerebrovascular accident, heart rhythm disturbances by type of auricular fibrillation. The ultimate primary points of the study are: deaths due to MI, revascularization coronary procedures (coronary artery bypass grafting or percutaneous coronary intervention) or hospitalization due to angina pectoris.

The diagnosis of coronary heart disease was confirmed in patients with angina pectoris I-III FC according to the classification of the Canadian Association of Cardiologists and Circulatory Disorders in accordance with the New York Cardiology Classification (NYHA) classification.

Before inclusion in the clinical study, all patients received a common treatment and passed a screening test for the verification of diagnoses of coronary artery disease, type 2 diabetes and inflammatory diseases of dentoalveolar apparatus. After screening, 40 patients were selected who received the standard drug therapy: isosorbide dinitrate 10-20 mg 2 times a day, acetylsalicylic acid 75 mg 1 time nocte, bisoprolol 2.5 mg 1 time per day, rosuvastatin 20 mg 1 once a day, ramipril 5 mg once a day mane. Also, the patients received recommendations about the diet, lifestyle changes and individual oral hygiene. Patients received the common treatment for at least a month until stable parameters were achieved.

In the randomized distribution of patients with coronary heart disease, 2 study groups were formed. Patients in the first study group (n = 20) received, along with the combination therapy, the macrolide group medication – azithromycin (AZV, Tulip Lab Labiwi Limitid, India) at a dose of 500 mg / day for 3 days, then 500 mg / week for 6 months. Patients in the second study group (n = 20) received, along with the comprehensive therapy, the thiazolidinedione group medication – pioglitazone (Piogalar, Ranbaksi, India) – at a dose of 15 mg once daily, mane, for 6 months. After 6 months of treatment, patients in both groups continued to receive only medications of the standard complex of therapy for the next 6 months. The duration of observation in general was 12 months. Monitoring over the effectiveness of treatment was performed at 6 and 12 months.

The examination included collecting anamnestic and objective data, evaluating anthropometric indices, measuring blood pressure (BP), systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP), electrocardiogram (ECG) and bicycle ergometry (BEM). BEM was conducted on Veloergotest 05 (Ukraine) cycling machine according to the method of stepped increasing load with further increase of power every 3 minutes with control of ECG and BP. Criteria for termination of BEM were: generally accepted clinical or ECG signs of myocardial ischemia. Heart rate (HR) parameters of patients were recorded. Consultation of the dentist included a check-up, instrumental examina-

tion, verification of diagnoses and taking dentogingival fluid from the periodontal pockets.

The bloodstream condition was determined in all patients by ultrasound examination (US) of the neck vessels by the apparatus «ULTIMA PA», with L5 sensor – 12/40 according to standard protocols in the B mode on the three levels of the vasculature and bilaterally at the end of the diastole: in proximal, medial and distal points at a distance of 1 cm from the bifurcation along the back wall of the right and left common carotid artery (RCCA and LCCA, respectively) as more distant from the sensor. The contour of carotid arteries, their internal lumina were recorded, and indicators of the presence of signs of ASP (size, localization) were registered. The intima-media thickness (IMT) of the carotid arteries was defined as the distance between the first and second echogenic lines of the locative area by the method of P. Pignoli and co-authors. IMT less than 0.9 mm was considered as normal; IMT of the common carotid artery > 1.4 mm was regarded as ASP, and within 1.0-1.3 mm – as thickening of IMT (ESH, ESC, 2007).

Determining the DNA of the representatives of parodontopathogenic microflora of dentogingival fluid of periodontal pockets and the alleles of the Asp299Gly polymorphous site of TLR4 in patients with CHD was performed as previously described [2].

The scope of laboratory studies included complete blood count biochemical blood tests. The determination of the inflammatory response was carried out using the main biomarkers – high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP, «DRG», USA) and tissue inhibitor of metalloprotease-1 human (TIMP-1, «eBioscience», Austria) by the immunoenzyme method. The condition of carbohydrate metabolism was determined by the glycemic profile of glucose: fasted and 1 hour after receiving 75 g glucose (oral glucose tolerance test, OGTT) by glucose oxidase method; the hyperglycemic coefficient was calculated. Lipid spectrum was determined by the indices of total cholesterol (CH), triglycerides (TG) and high density lipoproteins cholesterol (HDL) («Diakon-DS», Russia), the cholesterol content was calculated as a part of low density lipoproteins (LDL cholesterol), cholesterol content in very low density lipoproteins (VLDL), the atherogenicity factor (AF) was calculated.

Statistical processing was performed using STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA), calculating the average (M) and standard error (m). The reliability was determined using the Student's t-test, Fischer's tests and  $\chi^2$ . Differences between the groups were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

We conducted the comparative assessment of clinical efficacy and safety of inclusion of a medication from the macrolides group and a medication from the thiazolidinediones group in the comprehensive therapy of patients with coronary heart disease, which can serve as an important criterion in making a reasonable decision as to the choice of treatment. The reason for using, for the purpose of correction, the selected medications from the antibiotics group – azithromycin, and from the insulin sensitizers group – pioglitazone, was as earlier changes in the spectrum of parodontopathogenic microflora in ASP as well as in the withdrawn content of the periodontal pocket of the oral cavity, the presence of endothelial dysfunction (ED), systemic inflammation and disturbance

of carbohydrate metabolism in patients with coronary heart disease [3, 13].

Each study group, depending on Asp299Gly genotype of TLR-4 gene was divided into two subgroups: the Asp / Asp genotype and the combined genotype Asp/Gly + Gly/Gly. 14 patients (70%) were included in the first study group with the Asp / Asp genotype, and 6 (30%) with the combined Asp / Gly + Gly / Gly genotype, whereas the second study group included 17 patients (85%) and 3 persons (15%), respectively.

Determination of the effect of azithromycin and pioglitazone against the background of standard therapy on the incidence of atherosclerotic processes in RCCA, LCCA and the external carotid artery (ECA) in CHD is presented in Table 1. It was found that in patients who are carriers of Asp (Asp / Asp) allele under the influence of azithromycin after 12 months, there is a significant decrease in the IMT in RCCA and LCCA as compared with the initial values ( $p = 0.04$ ;  $p = 0.01$ , respectively).

Table 1  
Ultrasonography parameters of the neck vessels in patients with coronary heart disease in the first and second study groups

Parameters	Prior to treatment	In 6 months	In 12 months	$p_1$	$p_2$	$p_3$	Prior to treatment	In 6 months	In 12 months	$p_4$	$p_5$	$p_6$
The first study group												
Genotype	Ala/Ala (n=14)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=6)					
Right common carotid artery: thickness of ASP, mm	1.43±0.45	0.88±0.21	0.77±0.2	0.1	0.08	0.2	0.77±0.31	0.48±0.19	0.33±0.23	0.07	0.03	0.2
IMT	1.08±0.06	1.04±0.04	1.01±0.04	0.3	0.04	0.1	1.05±0.06	1.0±0.06	0.95±0.03	0.07	0.04	0.2
Diameter of stenosis: 2 – 15 % 16-49%	3 6	3 6	3 5	1.0 1.0	1.0 0.43	1.0 0.43	0 3	2 1	1 1	0.45 0.54	1.0 0.54	1.0 1.0
Left common carotid artery: thickness of ASP, mm	0.74±0.27	0.59±0.19	0.39±0.15	0.4	0.1	0.06	0.27±0.27	0.22±0.22	0.15±0.15	0.4	0.4	0.4
TKIM	1.04±0.03	1.01±0.02	0.98±0.03	0.1	0.01	0.1	1.05±0.04	0.98±0.03	0.95±0.02	0.02	0.07	0.4
Diameter of stenosis: 2 – 15 % 16-49%	2 4	1 6	3 2	1.0 0.2	1.0 0.65	0.6 0.21	1 1	0 1	0 1	1.0 1.0	1.0 1.0	- 1.0
External carotid artery thickness of ASP, mm	0.21±0.21	0.07±0.07	0.07±0.07	0.3	0.3	-	0.18±0.13	0.05±0.05	0	0.2	0.2	0.4
The second study group												
Genotype	Ala/Ala (n=17)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=3)					
Right common carotid artery: thickness of ASP, mm	0.92±0.53	0.3±0.14	0.94±0.76	0.2	0.99	0.4	1.07±0.67	0.73±0.5	0.87±0.49	0.2	0.4	0.4
IMT	1.06±0.04	1.03±0.03	1.0±0.02	0.6	0.2	0.2	1.23±0.09±	1.16±0.03±	1.1±0.06±	0.4	0.2	0.4
Diameter of stenosis: 2 – 15 % 16-49%	1 5	0 4	2 2	1.0 1.0	1.0 0.4	0.5 0.65	1 1	1 1	1 1			
Left common carotid artery: thickness of ASP, mm	0.72±0.2	0.56±0.19	0.3±0.14	0.3	0.03	0.02	0.4±0.4	0.4±0.4	0.37±0.37	--	0.2	0.4
TKIM	1.07±0.04	1.04±0.03	1.0±0.02	0.4	0.054	0.02	1.23±0.09	1.16±0.03	1.1±0.06	0.4	0.2	0.4
Diameter of stenosis: 2 – 15 % 16-49%	0 8	5 3	2 2	0.04 0.14	0.5 0.057	0.4 1.0	- -	- -	- -			
External carotid artery thickness of ASP, mm	0.24±0.11	0.17±0.09	0.09±0.06	0.3	0.07	0.1	0.5±0.5	0.5±0.5	0.33±0.33	--	0.4	0.4

Note (here and in Tables 2-3):  $P_1$  – the comparison in the first study group prior to the beginning and after 6 months of treatment with azithromycin;

$P_2$  – the comparison in the first study group before and after 12 months of treatment with azithromycin;

$P_3$  – the comparison in the first study group after 6 months and after 12 months of treatment with azithromycin;

$P_4$  – the comparisons in the second study group before and after 6 months of treatment with pioglitazone;

$P_5$  – the comparison in the second study group before and after 12 months of treatment with pioglitazone ;

$P_6$  – the comparison in the second study group after 6 months and after 12 months of treatment with pioglitazone

Patients who are carriers of Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) allele under the influence of azithromycin after 6 months showed a significant decrease in IMT in LCCA as compared with initial indicators ( $p = 0.02$ ); after 12 months, there is a reliable decrease in ASP and IMT in RCCA as compared initial indicators ( $p = 0.03$ ;  $p = 0.04$ , respectively).

The patients who are carriers of Asp (Asp / Asp) allele, under the influence of pioglitazone after 12 months there is a reliable decrease in the size of ASP and the diameter of the stenosis in LCCA as compared with the initial values ( $p = 0.03$ ;  $p = 0.04$ ), as well in 12 months, a reliable decrease in the size of the ASP, the diameter of the stenosis and IMT in the LCCA is observed in comparison with the indicators after 6 months ( $p = 0.02$ ;  $p=0.057$ ;  $p = 0.02$ , respectively).

Patients who are carriers of Gly allele (Asp/Gly + Gly/Gly) under the influence of pioglitazone did not display any significant changes of the parameters in the treatment dynamics after 6 and 12 months.

Thus, intake of azithromycin and pioglitazone against the background of standard therapy during 12 months caused

more effective inhibition of atherosclerotic processes in the carotid vessels of the neck in carriers of Asp (Asp / Asp), Asp / Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) allele, by reducing the size of the ASP, stenosis diameter and IMT. However, azithromycin most strongly influenced the reduction of ASP thickness, while pioglitazone reduced the diameter of stenosis in carotid arteries in Asp (Asp / Asp) allele carriers, which may indicate a more pronounced effect of the first medication in the early stages of atherosclerosis, whereas the second drug – at somewhat later stages.

In determining the spectrum of parodontopathogenic microflora in the withdrawn content of periodontal pockets, after azithromycin administration in patients (Table 2), carriers of Asp (Asp / Asp) allele and Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) allele in 6 months, a tendency to decrease in the frequency of detection of almost all representatives, with the exception of *Treponema denticola*, was observed. However, in the first study group after 12 month, only two patients who are carriers of Gly allele (Asp / Gly + Gly / Gly) displayed a twofold increase in the percentage contents of *Porphyromonas gingivalis* from 33.3% to 66.7% ( $p = 0.3$ ).

Table 2  
The frequency dynamics of indicators of parodontopathogenic microflora in the contents extracted from periodontal pockets of patients with ischemic heart disease in the first and second study groups

Parameters	Prior to treatment	In 6 months	In 12 months	$p_1$	$p_2$	$p_3$	Prior to treatment	In 6 months	In 12 months	$p_4$	$p_5$	$p_6$
The first study group												
Genotype	Ala/Ala (n=14)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=6)					
Porphyromonas gingivalis	5 / 35.7%	3 / 21.4%	4 / 28.6%	0.34	0.5	0.5	5 / 83.3 %	2 / 33.3%	4 / 66.7%	0.12	0.5	0.3
Actinobacillus actinomycetemcomitans	2 / 14.3 %	0	0	0.2	0.2	-	1 / 16.7 %	0	0	0.5	0.5	-
Prevotella intermedia	1 / 7.14 %	0	0	0.5	0.5	-	-	-	-			
Bacteroides forsythus	1 / 7.14 %	0	0	0.5	0.5	-	-	-	-			
Treponema denticola	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
The second study group												
Genotype	Ala/Ala (n=17)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=3)					
Porphyromonas gingivalis	5 / 29.4%	5 / 29.4%	3 / 17.6%	0.65	0.34	0.34	1 / 33.3%	1 / 33.3%	3 / 100.0%	0.8	0.2	0.2
Actinobacillus actinomycetemcomitans	-	-	-				-	-	-			
Prevotella intermedia	-	-	-				-	-	-			
Bacteroides forsythus	-	-	-				-	-	-			
Treponema denticola	-	-	-				-	-	-			

After 6 weeks of taking pioglitazone, of Asp (Asp / Asp) alleles and Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) alleles did not display changes in the presence frequency of periodontal pathogenic microflora in the contents of periodontal pockets. However, in the second study group in 12 months, only in carriers of Gly allele (Asp / Gly + Gly / Gly), 3% increase in the percentage contents of *Porphyromonas gingivalis* was observed from 33.3% to 100.0% ( $p = 0.2$ ).

Consequently, only azithromycin, against the background of standard therapy for 6 months, exhibits an antibacterial effect predominantly in patients with coronary heart disease, Asp (Asp / Asp) allele carriers, unlike Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) allele carriers, due to partial or

complete eradication of parodontopathogenic microflora in the oral cavity.

The analysis of inflammation markers, carbohydrate and lipid metabolism (Table 3) showed that after 6 months, in patients with Asp allele (Asp / Asp) under the influence of azithromycin, there was a reliable decrease in cholesterol and HDL as compared to initial indicators ( $p = 0.04$ ;  $p = 0.04$ , respectively), after 12 months there is a reliable decrease in the level of ESR, glucose and LDL in comparison with initial indicators ( $p = 0.04$ ;  $p = 0.02$ ;  $p=0.04$ , respectively), as well as in 12 months there is a reliable decrease in the level of ESR and CA, increase in the level of HDL as compared with the indicators in 6 months ( $p = 0.04$ ;  $p = 0.0003$ ;  $p = 0.003$ , respectively).



Table 3

Parameters of laboratory examination depending on the polymorphism of TLR4 gene in the treatment of patients with coronary heart disease in the first and second study groups

Parameters	Prior to treatment	In 6 months	In 12 months	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>	Prior to treatment	In 6 months	In 12 months	p <sub>4</sub>	p <sub>5</sub>	p <sub>6</sub>
The first study group												
Genotype	Ala/Ala (n=14)						Ala/Gly + Gly/Gly (n=6)					
ESR, mm/h	16.14±4.34	9.07±1.02	7.57±0.86	0.08	0.04	0.04	14.0±5.01	9.33±1.2	6.83±0.8	0.28	0.18	0.053
hs-C-reactive protein, mg/l	5.33±1.69	3.26±0.85	6.57±1.53	0.27	0.58	0.09	5.22±2.58	3.65±0.85	4.27±1.6	0.58	0.77	0.5
TIMP-1, pg/ml	1713.8±115.3	1926.5±116.7		0.26			1559.9±190.4	2060±234.1		0.006		
Blood glucose, mmol/l	6.42±0.6	5.65±0.3	5.4±0.34	0.17	0.02	0.35	6.59±1.04	5.42±0.23	5.25±0.19	0.33	0.25	0.58
Oral glucose tolerance test, mmol/l	9.91±1.33	8.73±0.47		0.27			9.32±0.64	8.59±0.37		0.21		
Hyperglycemic coefficient	4.89±0.29	4.14±0.18	4.4±0.18	0.04	0.13	0.31	4.57±0.38	4.25±0.19	4.1±0.15	0.46	0.36	0.5
Cholesterol, mmol/l	0.82±0.14	0.79±0.12	0.89±0.09	0.62	0.49	0.27	0.63±0.06	0.65±0.07	0.77±0.09	0.8	0.06	0.3
Triglycerides, mmol/l	1.05±0.07	0.88±0.09	1.11±0.07	0.04	0.26	0.0003	0.8±0.07	0.99±0.12	1.09±0.2	0.16	0.11	0.46
HDL, mmol/l	3.52±0.28	2.9±0.2	2.9±0.16	0.07	0.04	0.9	3.49±0.39	2.96±0.18	2.66±0.16	0.13	0.08	0.21
LDL, mmol/l	0.35±0.06	0.36±0.05	0.41±0.05	0.92	0.27	0.27	0.27±0.03	0.29±0.03	0.35±0.04	0.55	0.02	0.3
VLDL, mmol/l	4.09±0.67	4.23±0.47	3.17±0.32	0.78	0.06	0.003	5.02±0.92	3.49±0.36	3.3±0.67	0.08	0.04	0.8
The second study group												
Leucocytes, x 10 <sup>9</sup> /l	6.46±0.3	6.56±0.3	6.6±0.2	0.7	0.6	0.9	6.27±0.77	7.45±0.35	5.08±0.22	0.35	0.35	0.03
ESR, mm/h	16.65±2.9	11.06±0.8	9.65±0.9	0.03	0.01	0.04	8.67±4.25	8.67±1.33	6.67±1.67	1	0.5	0.32
hs-C-reactive protein, mg/l	3.41±0.61	3.99±0.74	7.74±1.63	0.55	0.01	0.04	11.77±4.9	4.6±2.07	6.9±5.4	0.22	0.4	0.7
TIMP-1, pg/ml	1447±118.9	1549.2±97.4		0.5			1217±229.03	1920±203.3		0.007		
Blood glucose, mmol/l	6.02±0.15	6.06±0.26	5.49±0.25	0.91	0.09	0.07	5.9±0.03	5.5±0.5	5.03±0.25	0.49	0.09	0.6
Oral glucose tolerance test, mmol/l	12.45±0.69	9.52±0.53		0.0001			10.9±1.44	7.99±0.4		0.25		
Hyperglycemic coefficient	2.07±0.11	1.59±0.08		0.002			1.84±0.25	1.47±0.11		0.21		
Cholesterol, mmol/l	5.21±0.19	4.48±0.17	4.6±0.2	0.006	0.06	0.6	5.63±0.47	4.97±0.52	4.5±0.4	0.57	0.006	0.7
Triglycerides, mmol/l	0.72±0.09	0.72±0.05	0.92±0.09	1.0	0.12	0.02	0.53±0.09	0.7±0.06	0.87±0.09	0.04	0.06	0.13
HDL, mmol/l	0.86±0.06	1.06±0.04	1.12±0.07	0.01	0.002	0.4	0.72±0.06	0.85±0.1	1.03±0.1	0.52	0.18	0.16
LDL, mmol/l	4.03±0.2	3.1±0.16	3.06±0.17	0.001	0.004	0.87	4.69±0.4	3.8±0.4	3.07±0.5	0.4	0.009	0.5
VLDL, mmol/l	0.32±0.04	0.33±0.02	0.42±0.04	0.79	0.08	0.02	0.23±0.04	0.32±0.03	0.39±0.04	0.03	0.06	0.13
Atherogenicity coefficient	5.42±0.5	3.39±0.2	3.29±0.2	0.001	0.0006	0.77	6.83±0.32	4.94±0.48	3.5±0.74	0.14	0.051	0.26

In carriers of Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) allele, under the influence of azithromycin after 6 months, a significant increase in TIMP-1 (p = 0.006) was observed; after 12 months, a significant decrease in CA (p = 0.04), increase in VLDL (p = 0.02) as compared to initial indicators, were observed.

The analysis of effect of pioglitazone in patients with coronary heart disease showed that in carriers of Asp (Asp / Asp) allele under the influence of pioglitazone after 6 months there was a significant decrease in ESR levels (p = 0.03), OGTT (p = 0.0001), hypertension (p = 0.002), cholesterol (p = 0.006), LDL (p = 0.001) and CA (p = 0.001), increase in HDL (p = 0.01) as compared to initial indicators, after 12 months (P = 0.03), LDL (p = 0.004) and CA (p = 0.0006), an increase in the level of hs-CRP (p = 0.01) and HDL (p = 0.002) as compared with initial indicators, as well as in 12-month a reliable decrease in the level of ESR (p = 0.004), an increase in the level of hs-CRP (p = 0.04), triglycerides (p = 0.02) and VLDL (p=0.02) as compared to 6 months.

In carriers of Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) allele, under the influence of pioglitazone, in 6 months a significant increase in TIMP-1 (p = 0.007), triglycerides (p = 0.04), and VLDL (p = 0.03) was observed as compared to initial indicators; after 12 months there was a significant decrease in cholesterol levels (p = 0.006) and LDL (p=0.009) as compared to initial indicators; after 12 months, a significant reduction in leuko-

cyte levels (p = 0.03) as compared with indicators in 6 months was detected.

Thus, in patients with coronary heart disease, Asp (Asp / Asp) allele carriers, azithromycin had a more pronounced effect on inflammation and lipid metabolism rates, whereas pioglitazone influenced on indicators of inflammation and carbohydrate metabolism.

The obtained data suggest that as a result of treatment, both azithromycin and pioglitazone, used against the background of standard therapy, have common and separate mechanisms of influence on the course of coronary heart disease. The use of antibiotics, azithromycin, against the background of standard therapy for 6 months in carriers of Asp (Asp / Asp) allele led to a more effective inhibition of atherosclerosis by reducing the size of ASP, antibacterial effect, a more pronounced anti-inflammatory and satisfactory hypolipidemic effect than in Gly allele (Asp / Gly + Gly / Gly) carriers.

Treatment with thiazolidinedion and pioglitazone, against the background of standard therapy for 6 months in carriers of Asp (Asp / Asp) allele caused a more pronounced reduction of atherosclerosis by reducing the stenosis diameter, moderate anti-inflammatory and expressed hypoglycemic effect, as well as the hypolipidemic effect by preventing formation of atherogenic dyslipidemia than in carriers of Gly allele (Asp / Gly + Gly / Gly).

Analyzing the literary data, one can conclude that among modern therapeutic agents in CHD, macrolides, in particular azithromycin, have an effective anti-inflammatory effect, and thiazolidinediones, in particular, pioglitazone, exhibit alternative effects. This effect of both medications is implemented at the level of molecular mechanisms by suppressing the expression of the proinflammatory nuclear factor NF- $\kappa$ B [14, 16], which may form different clinical efficacy in the treatment with these drugs in patients with Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene.

The positive effect of azithromycin obtained over half a year against the background of standard therapy in patients with CHD, carriers of Asp (Asp / Asp) allele is probably due to the direct action on parodontopathogenic microorganisms in the inflammation site, namely, in the oral cavity and in the ASP [1]. Azithromycin stimulates phagocytosis, inhibits the production of active forms of oxygen, infiltration of leukocytes in the tissue [11], and also activates the activity of TIMP-1, which can prevent the initiation of instability and rupture of ASP [4].

Our study found positive effects of pioglitazone over a six-month period against the background of standard therapy in patients with CHD, carriers of Asp (Asp / Asp) allele, which was expressed in suppressing the atherosclerotic and inflammatory processes, insulin resistance and dyslipidemia in CHD patients. The mechanism of this effect is associated with blocking of proinflammatory NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms, which leads to a decrease in the level of CRP, adiponectin, MMP-9, monocyte-chemotactic protein (MCP-1) and soluble marker CD40L, which can contribute to the prevention of atherosclerosis and macrovascular complications in CHD [6]. It is known that the total impact of factors influenced by pioglitazone has a cardioprotective effect by improving the diastolic function of the left ventricle in patients with hypertension, glucose utilization by cardiomyocytes, increased blood flow, prevention of CA inflammation and coronary vasospasm, as well as minimizing ischemic-reperfusion myocardial damage [9, 10].

Our data showed that patients with CHD, carriers of Asp (Asp / Asp) allele, are more responsive to the conducted treatment, while the presence of Gly (Asp / Gly + Gly / Gly) mutant allele of TLR-4 gene was associated with a risk of reducing the effectiveness of therapy with the studied medications against the background of standard course of treatment, indicating at the pharmacogenetic peculiarities of responsiveness to the action of the studied medications which should be taken into account in clinical practice.

### Conclusions

1. Intake of azithromycin against the background of standard therapy for 6 months in carriers of Asp allele (Asp / Asp), in contrast to carriers of Gly allele (Asp / Gly + Gly / Gly) caused more effective inhibition of atherosclerotic processes by reducing the size of ASP, stenosis diameter and IMT, antibacterial effect is mainly due to partial or complete eradication of parodontopathogenic microflora in the oral cavity, more pronounced anti-inflammatory and satisfactory hypolipidemic effects.

2. Intake of pioglitazone against the background of standard therapy for 6 months in carriers of Asp allele (Asp / Asp), in contrast to carriers of Gly allele carriers (Asp / Gly + Gly / Gly) caused a more pronounced reduction in atherosclerosis by reducing the diameter stenosis, moderate anti-inflammatory and expressed hypoglycemic and hypolipidemic effects by preventing the formation of atherogenic dyslipidemia.

**Prospects for further research.** In our study, it has been shown for the first time that the efficacy of azithromycin and pioglitazone in the course of standard therapy

depends on the presence of Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene, which may have broad prospects for use in modern cardiology and therapy.

### References

1. Nepokupnaya-Slobodyanyuk T.S. Clinical efficacy of a prolonged course of azithromycin in chronic generalized periodontitis / T.S. Nepokupnaya-Slobodyanyuk, P.N. Skripnikov // Medical News of Georgia. – 2014. – No. 11 (236). – P. 27-31.
2. Skochko O.V. Quantitative analysis of some groups of microorganisms isolated from atherosclerotic coronary arteries of patients depending on the Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene / O.V. Skochko, I.P. Kaidashev, L.E. Vesnina [et al.] // Likarska sprava. – 2012. – No. 3-4 (1113). – P. 82-85.
3. Skochko O.V. The role of some parodontopathogenic microorganisms and Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene in the pathogenesis of atherosclerosis / O.V. Skochko, N.A. Bobrova, O.V. Izmailova, I.P. Kaidashev // Zhurn. mikrobiologii i epidemiologii. – 2011. – No. 5. – P. 83-85.
4. Amantea D. Azithromycin protects mice against ischemic stroke injury by promoting macrophage transition towards M2 phenotype / D.Amantea, M.Certo, F. Petrelli [et al.] // Exp. Neurol. – 2016. – Vol. 275 (Pt 1). – P. 116-125.
5. ChenR.TLR4Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis / R.Chen, N.Gu, Y.Gao, W.Cen // PeerJ. – 2015. – Vol. 3. – P. e1412.
6. Hanefeld M. Anti-inflammatory effects of Pioglitazone and/or Simvastatin in high cardiovascular risk patients with elevated high sensitivity C-Reactive Protein. The PIOSTAT Study / M. Hanefeld, N. Marx, A. Pftzner [et al.] // J. American College of Cardiology. – 2007. – Vol. 49 (3). – P. 290-297.
7. Kiechl S. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis / S.Kiechl, E. Lorenz, M. Reindl [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 347. – P. 185-192.
8. Levchenko L. Yu. TLR4 896A/G gene polymorphism, rather than the TLR4 1196C/T and TLR2 2258G/A gene polymorphisms, determines the severe and aggravated course of atopic dermatitis in children / L. Yu. Levchenko, O. V. Izmailova, O. A. Shlykova, I. P. Kaidashev // Cytology and Genetics. – 2013. – Vol. 47(3). – P. 167-173.
9. Morita S. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activator, suppresses coronary spasm / S. Morita, Y. Mizuno, E. Harada [et al.] // Coron. Artery Dis. – 2014. – Vol. 25(8). – P. 671-677.
10. Nitta Y. Pioglitazone decreases coronary artery inflammation in impaired glucose tolerance and diabetes mellitus: evaluation by FDG-PET/CT imaging / Y. Nitta, N. Tahara, A. Tahara [et al.] // JACC Cardiovasc. Imaging. – 2013. – Vol. 6(11). – P. 1172-1182.
11. Schneider C.A. In vivo uptake of azithromycin in human coronary plaques / C.A. Schneider, H. Diedrichs, K.D. [et al.] // Am. J. Cardiol. – 2000. – Vol. 86 (7). – P. 789-791.
12. Schneider S. Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with age-dependent systolic blood pressure increase in patients with coronary artery disease / S. Schneider, W. Koch, P. Hoppmannet [et al.] // Immunity Ageing. – 2015. – Vol. 12. – P. 1-4.
13. Skochko O.V. The relationship of periodontal disease to risk factors for the development of the ischemic heart disease / O.V. Skochko, T.V. Mamontova, L.E. Vesnina, I.P. Kaidashev // Ukrainian J. Cardiology. – 2015. – Vol. 2. – P. 87-94.
14. Stellari F.F. Azithromycin inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation during lung inflammation: an in vivo imaging study / F.F. Stellari, A. Sala, G. Donofrio [et al.] // Pharmacol Res Perspect. – 2014. – Vol. 2 (5). – P. e00058.
15. Wang W. TLR4 activation induces non-tolerant inflammatory response in endothelial cells / W. Wang, M. Deng, X. Liu [et al.] // J. Inflammation. – 2011. – Vol. 34(6). – P. 509-518.
16. Wei W.Y. Pioglitazone protected against cardiac hypertrophy via inhibiting AKT/GSK3 $\beta$  and MAPK signaling pathways / W.Y. Wei, Z.G. Ma, S.C. Xu [et al.] // PPAR Res. – 2016. – Vol. 2016. – P. 917-941.

Матеріал надійшов до редакції 26.10.2017

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Kolisnyk I.L., Rezenenko Yu.K., Boiagina O.D.

UDK [616. – 099 – 02 : 543.272.455] – 092.9 – 078 : 616.15 – 078 : 577.175.5.088.6

### MANIFESTATIONS OF ENDOGENIC INTOXICATION IN THE LIVER IN EXPERIMENT\*

Kolisnyk I.L., Rezenenko Yu.K.\*, Boiagina O.D.\*

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education (Ukraine)

\*Kharkiv National Medical University (Ukraine)

*The study was performed at the Department of Clinical Pathophysiology, Topographical Anatomy and Operative Surgery at Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education in the framework of the research project "Radiotoxins pathochemical mechanisms on the body and methods of early diagnostics and correction", state registration number 0117U000589.*

*We studied the effect of small doses of sub-toxic sodium fluoride on the activity of microsomal hepatocytes in 40 Wistar rats populations in the subacute experiment. Analysis of results suggests the disruption of reductase activity of hepatocyte microsomes in experimental animals subjected to seeding with aqueous solutions of sodium fluoride at doses of 1/10 and 1/100 LD<sub>50</sub>, and as a result, the functioning of the electron-transport systems. Detected changes, especially on the 60th and in some cases also on the 50th day of oral administration of sodium fluoride, were associated with the restructuring of lipid environment of microsomal reductases as a result of formation of a significant amount of reactive oxygen species (ROS). The observed decrease in the overall pool of cytochrome P-450 on the 50th and especially on the 60th day of administration of sodium fluoride can be observed as an indicator of its inactivation process. The effect of inhibition of cytochrome P-450 in conditions of prolonged exposure to sodium fluoride is a rather significant fact in terms of structural integration membranes. The level of cytochrome b5 was characterized by an opposite change – an increase by 50% on the 50th day and a decrease by 47% on the 60th day of FS action. Increased activity of NAD (P) H-cytochrome-c-reductase in rats with administered sodium fluoride for one month can be considered on the one hand as a protective compensatory response, and on the other – as the cause of a more rapid flow of electrons from the reduced form of NAD (P) H in cytochrome P-450 and b5 and significant formation of ROS.*

**Keywords:** active liver microsomes of hepatocytes, NAD (P) H-cytochrome-c-reductase, cytochrome P-450 and b5, sodium fluoride.

*На 40 щурах популяції Вістар досліджено в підгострому досліді дію малих субтоксичних доз фториду натрію на активність мікросом гепатоцитів. Аналіз одержаних результатів дозволяє стверджувати про порушення редуктазної активності мікросом гепатоцитів експериментальних тварин, підвернених затравці водними розчинами фториду натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>, і, як наслідок, функціонування електрон-транспортних систем. Виявлені зміни, особливо на 60-ту та у деяких випадках й на 50-ту добу перорального введення фториду натрію, пов'язані з перебудовою ліпідного оточення мікросомальних редуктаз внаслідок можливого, утворення значної кількості активних форм кисню (АФК). Виявлене зниження загального пулу цитохрому Р-450 на 50-ту та особливо на 60-ту добу введення фториду натрію можна розглядати як показник процесу його інактивації. Виявлений ефект інгібування цитохрому Р-450 за умов тривалої дії фториду натрію є досить суттєвим фактом з точки зору структурної інтеграції мембран. Для рівня цитохрому b5 була характерна різноспрямована динаміка змін – підвищення на 50 % на 50-ту добу і зниження на 47 % на 60-ту добу дії ФН. Підвищення активності НАД(Ф) Н-цитохром с редуктази у щурів при введенні фториду натрію протягом місяця можна розглядати з одного боку як захисно-компенсаторну реакцію, а з іншого – як причини більш швидкого потоку електронів від відновлених форм НАД(Ф)Н на цитохроми Р-450 і b5 та суттєвого утворення АФК.*

**Ключові слова:** активність мікросом гепатоцитів печінки, активності НАД(Ф) Н-цитохром с редуктази, рівень цитохромів Р-450 і b5, щури популяції Вістар, фторид натрію.

#### Introduction

Fluoride is an essential trace mineral for living organisms, but obviously in limited quantities. The main bio-

logical role of fluoride and its compounds are bone formation, formation of dentin, enamel, preventing the development of senile osteoporosis. Fluoride is involved in

\* To cite this English version: Kolisnyk I.L., Bagmut I.Yu., Titkova A.V., Rezenenko Yu.K., Boiagina O.D. Manifestations of endogenic intoxication in the liver in experiment. // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 43–45.

many biochemical processes as enzyme activator and inhibitor. In addition, high concentrations of fluoride stimulate lipid peroxidation and inhibit antioxidant defense system. It belongs to the elements of the first class of danger – especially hazardous chemicals. Prolonged excessive intake of fluoride compounds can cause the pathological condition of fluorosis. Despite the significant content of fluoride in different tissues of the human body, its physiological role so far has not been clarified. Excessive fluoride in drinking water and food causes the destruction of tooth enamel, inhibits carbohydrate, phosphorous-calcium metabolism, the activity of certain enzymes. As an inhibitor of many enzymes, fluoride can inhibit the synthesis of intracellular processes that weaken the body's immune protection and physiological processes can accelerate aging.

The purpose of this study is the examination of enzymatic activity of microsomes of hepatocytes during chronic fluoride intoxication.

### Materials and methods

Studies were conducted on mature rats of Wistar line weighing 180-220 g, which were kept in hospital vivarium. Rats were subjected to oral subjected seeding (n=30) using a probe aqueous solutions of sodium fluoride (FS) once daily for 60 days at doses of 1/10, 1/100 and 1/1000 LD<sub>50</sub>, which was under 20 mg/kg, 2 mg/kg and 0.2 mg/kg body weight (FS average lethal dose for rats received orally, is 200 mg / kg). The animals in the control group were injected with appropriate amounts of drinking water (n=10). Research registered indices on the 10th, 20th, 30th, 50th and 60 days after the beginning of the experiment. Each group included 10 animals (N=40). Rats were euthanized by decapitation with guillotine knife, pre-anesthetic with thiopental sodium 50 mg/kg. Subcellular fractions of rat liver were isolated by differential centrifugation. To separate the microsomal fraction, 18.000 g of supernatant were centrifuged for an hour, thus resulting precipitate was washed and suspended among the selection (protein in the microsomal suspension was 15-20 mg/ml).

The activity of NAD (P) H-cytochrome-c-reductase in the microsomal suspensions of rat liver was assessed in the presence of electron acceptor cytochrome-c, determining the change in absorption of electron acceptor in the transition from the oxidized form on the spectrophotometer «Specord UV VIS» at 30°S and wavelength 550 nm [1]. The enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of cytochrome-c, equal to 18.5·10<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>. The content of cytochrome P-450 in rat liver microsomal suspension was determined by spectrophotometer absorption values of the reduced form of the complex with carbon monoxide at 450 nm [1].

### Results and discussion

The constancy of internal environment under physiological conditions is supported primarily by detoxification and excretion – the liver and kidneys, and vital functions are implemented through specific biochemical relationships under the control of central nervous system. In case of exposure to foreign chemicals, when homeostatic organs fail to ensure their detoxification and elimination, normal cytotoxic effects and apathy of the body develop. The main organ that is exposed to foreign chemicals is the liver [2, 3]. The study of pathochemical mechanisms of sodium fluoride (FS) is considered appropriate to begin assessing the structural and metabolic status of the body.

Enzymatic rat liver microsomes condition was initially evaluated in terms of the activity of NAD (P) H-cytochrome-c-reductase in the dynamics of observation (the 10th, 20th, 30th, 50th, and 60th days) with administered FS to rats at doses of 1/10, 1/100 and 1/1000 LD<sub>50</sub>.

The results showed that on the 10th and 20th day of oral dose of FS at 1/10 LD<sub>50</sub> there was statistically significant ( $r \leq 0.002$ ) gradual increase in activity of NADPH-cytochrome-c-reductase, when compared to the controls, by 24 and 36% respectively. On the 30th day of observation, we detected a tendency to decrease in enzyme activity as compared with the previous values, but relatively to the control activity it remained significantly ( $p < 0.001$ ) increased by 29%. Since this time, the experiment revealed a statistically significant ( $p < 0.001$ ) reduction when compared with the control group of animals in the activity of NADPH-cytochrome-c-reductase by 20 and 30% respectively on the 50th and 60th day of FS action at a dose of 1/10 LD<sub>50</sub>.

FS oral administration at a dose 1/100 LD<sub>50</sub> caused significant ( $r \leq 0.004$ ), as when compared to control, increases in microsomal fraction of rat hepatocytes activity of NADPH-cytochrome-c-reductase by 6, 26 and 32%, respectively on the 10th, 20th and 30th day of the experiment. On the 50th day, there was a tendency to a significant reduction in enzyme activity (average 40%) as relative to the value on the 30th day, but as compared with controls there was a slight but statistically significant ( $p < 0.001$ ) increase rate by 19%. On the 60th day of action FS at 1/100 LD<sub>50</sub> dose, it was accompanied a decreased activity of NADPH-cytochrome-c-reductase by 20% in comparison with the control group of animals.

The impact of UNFPA in 1/1000 LD<sub>50</sub> dose did not cause statistically significant changes when compared with the control effect against NADPH-cytochrome-c-reductase on the 10th and 20th day of observation, but on the 30th, 50th and 60th day, there was a slight, but significant ( $p \leq 0.005$ ) increase in enzyme activity by an average of 4-6%. Microsomes in rats hepatocytes with FS oral administration at a dose of 1/10 LD<sub>50</sub> also led to an increase ( $p < 0.001$ ) as compared with the control group of animals in the activity of NADH-cytochrome-c-reductase by 10, 23, 31 and 20% respectively at the 10th, 20th, 30th and 50th day of the experiment. On the 60th day, it contributed to a statistically significant ( $p < 0.001$ ) decrease in enzyme activity by an average of 39%.

Action in FS 1/100 LD<sub>50</sub> dose was accompanied by a gradual increase ( $r \leq 0.038$ ) in the activity of microsomal NADH-cytochrome-c-reductase by 5, 11, 22 and 30%, respectively, in the 10th, 20th, 30th and 50th day of observation. On the 60th day, the indicator decreased relatively to the previous term experiment by an average of 38%, but in relation to the value of control – it remained increased ( $p < 0.001$ ) by 18%. UNFPA in action 1/1000 LD<sub>50</sub> practically did not cause changes in the rat microsomal activity of NADH-cytochrome-c-reductase when compared with the control group of animals; only on the 30th and 50th day there was a slight (by 4.5%), but statistically significant ( $p = 0.013$  and  $p = 0.045$ ) increase in enzyme activity.

Overall analysis of the results suggests the disruption of reductase activity microsomes of hepatocytes in experimental animals at FS toxification doses 1/10 and 1/100 LD<sub>50</sub>, and as a result, the functioning of the electron-transport systems. The detected changes, especially on the 60th and in some cases also on the 50th day of

FS oral administration are probably associated with the restructuring of the lipid environment of microsomal reductases, and as a result, according to the literature [4] initiating the formation of a significant amount of reactive oxygen species (ROS). Increased activity of NAD (P) H-cytochrome-c-reductase in rats with administered FS for a month can be considered on one hand as a protective compensatory response, and the other – as the cause of a more rapid flow of electrons from the reduced form of NAD (P) H in cytochrome P-450 and b5 and significant formation of ROS.

In connection with dynamic changes in the general pool of cytochrome P-450 and b5 in the microsomal fraction of hepatocytes, experimental animals were injected with doses of FS 1/10 and 1/100 LD<sub>50</sub> (dose 1/1000 LD<sub>50</sub> preliminary results are practically ineffective, allowing it not to consider) within 60 days. On 10th, 20th and 30th day of FS toxification of rats at a dose of 1/10 LD<sub>50</sub>, statistically significant (p<0.001) changes were observed relative to controls, increase in the overall pool of cytochrome P-450 respectively by 44, 74 and 23.

A similar but more pronounced dynamic change characteristic of the general pool of cytochrome b5 under the action of UNFPA in the doses of 60, 113 and 78% on the 50th and 60th day of observation was the level of cytochrome P-450 microsomes in rat hepatocytes when compared with the decreased control (p<0.001), respectively by 48 and 52%.

The level of cytochrome b5 in this observation period was characterized by an opposite change – an increase by 50% on the 50th day and a decrease by 47% on the 60th day of FS action.

Oral administration to rats in doses of FS 1/100 LD<sub>50</sub> contributed to a statistically significant (r≤0.001) increase in the content of cytochrome P-450 on the 50th day of the experiment (most pronounced on the 20th day – 40%) and cytochrome b5 and (the most pronounced on the 30th day – 112%). On the 60th day of observation in the level of cytochrome microsomal fraction of rat hepatocytes under conditions in steps UNFPA 1/100 LD<sub>50</sub> dose was significantly reduced by an average of 35-39% (p<0.001) when compared with controls.

The observed (mostly within 30 days) increase in the overall pool of cytochrome hepatocyte microsomes in experimental animals with administered FS can be seen as an adaptive response. However, it should be kept in mind that the oxidation of xenobiotics and endogenous substrates in hepatocytes monooxygenase system is an essential source for the formation of free radicals – lipid peroxidation initiators whose products increases with the activation system [5]. In turn, the deployment of lipid peroxidation process inevitably leads to the destruction of membrane endoplasmic reticulum [6], which may be accompanied by inactivation of cytochrome P-450 because of its conversion to an inactive form – cytochrome P-420 [7-12]. With this in mind, a reduction in the overall pool of cytochrome P-450 on the 50th and especially on the 60th day administration FN can be seen as an indicator of its inactivation process.

The effect of inhibition of cytochrome P-450 in conditions of prolonged exposure FS is a rather significant fact in terms of structural integration membranes. It should be noted that the activity of microsomal enzymes, including cytochrome P-450, essentially depends on the mem-

brane conformation and physicochemical properties of the lipid bilayer. Identified changes in their activity for UNFPA action may affect the detoxification capabilities of hepatocytes, the key role of which belongs to the cytochrome P-450.

Reduction of cytochrome b5 as well, according to the literature [8-12], is often associated with the initiation of lipid peroxidation in microsomal membranes of hepatocytes as a result of cytotoxic xenobiotics.

Analysis of the results can also assume the occurrence of disruption in different layers microsomal membranes due to inhibition of FN (especially on the 60th day of the experiment) cytochrome P-450, localized mainly in the hydrophobic zone, and cytochrome b5, localized in the outer hydrophilic zone [9-12].

**Conclusion.** In general, long-term oral administration of FN, especially at a dose of 1/10LD<sub>50</sub>, leads to disruption in detoxification function of microsomal membranes in rats' hepatocytes due to the gradual suppression of enzymes activity and reduction in biotransformation of xenobiotics as well as endogenous substrates.

### References

1. Orehovych V.N. Modern methods in biochemistry. M.: Medicine, 1977. 371 p.
2. Dubovaya A.V. Exogenic and endogenic intoxication. Functional detoxification system. Methods of active detoxification: Health of the child, 2011, № 5 (32): P. 79-86.
3. Lake B.G., Price R.J. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices: Xenobiotica, 2013, Vol. 43: P. 41-53.
4. Effects of single exposure of sodium fluoride on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in salivary glands of rats / P.M. Yamaguti, A. Simoes, D.N. Souza [et. al.] // Oxidat. Med. Cell Long Article, ID674593, 7 hages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/674593>
5. Anzenbacher P., Zanger U.M. Metabolism of drugs and other xenobiotics: Wiley-VCH, 2012. – 724 p.
6. Danielle K., Pelkonen O., Ahokas T. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation: Int. J. Biochem. Cell Biol., 2012, Vol. 4: P. 257-265.
7. Schlezinger J.J., White R.D., Stegeman J.J., Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As: Molecular Pharmacology, 1999, Vol. 56: P. 588-597.
8. Porter T.D. The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions: Biochem. Mol. Toxicol., 2002, Vol. 16, № 6: P. 311-316.
9. Danielle K., Pelkonen O. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation: Int. J. Biochem. Cell Biol., 2012, Vol. 44: P. 257-265.
10. Bagmut I. The impact on the state oligoesters microsomal monooxygenase system hepatocytes white rats in the experiment. Strategic question of Science, 2014: materials of international IX scientific conference. Polska, Przemysl: «Nauka and studia», 2014, V. 26: P. 41-45.
11. Bagmut I.Yu., Klimenko N.A., Zhukov V.I. Status of hydroxyl monooxygenase system hepatocytes under the influence of different doses of oligoesters. Education and science without borders – 2013: materials of international IX scientific conference. Polska, Przemysl: "Nauka and studia", 2013, V. 2: P. 62-67.
12. Klimenko M.O., Kucheryavchenko M.O., Bagmut I.Yu. Long subtoxic Laproxide influence on the metabolic activity of monooxygenase system of hepatocytes in subacute experiment. Problems of continuing medical education and research, 2014, 4 [16]: P. 57-60.

Матеріал надійшов до редакції 26.10.2017

© Popova T.M.  
УДК 616.69-092.9:574.2

## CRITICAL ASPECTS OF MALE RAT FERTILITY IN THE ASSESSMENT OF EXPOSURE TO LAPROL-604\*

Popova T.M.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

*The present experiment studied the sexual behavior, biochemical profile of the testes, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone levels of male rats have been administered by Laprol-604 for 60 days. The surfactants are one of the potentially harmful chemicals released in the environment. The potentially toxic effects of surfactants are presently being studied with increasing intensity. Laprol-604 is a non-ionic surfactant which is widely used an ingredient of manufacturing epoxide rubber, enamels, varnishes, plastic, fiber, glues, emulsifiers, etc. Laprol-604 has been shown to produce some adverse health effects. A study was conducted to assess the effects of Laprol-604 on the reproductive system and sexual behavior of thirty sexually naive male Wistar rats. The Laprol-604 was administered to rats orally at dose levels of 1/10, 1/100 and 1/1000 LD50 – 12.5g/kg, respectively is the 1-st; 2-nd and 3-rd group for 60 days (one cycle of spermatogenesis). Sexual behavior was evaluated in a procedure consisting of an open field, it in the context of one interaction to one estrus female rat. Prolonged oral administration of Laprol-604 led to disturbance in sexual behavior of male rats. Both the mount latency and intromission latency of male rat's 1-st, 2-nd and 3-rd groups was significantly lengthened compared to controls. In contrast, the numbers of mountings and intromissions was significantly reduced in Laprol-604 treatment groups compared to control animals. Study has been found that control male rats could ejaculate 1.3 times/hour by contrast with male rats of 1-st, 2-nd and 3-rd groups which did not ejaculate. The significant relationships between the sexual activity and testosterone levels were found. In comparison to the control rats, there were the significant reductions in the weight of testes, epididymis, seminal vesicle and ventral prostate. Testicular and epididymal sperm density was decreased in the animals, which were treated with Laprol-604. Biochemical profile of the testis revealed a significant decline in the contents of protein, testicular cholesterol and glycogen. At the same time, the activity of testicular acid phosphatase was significantly increased, but decreasing alkaline phosphatase activity was found. The level of testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone levels were significantly suppressed by Laprol-604. Results of this study clearly show that Laprol-604 induces the toxic impact on the male rats' reproductive system. The study found the relationship between the Laprol-604 administration effects on testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone levels and sexual behavior of adult male rats.*

**Key words:** Laprol-604, surfactant, male rats, testis, testosterone, sperm dynamics, reproductive toxic effects, sexual behavior, mount, intromission, ejaculation.

*У експерименті досліджували статеву поведінку, біохімічні показники яєчок, рівні фолікулоstimулюючого, лютеїнізуючого гормонів та тестостерону в сироватці крові самців щурів, яким вводили Лапрол-604 впродовж 60 днів. Поверхнево-активні речовини є потенційно небезпечними хімічними речовинами, що потрапляють у навколишнє середовище. В даний час активно вивчається токсичний вплив поверхнево-активних речовин на живі організми. Лапрол-604 є неіонною поверхнево-активною речовиною, яка широко використовується в якості інгредієнту для виготовлення епоксидних смол, емалей, лаків, пластику, волокна, клею, емульгаторів та ін. У дослідженні оцінювали вплив Лапролу-604 на репродуктивну систему і статеву поведінку тридцяти статево незайманих самців щурів лінії Wistar. Лапрол-604 вводили щурам перорально у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ЛД 50 - 12,5 г/кг, відповідно, 1-ій; 2-ій та 3-ій групі протягом 60 днів (один цикл сперматогенезу). Статеву поведінку оцінювали за допомогою модернізованого відкритого поля, в контексті взаємодії з однією самицею-еструс. Тривале пероральне введення Лапролу-604 призвело до порушення статевої поведінки самців щурів. Як тривалість ссадок, так і тривалість інтромісії у щурів 1-ої, 2-ої та 3-ої груп були значно довшими в порівнянні з контролем. Навпаки, кількість ссадок та інтромісій вірогідно зменшилися в даних експериментальних групах в порівнянні з контрольними тваринами. Самці контрольної групи здійснювали еякуляцію 1,3 рази /год, тоді як щури 1-ої, 2-ої та 3-ої груп не еякулювали. Виявили взаємозв'язок між статевою активністю і рівнем тестостерону у самців усіх груп. Тварини, які вживали Лапрол-604 мали вірогідно меншу вагу яєчок, придатків яєчок, сім'яних пухирців та передміхурових залоз, щільність сперми у порівнянні з контрольними щурами. При біохімічному дослідженні яєчок щурів виявили значне зниження вмісту білка, холестерину і глікогену. У той же час активність кислої фосфатази вірогідно збільшилася, але активність лужної фосфатази вірогідно зменшилася. Рівень тестостерону, лютеїнізуючого і фолікулоstimулюючого гормонів у сироватці крові щурів 1-ої, 2-ої та 3-ої груп вірогідно нижчий в порівнянні з контролем. Результати дослідження свідчать, що Лапрол-604 токсично діє на репродуктивну систему самців щурів, існує зв'язок між рівнем тестостерону, лютеїнізуючого та фолікулоstimулюючого гормонів та статевою поведінкою дорослих самців щурів.*

**Ключові слова:** Лапрол-604, поверхнево-активна речовина, самці щурів, яєчка, тестостерон, сперма, репродуктивний токсичний ефект, статева поведінка, ссадка, інтромісія, еякуляція.

\* To cite this English version: T.M. Popova. Critical aspects of male rat fertility in the assessment of exposure to Laprol-604. // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 46–50.

## Introduction

A great variety of surfactants are currently used and their usage is increasing. They are used in both industry and home, so there are many occupations and home activities in which humans can be exposed to them. According to the water-soluble properties, the term «surfactants» includes two general groups: ionic surfactants and nonionic surfactants [17]. Laprol-604 is included in to numerous non-ionic surfactants [18]. Laprol-604 has been produced industrially for several decades for use primarily as ingredients of manufacturing epoxide resin, enamels, varnishes, plastic, fiber, glues, emulsifiers etc. [19]. Nonionic surfactants have been most intensively studied from a toxicological standpoint [7; 9; 10; 18]. The toxicity of Laprol-604 has been studied and the findings showed that Laprol-604 was a moderately toxic substance. Exposure to Laprol-604 throughout of gestational period showed the adverse effect on pregnant rats and their progenies, such as decreasing of body weight of rat newborns, diminished number of live pups and the viability of the progeny during the first ten days after birth, delayed developmental progress. Maternal toxicity of Laprol-604, indicated by deficits in weight gain and liver enlargement, is associated with biochemical disturbances in pregnant rats [1; 12].

Nowadays, the effects of nonionic surfactants on sexual hormone levels of female rats are known and impact of Laprol-604 on female reproductive system of rats has been found. Nevertheless, until quite recently, to our knowledge no one has previously described male hormonal levels and sexual behavior across studies of non-inorganic polyols and the influence of Laprol-604 on male reproductive system. The present experiment has focused mainly on the sexual behavior, fertility, testicular biochemistry and serum hormonal levels of male rats have been administered by Laprol-604 for 60 days.

## Materials and methods

Laprol-604 was obtained from Science and Production Joint Stock Company "Sintez PAV" (Shebekino, Russian). Laprol-604 was reported to be 96% pure by the supplier. For all studies, Laprol-604 was diluted in deionized water and prepared fresh daily.

Forty healthy and fertile adult male Wistar rats were 100 days old. They had  $180 \pm 200$ g body weight at study start. Males were randomly divided into four groups (10 animals in each group). Laprol-604 was administered to male rats once daily by gavage at doses of 1/10, 1/100 and 1/1000 LD<sub>50</sub> (median lethal dose) – 12.5g/kg, respectively is the 1-st; 2-nd and 3-rd group for 60 days (one cycle of spermatogenesis). The 4-th group (controls) consisted of 10 intact animals without Laprol-604 administration. Animals were maintained at a room temperature (20-22°C) and relative humidity (50-60%) and kept under a 14 hours light/ 10 hours dark cycle. Pelleted diets were presented to the rats in wide mouthed jars with lids and fresh water was provided ad-libitum throughout the study.

Male rats were clinical observed twice daily during the study as an assessment of their general health and effect of Laprol-604 administration. They have been weighed weekly to see any change in the body weight. All the procedures were performed at Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, according to Ukrainian and International guidelines for the use of animals in research (Law of Ukraine of 21.02.2006 № 3447-IV «On protection

of animals from cruelty» // Supreme Council of Ukraine and European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 18.03.1986.

At the end of Laprol-604 administration, each male from each group was tested for sexual behavior. All sex testing took place during the rats' dark cycle (13:00-15:00) in the soundproof room and under dim red lighting. The test environment was open field (100 cm square) divided by sheets to create the four individual chambers, which were linked in the center. The chambers had open tops. Pelleted diets were presented in the first chamber; fresh water was provided in the second chamber; plastic house was in the third chamber. All male rats did not have a sexual experience. The male rat was taken into the test room, placed in the fourth chamber and allowed to adapt to the test environment for 20 minutes. Then an intact estrous adult female was placed into the center of test environment with each male. Female was left with male for one hour, during which time the experimenter recorded mount latency (ML), intromission latency (IL), ejaculatory latency (EL), number of mountings, number of intromissions and number of ejaculations. Mount latency was time from exposure to a female to the first mount (with or without intromission). Intromission latency was time from exposure to a female rat to the first intromission (with or without ejaculation). Ejaculatory latency was time interval between the intromission and ejaculation. Male sexual behavior was assessed during one hour; rats were observed by a single experimenter, blind to conditions, who recorded all behavior. Between trials, the test environment was thoroughly cleaned with 70% ethanol and the bedding was replaced. Each male rat interacted with only one female rat.

According to the aim of study, at the end of the experiment, the male rats were weighed, euthanized under light or anesthesia. Trunk blood was obtained by decapitation. Serum samples were prepared and stored at – 20°C. To determine serum level of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testosterone in male rats was used standard ELISA technique. The male rat reproductive organs were removed, weighed on electronic balance and processed for detailed sperm dynamical, biochemical and hormonal studies. The total number of sperms was assayed by the method of V.P. Mamina and Y. Ban, in a male rat suspension of homogenized testes [2; 6]. The spermatozoa from the tubules of cauda epididymis were released into physiological saline (0.9% NaCl). The motile and immotile sperms were counted in ten separate and randomly selected fields. The results were represented such as percent motility.

The data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's multiple comparison test  $p < 0.05$  was considered significant. For all values, the means  $\pm$  standard error mean (SEM) was calculated.

## Results and discussion

After administration of Laprol-604 the sexual behavior of male rats was studied. The following Laprol-604 effects on male sexual behavior were demonstrated in the table 1

Table 1  
The influence of Laprol-604 on sexual behavior of male rats ( $M \pm SEM$ )

Parameters	Groups of animals			
	Control group (n=10)	First group 1/10 LD50 (n=10)	Second group 1/100 LD50 (n=10)	Third group 1/1000 LD50 (n=10)
Mount latency (sec)	131.17 $\pm$ 29.56	480.0 $\pm$ 49.20 *	315.4 $\pm$ 27.50*	287.6 $\pm$ 35.12*
Number of mounts	12.1 $\pm$ 1.6	3.1 $\pm$ 0.2 *	4.4 $\pm$ 0.6*	7.5 $\pm$ 0.8*
Intromission latency (sec)	142.3 $\pm$ 27.79	488.0 $\pm$ 36.40	329.5 $\pm$ 31.70*	286.3 $\pm$ 32.80
Number of intromissions	13.2 $\pm$ 1.4	3.8 $\pm$ 0.3*	5.1 $\pm$ 0.2*	8.2 $\pm$ 0.6
Ejaculatory latency (sec)	389.5 $\pm$ 29.66	-	-	-
Number of ejaculations	1.3 $\pm$ 0.06	0	0	0

Note. \* Significant differences ( $p < 0.05$ ) from control values.

All control male rats showed sexual activity in the presence of estrous female. The sexual behavior of control male rats consisted of pre-sexual performances, copulation and ultimate ejaculation. In contrast to controls, male rats exposed to Laprol-604 exhibited the incomplete sexual behavior. The following changes in the sexual behavior of male rats treated with Laprol-604 were discovered: the mount latency of males 1-st, 2-nd and 3-rd groups was significantly lengthened by 3.7, 2.4 and 2.2 times, respectively, compared to controls. The number of mountings was significantly reduced by 3.9, 2.8 and 1.6 times in male rats of 1-st, 2-nd and 3-rd groups compared to control animals. Similarly the number of male rat's intromissions were also significantly decreased by 3.5, 2.6 and 1.6 times in the relevant groups compared to control male rats. Intromission latency of male rats 1-st, 2-nd and 3-rd groups was by 3.4, 2.3 and in 2.0 times significantly higher than data of controls. It should be noted, estrous females were provided to male rats treated by Laprol-604, but all of them failed to copulate.

Male rats in all Laprol-604 treatment groups exhibited lower levels of receptivity to the estrous females. The mount latency and intromission latency were differed from control and depended on dose of polyol (Table 1). A more severe disruption of behavioral masculinization occurred when dose of Laprol-604 was 1/10 and 1/100 of LD50. Both of the mount latency and intromission latency were significantly lengthened, by contrast, the numbers of mountings and intromissions were reduced and ejaculations were absent in animals 1-st, 2-nd, and 3-rd groups. The analysis examining mount latency and intromission latency across the Laprol-604 treatment

groups showed that they were longer in 1-st and 2-nd groups than 3-rd group.

Both serum luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) levels were comparable between control group and Laprol-604 treated groups, assessed after 60 days of treatment. The results of this study demonstrated that 10 (100%) control male rats had normal endocrine pattern against 30 (100%) male rats of 1-st, 2-nd and 3-rd groups which had an endocrinopathy. There was statistically lower level of FSH which was 1.11 $\pm$ 0.08 IU/ml, 1.74  $\pm$  0.13 IU/ml, 2.06 $\pm$ 0.25 IU/ml in male rats of 1-st, 2-nd and 3-rd groups, respectively, than 4.98  $\pm$  0.19 IU/ml in control male rats. The luteinizing hormone (LH) mean blood level was 1.83 $\pm$ 0.09 IU/ml, 2.21 $\pm$ 0.16 IU/ml and 2.89 $\pm$ 0.15 IU/ml in male rats of 1-st, 2-nd and 3-rd groups, respectively, that was significant difference compared with mean control value 5.05 $\pm$ 0.16 IU/ml. Significantly altered level of serum testosterone has been found in male rats of the 1-st, 2-nd and 3-rd groups (0.91  $\pm$  0.04 IU/ml, 1.21 $\pm$ 0.12 IU/ml and 1.53 $\pm$ 0.18 IU/ml, respectively) compared with control animals (2.07 $\pm$ 0.16 IU/ml). The disturbance of sexual behavior may be related to decrease of serum testosterone level in Laprol-604 treatment male rats which needs further analyses.

This study attempted to relate the Laprol-604 treatment effects with testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone levels that are known to influence on the process of sexual behavior.

The biochemical changes in the rat testes obtained after oral administration of Laprol-604 have been shown in the table 2.

Table 2  
Biochemical changes in the rat testes after exposure to Laprol-604 ( $M \pm SEM$ )

Parameters	Groups of animals			
	Control group (n=10)	First group 1/10 LD50 (n=10)	Second group 1/100 LD50 (n=10)	Third group 1/1000 LD50 (n=10)
Cholesterol (mg/g)	6.92 $\pm$ 0.41	4.50 $\pm$ 0.19*	5.20 $\pm$ 0.18*	5.96 $\pm$ 0.25
Protein (mg/g)	261.50 $\pm$ 8.20	118.68 $\pm$ 2.55*	173.84 $\pm$ 5.36*	204.99 $\pm$ 6.81
Glycogen (mg/g)	3.10 $\pm$ 0.12	1.38 $\pm$ 0.06**	1.95 $\pm$ 0.01*	2.67 $\pm$ 0.08
Acid phosphatases (units)	5.59 $\pm$ 0.28	11.38 $\pm$ 0.66*	9.80 $\pm$ 0.27*	6.78 $\pm$ 0.30
Alkaline phosphatase (units)	61.15 $\pm$ 4.26	38.74 $\pm$ 5.31*	45.33 $\pm$ 4.29*	52.71 $\pm$ 5.34

Note. \* Significant differences ( $p < 0.05$ ) from control values.

Biochemical profile of the testes revealed a significant decline in the contents of protein, testicular cholesterol

and glycogen in male rats of 1-st and 2-nd groups compared with control animals. At the same time, the activity



of testicular acid phosphatase was significantly increased in 2,0 and 1,8 times, but decreasing alkaline phosphatase activity in 1,6 and 1,4 times was found in 1-st and 2-nd groups, respectively, compared with control group.

The changes of reproductive organ weights of male rats obtained after oral administration of Laprol-604 have been shown in the table 3.

Table 3  
Body and reproductive organ weights of male rats after Laprol-604 administration (M± SEM)

Parameters	Groups of animals			
	Control group (n=10)	First group 1/10 LD50 (n=10)	Second group 1/100 LD50 (n=10)	Third group 1/1000 LD50 (n=10)
Body weight (g)	387.83 ± 12.79	266.45±11.26*	295.24 ± 14.46	338.17 ± 10.08
Testis weight (g)	1.87 ± 0.05	0.96 ± 0.08*	1.16 ± 0.04*	1.56 ± 0.08
Epididymis weight (g)	0.61 ± 0.02	0.45 ± 0.04*	0.49 ± 0.02*	0.51 ± 0.04
Seminal vesicle (g)	1.33 ± 0.08	0.63 ± 0.09*	0.96 ± 0.04	1.17 ± 0.05
Ventral prostate (g)	0.67 ± 0.03	0.39 ± 0.03*	0.47 ± 0.01*	0.53 ± 0.02

Note. \* Significant differences (p<0.05) from control values.

Body weights of male rats as well as weights of reproductive organs have been diminished by Laprol-604 treatment. Administration of Laprol-604 to male rats has been resulted in reproductive toxicity. Laprol-604 showed

dosage dependent reproductive toxicity influence on adult male rats.

The fertility parameters of male rats obtained after oral administration of Laprol-604 are shown in table 4.

Table 4  
Sperm density in testes, cauda epididymis and sperm motility in cauda epididymis after Laprol-604 administration

Parameters	Groups of animals			
	Control group (n=10)	First group 1/10 LD50 (n=10)	Second group 1/100 LD50 (n=10)	Third group 1/1000 LD50 (n=10)
Testis (million/ml)	5.8 ± 0.17	2.3 ± 0.19*	3.5 ± 0.16*	4.8 ± 0.16
Cauda epididymis (million/ml)	21.7 ± 1.15	11.8 ± 1.13*	14.9 ± 1.18*	17.8 ± 1.16
Sperm motility in cauda epididymis (%)	81.3 ± 4.8	35.3 ± 3.79*	56.4 ± 4.46*	71.4 ± 4.66

Note. \* Significant differences (p<0.05) from control values.

The weight of testis is largely dependent on the mass of differentiated spermatogenic cells and the reduction in the weight of testis may be due to reduced tubule size, decreased number of germ cells and elongated spermatids. It is known that the sperm motility has been affected by altered enzymatic activities of oxidative phosphorylation. The normal spermatozoa movement depends on the amount of ATP as well as testosterone level. Testosterone is the principal androgen of the testes and it is essential for sperm production and maintenance [16]. So, the depression of ATP and testosterone amount leads to mortality of sperm which may cause infertility [3]. A direct correlation between testosterone and spermatozoa motility that has been reported [18]. Exposure of Laprol-604 also changes the biochemical parameters of the testes like other surfactants [19]. A decrease in testicular cholesterol, protein and glycogen levels may be due to interference in testosterone synthesis, spermatogenesis and glycogenolysis. Since glycogen is an energy source for general metabolism and constant supply of glucose is essential for proper functioning of testes. Similarly decreasing in testicular cholesterol content may be due to androgen production. The increase in acid phosphates activity may be the result of labialization of lysosomal system [4]. The reduction in serum testosterone demonstrates the inhibitory influence of non-ionic surfactants on the secretion of pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in turn on the testosterone biosynthesis [13]. Laprol-604 treatment caused a significant (p < 0.05) decrease in both serum levels of LH and FSH compared to the control group.

### Results and discussion

Sexual behavior in male rats is regulated by the hypothalamic-pituitary-testicular axis. Gonadotropin releasing

hormone produced by hypothalamus triggers the luteinizing hormone released by adenohypophysis. The luteinizing hormone in turn stimulates the release of testosterone from the testes [8]. Testosterone and its metabolites initiate male sexual behavior by acting on key brain regions [11]. Reducing male testosterone levels after the course of Laprol-604 prolonged exposure to male rats have been found. The effect of Laprol-604 on testosterone levels of adult male rats was dose dependent. The long-term process of stem cells transformation into spermatozoa was disturbed by Laprol-604. Treatment with Laprol-604 changed the biochemical and morphometric parameters of the reproductive tract like other nonionic surfactants [13; 18; 19]. The male rats exposed by Laprol-604 illustrated a decrease in attempted mountings and intromissions. There was also a drop in serum testosterone leveled off lower than was observed for control males. The significant relationships between the amount of sexual behavior and testosterone levels were found that has not been reported previously. The very low levels of sexual behavior of male rats of 1-st and 2-nd groups suggest that impact of Laprol-604 to cause a drop in serum testosterone level. Both fertility and sex behavioral parameters showed distinct dose-dependence of the effects of prolonged Laprol-604 exposure.

The testosterone levels were reduced in males of 1-st, 2-nd groups after exposure them to Laprol-604. The testosterone level was higher in male rats of control group than in males of 1-st, 2-nd groups (p<0.05). The results of study provide evidence of a relationship between the amount of sexual activity and level of testosterone. Additionally, the lowest testosterone level was found in animal of the 1-st group treated the highest dose of Laprol-604 that is evidenced to nonionic polyols research by Zhukov V.S. et al. (2000), which indicated that

rodents had a decrease in testosterone levels depending on the polyol dose [18;19].

Thus, our most important finding was that attenuated sexual interactions with estrous female in adult male rats were caused by prolonged Laprol-604 treatment and there is explanation for this effect. The lower levels of sexual activity (absent ejaculations and reduced number of intromissions) among males that administered Laprol-604 compared to control male rats corresponded to a significant decrease of testosterone, luteinizing hormone and follicle stimulating level. This result is supported by some past studies with rodents [13, 19]. An explanation is that testosterone can increase the sexual activity and an increase in neurogenesis [14, 15]. However, the polyol effects on sexual activity cannot fully explain our results.

### Conclusion

1. Altered masculinization was seen in males of 1-st, 2-nd and 3-rd groups, despite the presence of estrous female. The male rats of the 1-st and 2-nd groups with severely attenuated sexual behavior had the low testosterone level.

2. Prolonged administration of laprol-604 to male rats altered the release of pituitary follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, led to reduction of testosterone production, changes the biochemical parameters of testes, epididymis and as a result the reduction of sperm production in the testes.

3. The findings showed the progressive morphometrical and biochemical alterations caused by various doses of Laprol-604 which have direct suppressing effect on the male rat reproductive function.

4. The study results highlight the direct relationship of dose to morphometrical and biochemical alterations.

5. The experiment has demonstrated the changes in sexual behavior of male rats that were paralleled by impaired fertility performance.

### References

1. Bagmut I.Yu., Popova T.M., Titkova A.V., Boiagina O.D., Kryzhna S.I. (2017) The influence of laprol-604 on the level of thyroid hormones and postnatal development in rats' pups // BioScience Issue, 12(2)Volume 67 P. 1539-1547.
2. Ban Y., Komatsu T., Kemi M. et al. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. // Exp. Anim. – 1995. – Vol. 44, № 4. – P. 315-322.
3. Bedford J.M (1983) Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals // Biol. Report., 28, P. 108-120.
4. Fuse H, Okumura M, Kazama T, Katayama T. (1993) Comparison of resazurin test results with various sperm parameters // Andrologia. 25(3) P.153-157.
5. Hull EM, Dominguez JM. *Sexual behavior in male rodents.* // Horm Behav. – 2007.- Vol. 52(1).- P. 45-55.
6. Mamina V.P, Semenov DI The method of determination of the number of sperm cells of the testis. // Cytology. 1976. T.18, №7. P.913-914.
7. Lara-Martin PA, Gomez-Parra A, and Gonzalez-Mazo E (2008) Sources, transport and reactivity of anionic and non-ionic surfactants in several aquatic ecosystems in SW Spain: a comparative study. Environmental Pollution 156 (1): 36–45.
8. Nyby JG. Reflexive testosterone release: A model system for studying the nongenomic effects of testosterone upon male behavior. // Front Neuroendocrinol.- 2008.- Vol.29 (2).- P. 199–210.
9. Olkowska E, Ruman M, Kowalska A and Polkowska Z (2013) Determination of surfactants in environmental samples. Part III. Non-ionic compounds. Ecological Chemistry and Engineering S 20 (3): 449–461.
10. Petrovic M, Fernández-Alba AR, Borrull F et al (2002) Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. Environmental Toxicology and Chemistry 21(1): 37–46.
11. Phillips-Farfan B.V., Fernandez-Guasti A. Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. Neurosci Biobehav Rev. – 2009 Vol. 33. P.- 442–455
12. Popova T.M., Bagmut I.Yu., Titkova A.V., Rezenenko Yu.K., Marakushyn D.I. (2017) The evaluations of exposure to Laprol-604 during pregnancy in Wistar rats. / Medical Teacher Issue 12(2) Volume 39 P.1408-1417.
13. Rezenenko Yu, Zhukov V, Kucheriavchenko M et al (2015) The effect of Laproxide L-303 on some hormonal exchange indices in prolonged toxication of white rats J Clin Exp Med Res 3(1): 44-50 [in Russian]
14. Schank JC. Oestrous and birth synchrony in norway rats, rattus norvegicus. // Anim Behav.- 2001.- Vol. 62.- P. 409–415
15. Shulman LM, Spritzer MD. Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. Physiol Behav.- 2014.- Vol.- 133.-P. 8 -13.
16. Yan LJ, Hua W, Ping L, Qun WX, Feng Z, Xiu HM,T, Heng Z, Cheng Z, Zying Z, De- Xiang X. Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. // Reproductive Toxicology. – 2010. – Vol. 29.– P. 176-183.
17. Yuan C L, Xu Z Z, Fan M X et al (2014) Study on characteristics and harm of surfactants // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6(7): 2233-2237.
18. Zhukov V., Telegin V., Zaytseva O. et al, Toxicologic and hygienic characteristics of P-373-2-20; P-5003-AC; P-294-2-35 polyols an prognosis of their potential danger to environment: Science Research, 2013, 1(2): P. 31-34.
19. Zhukov VI (2000) Environmentally-hygienically description of superficially-active substances as contaminants of reservoirs. Kharkov Tornado: 180 [in Russian].

Матеріал надійшов до редакції 25.10.2017

© Yelins'ka A.M., Shvaykovs'ka O.O., Kostenko V.O.  
UDC (616.314.17+616.316)599.323.4:577.128

## SOURCES OF PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES IN TISSUES OF PERIODONTIUM AND SALIVARY GLANDS OF RATS UNDER MODELED SYSTEMIC INFLAMMATION\*

Yelins'ka A.M., Shvaykovs'ka O.O., Kostenko V.O.

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

*The purpose of the work was to reveal the sources of production of reactive oxygen and nitrogen species in the tissues of periodontium and salivary glands of rats under conditions of experimental systemic inflammation. The study was carried out on 20 white male rats of the Wistar line weighing 180-220 g, divided into 2 groups: the 1<sup>st</sup> included intact animals, the 2<sup>nd</sup> was made up of the animals with induced systemic inflammation. Systemic inflammation was induced by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide Salmonella typhi (Pyrogenalum) in a dose that stimulated rise in temperature by 1.5 °C according to the scheme: during the first week, 4 minimum pyrogenic doses (MPD) of 0.4 µg/kg of rat mass were administered 3 times a week. During the following seven weeks of the experiment, rats were given 4 MPD / kg of body weight once a week. The research was guided by the principles of biomedical ethics. The animals were decapitated with ethereal anesthesia. Soft tissues of periodontium and submandibular salivary glands were the objects of the study. It has been found out that systemic inflammation is accompanied by an increase in the production of superoxide anion radical in periodontium tissues and salivary glands by mitochondrial and NADPH-dependent electron transport chains of microsomes and NO synthase as well as by leukocyte NADPH oxidase. We have revealed interfering with the mechanism of autoregulation of the physiological NO concentration in the tissues of periodontium and submandibular salivary glands that leads to simultaneous increase in NO formation through the NO-synthase and nitrate / nitrite reductase mechanisms, resulting in the development of oxidative-nitrosative stress with rising peroxynitrite concentration. We have also found out NOS uncoupling in the tissues of periodontium and salivary glands that is an additional source of superoxide anion radical as a leading factor in oxidative-nitrosative stress.*

**Keywords:** reactive oxygen and nitrogen, periodontium, salivary glands, systemic inflammation

*Метою роботи було з'ясування джерел продукції активних форм кисню та нітрогену в тканинах пародонта та слинних залоз щурів за умов експериментального системного запалення. Дослідження були проведені на 20 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, розподілених на 2 групи: 1-ша – інтактні тварини, 2-га – після відтворення системної запальної відповіді. Системне запалення відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення ліпополісахариду Salmonella typhi («Пірогенал») у дозі, яка сприяла у щурів підвищенню температури на 1,5°C, за схемою: протягом першого тижня вводили по 4 мінімальні пірогенні дози (MPD), що складає 0,4 мкг, на 1 кг маси щура 3 рази на тиждень. Протягом наступних семи тижнів експерименту щурам вводили по 4 MPD/кг маси 1 раз на тиждень. При проведенні дослідження керувалися принципами біомедичної етики. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Об'єктами дослідження були м'які тканини пародонта та тканини піднижньощелепних слинних залоз. Виявлено, що відтворення системного запалення супроводжується збільшенням продукції супероксидного аніон-радикала у тканинах пародонта та слинних залоз мітохондріальним і NADPH-залежними електронно-транспортними ланцюгами мікросом і NO-синтази, а також NADPH-оксидазою лейкоцитів. Виявлено порушення механізму авторегуляції фізіологічної концентрації NO у тканинах пародонта та піднижньощелепних слинних залоз, що призводить до одночасного збільшення утворення NO через NO-синтазний та нітрат- / нітрит-редуктазний механізм, наслідком чого є розвиток окисно-нітрозативного стресу зі збільшенням концентрації пероксинітриду. Виявлено порушення спряження NOS у тканинах пародонта та слинних залоз, що є додатковим джерелом супероксидного аніон-радикала як провідного чинника окисно-нітрозативного стресу.*

**Ключові слова:** активні форми кисню і азоту, пародонт, слинні залози, системне запалення

### Introduction

The development of inflammatory diseases of periodontium and salivary glands (SG) is associated with the action of both local and general factors. The local ones include biological (by-products of microorganisms and metabolic wastes), mechanical, physical and chemical damaging factors. Quite often a number of literary reports overestimate the role of local factors in the development of the pathology of the organs mentioned above [12]. These damaging impacts occur under the conditions of trophism and tissue re-

sistance deterioration that arise in the presence of systemic disorders in the body: neurogenic, cardiovascular, endocrine, and metabolic (obesity, metabolic syndrome) disorders. Thus, structural failure and dysfunction of periodontium and SG can result from a series of somatic diseases, the development of which includes systemic inflammation (SI) as a link of pathogenesis [1, 15].

Hence, the development of severe inflammatory diseases of periodontium and SG is determined not only with the direct damage to periodontal tissues by a pathogenic agent, but can also result from the dysregulatory

\* To cite this English version: Yelins'ka A.M., Shvaykovs'ka O.O., Kostenko V.O. Sources of production of reactive oxygen and nitrogen species in tissues of periodontium and salivary glands of rats under modeled systemic inflammation // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 51-54.

effect caused by other altered integrative systems, in particular those associated with triggering SI. It is supposed that the main link in the pathogenesis of this process is the permanent activation of certain transcription factors (in particular, the nuclear factor  $\kappa$ B - NF- $\kappa$ B [6, 14]. The consequence is the expression of genes of inflammatory cytokines, inducible NO synthase (NOS), metalloproteinases, cellular adhesion molecules, cyclooxygenase-2, etc., capable of inducing oxidative-nitrosative stress [17]. On the one hand, the latter is associated with an increase in hyperproduction of superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ) by various sources, such as mitochondria [4], cytochrome P-450-associated NADPH-dependent microsomal system [5], NOS by itself, which contains NADPH-dependent electron transport chain, under the conditions of so-called uncoupling in the functioning of enzyme under the deficiency of its substrate (L-arginine) or certain cofactors (tetrahydrobiopterin) [10], as well as NADPH-oxidase of phagocytes associated with the function of cytochrome  $b_{558}$  [3]. On the other hand, oxidative-nitrogen stress develops under the excess formation of the nitric oxide (NO) by NOS and nitrite reductase, and the generation of reactive nitrogen species (for example, peroxyxynitrite) [8, 11].

However, mechanisms of the development of metabolic disorders in the periodontium and SG tissues under the conditions of SI are still insufficiently studied. The solution of this issue will contribute to the improvement of approaches and measures aimed at the prevention and treatment of inflammatory and dystrophic diseases of these organs against the progression of SI.

The purpose of the work was to reveal the sources of production of reactive oxygen and nitrogen species in the tissues of periodontium and salivary glands of rats under conditions of experimental SI.

**Materials and methods**

The study was carried out on 20 white male rats of the Wistar line weighing 180-220 g, divided into 2 groups: the 1<sup>st</sup> included intact animals, the 2<sup>nd</sup> was made up of the animals with induced SI. SI was induced by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS) *Salmonella typhi* (pyrogenalum, "Medgamal", Russia) in a dose that stimulated rise in temperature by 1.5°C according to the scheme (modified by [13]): during the first week, 4 minimum pyrogenic doses (MPD) of 0.4  $\mu$ g/kg of rat mass were administered 3 times a week. During the following seven weeks of the experiment, rats were given 4 MPD / kg of body weight once a week.

The research was guided by the principles of biomedical ethics. The animals were decapitated with etheral anesthesia. Soft tissues of periodontium and submandibular SG were the objects of the study.

The formation of  $\text{O}_2^-$  was evaluated by a test with nitro blue tetrazolium with using spectrophotometry ("Ulab") of the tissue homogenate with the following inductors: NADH was used for the evaluation of  $\text{O}_2^-$  production by the mitochondrial electron transport chain, NADPH was used to evaluate  $\text{O}_2^-$  production by endoplasmic reticulum and NOS, and LPS (pyrogenalum) was used to assess  $\text{O}_2^-$  production by leukocyte NADPH oxidase [9].

The activity of NOS was determined by the difference in the concentration of nitrite ions before and after the incubation of homogenate into the medium containing arginine (NO-synthase substrate) and NADPH. The concentration of nitrite ions was assessed by the formation of diazo-compounds in the reaction with sulfanilic acid, and then we carried out the reaction with  $\alpha$ -naphthylethylenediamine, resulting in the production of red color derivatives (azo dyes) [2]. The activity of nitrate reductase (NAR), nitrite reductase (NIR) and concentration of peroxyxynitrite ions (NOOH) in the homogenate were evaluated spectrophotometrically [2].

The NOS coupling index was calculated as the ratio between the NOS activity and the  $\text{O}_2^-$  generation rate by the NADPH-dependent electron transport chain.

The findings obtained were statistically processed. To verify the normality distribution, the calculation of the Shapiro-Wilk criterion was applied. If they corresponded to the normal distribution, then the Student's t-test was used to compare independent samples. When the results ranges were not subject to normal distribution, statistical processing was performed using a nonparametric method, the Mann-Whitney test. Statistical calculations were performed using the "StatisticSoft 6.0" program.

**Results and discussion**

SI simulation led to significant changes in the  $\text{O}_2^-$  production in the tissues of periodontium and SG (Table 1). Thus, the non-stimulated  $\text{O}_2^-$  generation increased by 40.8% ( $p < 0.01$ ) and 37.9% ( $p < 0.01$ ) respectively. The  $\text{O}_2^-$  production by NADPH-dependent electron transport chains (microsomal and NOS) increased by 38.3% ( $p < 0.01$ ) and 41.7% ( $p < 0.01$ ), while by the respiratory chain of mitochondria increased by 40.5% ( $p < 0.01$ ) and 37.6% ( $p < 0.01$ ).

Table 1  
Effect of inductors on the production of superoxide anion radical in tissues of periodontium and SG under modeled SI, nmol / g • s (M + m, n = 20)

Groups of the animals studied	Periodontium				Salivary glands			
	Non-stimulated production	NADPH	NADH	LPS	Non-stimulated production	NADPH	NADH	LPS
Intact animals	1.20±0.09	12.47±0.87	15.41±1.08	1.58±0.12	1.40±0.08	14.65±0.72	18.69±1.02	1.92±0.13
Animals with SI	1.69±0.07 *	17.25±0.66 *	21.65±1.01*	2.10±0.09 *	1.93±0.11 *	20.76±1.01 *	25.72±1.10 *	3.28±0.32 *

Note: Here and throughout: \* –  $P < 0,05$  compared with values of intact rats.

Generation of  $\text{O}_2^-$  by leukocyte NADPH oxidase also increased by 32.9% ( $p < 0.01$ ) and 70.8% ( $p < 0.01$ ) respectively.

According to the literature, the largest amount of  $\text{O}_2^-$  is produced by the mitochondrial electron transport chain as a result of the one-electron reduction of oxygen at the

level of the following complexes: NADH – ubiquinone oxidoreductase, ubiquinol – cytochrome c oxidoreductase and cytochrome b-c<sub>1</sub> [4]. This process is accelerated by activating NF- $\kappa$ B [17] and formation of NOOH- in the tissues [7, 16].

At the same time, a powerful level of  $\cdot\text{O}_2^-$  production under the conditions of SI is provided by NADPH-dependent electron transport chains: in the reactions of microsomal oxidation (with cytochrome P-450) [5] and by NOS itself, which is capable of switching from NO to  $\cdot\text{O}_2^-$  under unfavorable conditions [10]. When the bacterial LPS are introduced into the mammalian body, the  $\cdot\text{O}_2^-$  generation by leukocyte NADPH oxidase naturally increases [3]. In addition to LPS, proinflammatory cyto-

kines the synthesis of which depends on the activation of NF- $\kappa$ B [6, 17] are also known as effective stimulants of  $\cdot\text{O}_2^-$  synthesis.

Under SI conditions, the NOS activity in the periodontium and SG tissues (Table 2) increased by 2.5 times ( $p < 0.001$ ) and by 1.9 times ( $p < 0.001$ ), respectively. This can be explained by the ability of LPS to provide NF- $\kappa$ B-dependent activation of inducible NOS [17].

Table 2  
Markers of the formation of reactive nitrogen species in the tissues of periodontium and SG under modeled SI (M + m, n = 20)

Groups of the animals studied	Periodontium				Salivary glands			
	NOS, $\mu\text{mol} (\text{N}\cdot\text{O}_2^-) / \text{min} \cdot \text{g}$ of protein	NAR, $\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{g}$ of protein	NIR, $\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{g}$ of protein	NOOH $\cdot$ , $\mu\text{mol} / \text{g}$	NOS, $\mu\text{mol} (\text{N}\cdot\text{O}_2^-) / \text{min} \cdot \text{g}$ of protein	NAR, $\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{g}$ of protein	NIR, $\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{g}$ of protein	NOOH $\cdot$ , $\mu\text{mol} / \text{g}$
Intact animals	4.20 $\pm$ 0.22	11.98 $\pm$ 0.88	3.43 $\pm$ 0.25	0.83 $\pm$ 0.04	7.27 $\pm$ 0.52	32.23 $\pm$ 2.42	7.20 $\pm$ 0.66	0.99 $\pm$ 0.07
Animals with SI	10.32 $\pm$ 0.50	16.33 $\pm$ 0.74 *	4.61 $\pm$ 0.39 *	1.08 $\pm$ 0.05 *	13.56 $\pm$ 0.86	43.23 $\pm$ 3.64 *	9.96 $\pm$ 0.82 *	2.56 $\pm$ 0.43

At the same time, the activity of NAR grew by 36.3% ( $p < 0.01$ ) and 34.1% ( $p < 0.05$ ), while the activity of nitrite NIR increased by 34.4% ( $p < 0.05$ ) and 38.3% ( $p < 0.05$ ), respectively. These enzymatic pathways of the formation of nitrite ions and NO become activated in the tissues, mainly under hypoxia. Activation of these enzymes against increased NO formation by NOS indicates the disturbances in the mechanism of autoregulation of the physiological NO concentration in tissues [8]. An increase in the formation of reactive nitrogen species has been found out to a logical consequence of these processes: NOOH $\cdot$  content increased in the periodontium and SG tissues by 30.1% ( $p < 0.01$ ) and 2.6 times ( $p < 0.01$ ), respectively.

The SI modeling was accompanied by a decrease in the NOS coupling index. This index characterizes the presence of substrates (L-arginine,  $\text{O}_2$ ) and co-factor for the NO formation tetrahydrobiopterin, but not for  $\cdot\text{O}_2^-$ , in the oxidative metabolism of L-arginine. That is, under SI, there are conditions favorable for generating  $\cdot\text{O}_2^-$  by NOS.

Moreover, the unpaired NOS by itself not only becomes a powerful generator of  $\cdot\text{O}_2^-$ , but simultaneously activates other mentioned sources of its formation, thus forming a kind of closed circle of mutual reinforcement of oxidative stress and NOS uncoupling.

### Conclusions

1. Simulating of systemic inflammation is accompanied by an increase in the production of superoxide anion radical in periodontal tissues and submandibular salivary glands of rats by mitochondrial and NADPH-dependent microsomal electron transport chains and NO synthase, as well as leukocyte NADPH oxidase.

2. Modeling of systemic inflammation causes impairments in the mechanism of autoregulation of the physiological NO concentration in the tissues of the periodontium and submandibular salivary glands that is manifested by the simultaneous increase in the NO formation through NO-synthase and nitrate / nitrite reductase mechanism. This results in the development of oxidative-nitrosative stress with increasing peroxy-nitrite concentration.

3. Under the conditions of experimental systemic inflammation, NOS uncoupling has been revealed in periodontal tissues and submandibular salivary glands of rats that is regarded as an additional source of superoxide

anion radical as the main factor of oxidative-nitrosative stress.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Viktoriia Kostenko (Department of Foreign Languages, Latin Language and Medical Terminology) for her support in translating this article into English.

### References

1. Afanasiev V.V. The state of salivary glands in the patients presenting with metabolic syndrome / V.V. Afanasiev, R.I. Stryuk, S.E. Arutyunyan [et al.] // Ross. stomatol. zhurn. – 2011. – № 3. – S. 17-19. [Russian].
2. Akimov O Ye., Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride / O.Ye. Akimov, V.O. Kostenko // Ukr Biochem J. – 2016. – V.88, №6. – P. 70-75.
3. Cachat J. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity / J. Cachat, C. Deffert [et al.] // Clin Sci (Lond). – 2015. – V. 128, №10. – P. 635-648.
4. Dröse S. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain / S. Dröse, U. Brandt // Adv Exp Med Biol. – 2012. – V. 748. – P. 145-169.
5. Im S.C. The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) / S.C. Im, L. Waskell // Arch Biochem Biophys. – 2011. – V. 507, № 1. – P. 144-153.
6. Kaidashev I.P. NF- $\kappa$ B-signaling as a basis for systemic inflammation, insulin resistance, lipotoxicity, diabetes mellitus type 2 and atherosclerosis / I.P. Kaidashev // Mezhdunar. Endokr. Zh. – 2011. – T. 3, №35. – S. 35-38 [Russian].
7. Kostenko V.A. NO- and peroxy-nitrite-dependent changes in superoxide anion-radical production in rats' organs under modeled metabolic syndrome / V.A. Kostenko, A.N. Yelinskaya, L.I. Liashenko [et al.] // Zhurn. Grodnenskogo gos. med. un-ta. - 2014. - №2. - C. 74-77. [Russian].
8. Kostenko V.O. Mechanisms of nitric oxide autoregulation in mammals and their disturbances in pathologic processes / V.O. Kostenko, N.V. Solov'eva, A.V. Kovalenko [et al.] // Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visn. Ukrayins'koyi med. stomatol. akademiyi. – 2011. – T.11, №3. – S. 150-134. [Ukrainian].
9. Kostenko V.O. Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material / V.O. Kostenko, O.I. Tsebrzhins'kii // Fiziol Zh. – 2000. – T. 46, №5. – S. 56-62. [Ukrainian].
10. Luo S. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. / S. Luo, H. Lei, H. Qin, Y. Xia // Curr Pharm Des. – 2014. – V.20, №22. – P. 3548-3553.

11. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology / Louis J. Ignarro, Bruce Freeman (eds.) – [3rd ed.]. – Academic Press, 2017. – 434 p.
12. Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations / J.A. Regezi, J.J. Sciubba, R.C.K. Jordan. – Elsevier Health Sciences, 2016. – 496 p.
13. Pat. 14222 Ukraine, IPC G09B 23/28. Method for simulating insulin resistance / Tretiak I.V., Ambroskina V.V., Kriachok T.A., Talaieva T.V., Larionov O.P.; № u 200509354; appl. 04.10.2005, publ. 15.05.2006. Bull. No. 5. [Ukrainian].
14. Rasin M.S. The role of nuclear transcription factors in modern syntropy internal pathology (review) / M.S. Rasin, I.P. Kaidashev // // Ukr. Med. Chasop.. - 2014. - № 1 (99). - S. 17-21. [Russian].
15. Silva N. Host response mechanisms in periodontal diseases: review / N. Silva, L. Abusleme, D. Bravo [et al.] // J. Appl. Oral. Sci. – 2015. – V.23, №3. – P. 329-355.
16. Szabó S. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // Nature Reviews. – 2007. – V. 6. – P. 662-680.
17. Tornatore L. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation / L. Tornatore, A.K. Thotakura, J. Bennett [et al.] // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22, № 11. – P. 557-566.

*Матеріал надійшов до редакції 26.10.2017*

## СОЦІАЛЬНІ АСПЕКТИ

© Lysanets Yu., Morokhovets H., Ostrovska L., Purdenko T.  
UDC 378.147.227

### METHODOLOGICAL FEASIBILITY OF TEST TECHNOLOGIES IN ASSESSING MEDICAL STUDENTS' PROFICIENCY\*

Lysanets Yu., Morokhovets H., Ostrovska L., Purdenko T.

Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava, Ukraine

*The paper is focused on the issues associated with implementation of test assessment methods in the educational process of higher medical educational institutions. The objective of the research is to develop the cycle of test assignments and provide methodological recommendations for their integration in higher medical education. The article examines the advantages of using test methods as compared to the traditional ones for assessment of learning outcomes at higher medical educational institutions (the minimum time expense for performance and checking the results; the possibility of checking the quality of mastering knowledge in both theoretical and practical material; diversification of the learning process). It has been shown that such methods promote the cognitive activity of students and help in shaping the professional competence of future doctors. The authors have justified the methodological algorithm for the suggested system of tasks. The proposed cycle of test tasks is aimed at improving the knowledge, skills and abilities of medical students. Targeted and methodically thought-out work with test assignments at higher medical educational institutions is one of the effective ways of forming the competence of future specialists in the field of medicine and healthcare. The prospects for study consist in further in-depth research of the potential of test methodology in assessing the learning outcomes of medical students.*

**Key words:** test, test control, assessment, learning outcomes, methodology.

*У статті обґрунтовано доцільність впровадження методик тестового контролю у навчальний процес вищих медичних навчальних закладів. Мета дослідження – розробка циклу тестових завдань та надання методичних рекомендацій щодо їх реалізації у вищій медичній освіті. Розглянуто переваги застосування тестових методик у порівнянні з традиційними технологіями контролю результатів навчання у вищих медичних навчальних закладах (мінімальні витрати часу на виконання та перевірку результатів; можливість перевірки якості засвоєння знань як теоретичного, так і практичного матеріалу; диверсифікація навчального процесу). Авторами запропоновано методологічний алгоритм впровадження технології тестового контролю. Розроблений цикл тестових завдань спрямований на вдосконалення знань, умінь і навичок студентів-медиків, розвиток пізнавальної активності та формування професійної компетентності майбутніх лікарів. Методично продумана робота з тестовими завданнями з урахуванням потреб цільової аудиторії у вищих медичних навчальних закладах є одним з ефективних способів формування компетенції майбутніх фахівців у галузі медицини та охорони здоров'я. Перспективи дослідження полягають у подальшому поглибленому дослідженні потенціалу методології тестування при оцінці результатів навчання студентів-медиків.*

**Ключові слова:** тест, тестовий контроль, оцінювання, результати навчання, методологія.

Since 2005, Ukraine has joined the Bologna Process, which anticipated significant transformations in the national education system. The first requirement for higher education today is orientation towards the development of an individual who is capable of solving professional issues and socio-economic problems in their interrelationship. Accordingly, gradual changes in the national system of higher education are observed. An important step on this path should be the introduction of qualitatively new approaches to assessing students' proficiency.

The educational process at higher medical educational institutions today largely shifts the emphasis on student's self-directed study. Monitoring and evaluation of students' knowledge is an important problem in the theory and methodology of teaching and one of the main parts of the learning process. The assessment should meet certain requirements and must be objective, systematic, educational, diagnostic, formative, managerial, developmental, evaluative, comprehensive, as well as covering all parts of the educational process and promoting its de-

---

\* To cite this English version: Lysanets Yu., Morokhovets H., Ostrovska L., Purdenko T. Methodological feasibility of test technologies in assessing medical students' proficiency. // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2017. - Vol 21, № 3-4. - P. 55–58.

velopment and improvement. Over time, the forms and methods of assessing the students' proficiency change, but their aim remains the same – namely, the objective verification of the level of acquired knowledge, stimulation of systematic self-directed work and cognitive activity of students, evaluation of the effectiveness of self-directed and individual work of students, their ability to work with educational, reference, methodical literature. In this context, of particular importance are methods for assessment of learning outcomes, and thus the issues of using and developing the test methods of control are relevant.

The aim of the research is to provide theoretical substantiation for feasibility of test assignments, to determine their methodological peculiarities in the setting of higher medical educational institutions, and to develop the relevant guidelines for the implementation of test control techniques in higher medical education. We will provide the system of test tasks, focused on assessing the students' level of mastering the training material and substantiate the didactic purposes of each suggested test task.

The methodology for assessment of learning outcomes has already been extensively studied [1; 4; 5; 6; 8; 10]. It should be noted that traditional methods for proficiency assessment are sometimes rather out-of-date, since they are often subjective and do not involve the reconstructive and creative levels of mastering the knowledge. Current and periodic types of assessment are very important and teachers often encounter difficulties associated with their implementation. Most often, difficulties arise due to the following features of teaching work:

- impossibility of assessing the comprehensiveness of mastering the material in large groups of students (checking only by formal criteria);
- teacher's workload with routine checking of students' papers, development of didactic materials during a short period of time;
- possible bias of the teacher;
- mismatching requirements of different teachers to assess students' knowledge;
- distorted credibility of proficiency assessment due to students' cheating.

Traditional check-up of learning outcomes stimulates academic activity of students, but does not fully satisfy with professional and scientific needs, required by the modern society. It is necessary to point out that assessment of students' learning outcomes in higher medical and pharmaceutical education is particularly important, since medical errors can harm the human life and health. Consequently, it is necessary to introduce a system for monitoring with maximum objectivity and possibility of measuring the assessment using the qualitative and quantitative indicators. In recent years, test techniques have become widespread, as one of the forms of assessing the learning outcomes. A test is a standardized, often time limited assignment, intended to measure the respondents' knowledge and abilities [2]. The test tasks are based on special training material, which has undergone the experimental validation and contributes to the objective assessment of the level of the acquired knowledge.

When preparing the test tasks, it is important to keep in mind that test results should be reliable and unambiguous. Moreover, it is necessary to bear in mind that test methodology for assessing proficiency is a complex process that involves the preparation of didactic material, taking into account the psychological characteristics of

students, its analysis and unification. When compiling the test tasks, it is necessary to take into account the following aspects:

- a test should not target only advanced students or non-achievers;
- the teacher should not influence the assessment results;
- the number of tasks in the test block should be proportional to the share of the topic in section;
- a test should not be overloaded with secondary terms and statements;
- test tasks should not focus on mechanical memorizing (accurate reproduction of the structure of the material from the textbook), etc.

The effectiveness of test methods for assessing students' knowledge also depends on the compliance with psychological and pedagogical requirements for their application: it is necessary to implement the test techniques gradually, maintain organizational clarity in conducting test assessment (determining the time to complete the task, adequate explaining the test tasks, providing each student with a standard response form), and provide the compulsory analysis of test results.

Taking into account the given methodological recommendations and features of the curriculum, the teacher must adequately select the form of test tasks. In the setting of higher medical educational institutions, where the priority task is the formation of professional competence [3; 7], we consider it appropriate to use the following types of test tasks:

- open test tasks with multiple choices;
- test assignments for identifying the correspondences;
- test assignments for matching parts;
- test assignments for completion of statements;
- tasks for contrasting or comparing;
- task for reproduction of the correct sequence;
- tasks for reconstitution of parts;
- alternative response (closed test tasks);
- creative tasks which require additional self-directed study of the training material.

In higher medical education, it is recommended to use open and closed forms of test tasks [8]. The closed form of test tasks involves the selection of one or more variants of the answer from several proposed ones. Such tasks make it possible to use time economically in class, to demonstrate the skills of logical mastering the training material, to achieve the unification of requirements to knowledge control. Blocks of such test tasks can be presented in different ways. It is justified to use test questions with four variants of answer [2]. Each task should start with a clear statement of the question. Next, it is necessary to form a complete correct answer and present it along with the unnecessary ones. It is advisable to use the closed-form test tasks, since they involve the reproduction of training material according to the principles of classification, cycling, cumulation; test tasks that involve the reproduction of the correct sequence of statements, establishment of causal relationship between phenomena, comparison or contrast.

Testing is both a training exercise and a means of control. The use of test tasks as a means of training is effective and justifiable from the point of view of didactics and psychology. The restricted time limit for testing procedure and availability of standard answers streamline the learning process, whereas the focus on active mental



activity and objectivity of the results create a positive attitude towards the subject which is being studied.

Nowadays, test methods for proficiency assessment are constantly changing and improving, blank testing is replaced by computers. An important methodological issue is the choice of adequate methods for test assessment of students' knowledge at medical universities.

In the process of developing professionally-oriented test tasks that ensure the level of professional knowledge of students, it is necessary to pay attention to the tasks that enable to assess the students' ability to use knowledge in practice, taking into account the interdisciplinary and cross-curriculum connections, the level of self-sufficiency in acquiring the knowledge. The examples of such tasks are as follows:

- formative assessment closed test tasks (simple multiple choice);
- retrospective tasks aimed at the practical mastering of educational material;
- original tasks for causal dependence, the conformity of parts, the reproduction of the correct sequence of parts;
- constructive tasks, which consist in adding several variants with one's own responses, which involves the self-directed processing of additional information by students;
- initiative tasks;
- task with a pre-included error or unnecessary information;
- graphic tasks that make it possible to classify the previous material and identify the skills of analysis and generalization in students.

The suggested test tasks allow to form a clear multi-level system of rating control and thus intensify the cognitive activity of students. Such tasks are feasible in terms of information technologies (computer testing), as well as traditional methods (blank testing).

The system of test tasks can be easily integrated with modern technologies (the *Test W-2* diagnostic system). It has a user-friendly interface available and allows to control and assess the knowledge both during lessons and in the process of retaking the missed classes. This system is time-saving and it eliminated the possibility of cheating on a test [9; 11].

The *Test-W2* test editor is actively used by teachers to assess students' proficiency. Among its advantages, it is also possible to distinguish the following:

- identifying the individual testing parameters (number of questions, testing time, etc.);
- the use the assessment scale with 2, 5, 6, 9 or 12 points;
- testing with diagnostics (in the process of testing, the correct and incorrect answers are indicated);
- protection of tests and testing protocol from unauthorized actions;
- operation in the local computer network.

In developing the test tasks, the following requirements should be taken into account: unambiguity, standardization, short duration, validity and convenience for check-up.

Further recommendations for developing the test tasks are:

- the wording of the question part in the task should be accurate, concise, unambiguous and understandable;
- the form of statement of test tasks should not change within one block of assignments;

- if a response involves a certain calculation procedure, then it should be simple and should not require the use of technical devices;

- test assignments are accompanied by one instruction to perform, which changes in case of changing the form of the test;

- the instructions, the question part of the test and the answer options should differ in font and color for better visualization.

At the same time, it should be noted that test assessment of proficiency (both blank and computer versions) does not provide sufficient communicative interaction between a student and a teacher, and therefore it sometimes may be subjective. Therefore, tests should not be the only method in the teacher's didactical arsenal and should not completely replace the communication-based assessment techniques. In other words, a reasonable combination of different assessment methods is essential.

Thus, targeted and methodically thought-out work with test assignments at higher medical educational institutions is one of the effective ways of forming the competence of future specialists in the field of medicine and healthcare. The testing method is recognized globally as a reliable and objective one. Its advantages are as follows: relative ease of implementation; the minimum expenses of training time and teacher's time to check the papers (testing is also referred to as "the express method"); the possibility of checking the quality of mastering the knowledge in both theoretical and practical material; diversification of the learning process as such; promoting the computerization processes of the learning process. Adequately selected forms of test tasks and appropriate didactic material can significantly reduce the time for proficiency assessment, and help the teacher to update the training course. The prospects for study consist in further in-depth research of the potential of test methodology in assessing the learning outcomes of medical students.

## References

1. Agapov V.Yu. Algorithms of goal-setting in modern pedagogical technologies / V.Yu. Agapov, L.M. Mishakova. – Ryazan, 1994. – 33 p.
2. Bieliaieva O.M. On the issue of classification of exercises in domestic and foreign linguodidactics (review article) / O.M. Bieliaieva, Yu.V. Lysanets // Aspects of foreign languages study and linguodidactic bases of teaching: Collection of scientific works. – Poltava, 2017. – Vol. 17. – P. 6-15.
3. Bieliaieva O.M. Competency-based medical education: Implementation and development at undergraduate level / O.M. Bieliaieva, Yu.V. Lysanets, I.V. Znamenska, O.O. Pisotska, I.H. Romanko // Topical issues of quality of medical education: proceedings of scientific and practical conference with international participation (May 12-13, 2016, Ternopil): in 2 Vol. – Ternopil : I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, 2016. – T. 1. – P. 331-332.
4. Chelyshkova M.B. Theory and practice of constructing the training tests: Textbook / M.B. Chelyshkova. – Moscow : Logos, 2002. – 432 p.
5. Guzeev V.V. Organizational forms of study and lessons / V.V. Guzeev // Physics at school. – 2002. – No. 4 – p. 22-28.
6. Means and technologies of a unified information educational space: Collection of academic papers / Ed. V.Yu. Vikova, Yu.O. Zhuk. – K. : Atika, 2004. – 240 p.
7. Morokhovets H.Yu. Developing the professional competence of future doctors in the instructional setting of higher medical educational institutions / H.Yu. Morokhovets, Yu.V. Lysanets // Wiadomości Lekarskie. – 2017. – 70(1). – P. 101-104.

8. Morokhovets H.Yu. Methodological bases of test control of students' knowledge / H.Yu. Morokhovets, Yu.V. Lysanets // Innovative technologies in the organization of the students' self-directed work at medical educational institutions: proceedings of educational and scientific conference with international participation (Poltava, March 23, 2017). – Poltava : "Ukrainian Medical Stomatological Academy", 2017. – P. 102-103.
9. Rak B. Information resources and technologies in education / B. Rak // Visnyk Lviv. un. Series: Pedagogical sciences. – 2001. – No.15. – P. 201-205.
10. Stryzh A.A. Communicative competence of medical students as an object of test control / A.A. Stryzh, Yu.V. Lysanets // Achievements and prospects for implementation of the credit-module system in organization of the educational process at higher medical (pharmaceutical) educational institutions of Ukraine: proceedings of educational and scientific conference with international participation (Ternopil, May 15-16, 2014): 2 vol. / Ternopil : I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, 2014. – Vol.1 – P. 378-379.
11. Tchaikovska O. Development and introduction of multimedia software and pedagogical systems in the educational process / O. Tchaikovska // Higher education of Ukraine. – 2004. – No.1. – P. 102-105.

*Матеріал надійшов до редакції 24.10.2017*

## ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ

З метою дотримання міжнародних правил оформлення, авторам рекомендується ознайомитися з "Єдиними Вимогами до Рукописів для Біомедичних Журналів" на [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

У якості невід'ємної частини процесу публікації, автори, рецензенти і редактори повинні повідомити про будь-які конфлікти інтересів і надати детальну інформацію, підписавши форму Заяви про Службову Етику та надіславши її на адресу редакції журналу. Автори рукописів зобов'язані поважати право приватності пацієнта. Перед початком дослідження пацієнт повинен заповнити і розписатися у формі Заяви про Інформовану Згоду. До статті додається акт експертної комісії про відсутність конфіденційної інформації та направлення установи. В направленні засвідчується, що жодна частина рукопису не була опублікована і не прийнята до друку іншими виданнями.

Статті публікуються українською, російською або англійською мовами. Авторський оригінал подається у двох примірниках, що складаються із основного тексту (стаття – 15 сторінок, огляд – 20 сторінок, коротке повідомлення – 7 сторінок); списку літератури (статті – до 20, огляди – до 50, короткі повідомлення – до 15 джерел); таблиць; ілюстрацій (не більше 4); назв рисунків; анотацій українською, російською та англійською мовами (орієнтовно 250 слів), що повинні містити обґрунтування мети, матеріалів та методів, результати дослідження.

На першій сторінці зазначаються: шифр УДК; прізвища авторів, ініціали, наукові ступені та звання; назва статті; установи, де працюють автори, місто; ключові слова – від 5 до 10 слів або словосполучень, що розкривають зміст статті. Назва статті російською, українською та англійською мовами повинна бути стислою і не перевищувати 120 символів. Підзаголовок є прийнятним. Текст статті повинен бути структурований наступним чином: вступ, мета, матеріал і методи, результати та висновок. На останній сторінці тексту власноручні підписи всіх авторів: прізвище, ім'я та по-батькові, поштова адреса, номери телефонів (службовий, домашній), за якими редакція буде контактувати із авторами. Подаючи статтю до редакції, автори тим самим підтверджують оригінальність роботи. Це означає, що авторські права або будь-які інші права власності третіх осіб не порушуються. Підписами автори засвідчують, що жодна частина рукопису не була опублікована і не прийнята до друку іншими виданнями. Текст друкується шрифтом не менше 2,8 мм на білому папері через два інтервали, на аркушах формату А4 (210×297 мм), поля з усіх боків по 20 мм. Крім двох роздрукованих копій, матеріал потрібно надати на компакт-диск, текст статті повинен бути у форматі Microsoft Word. Латинські терміни, іншомовні слова повинні бути надруковані курсивом. Тільки загальноживані скорочення можуть подаватися без пояснення. Скорочення у назві статті не є прийнятними. Всі величини приводяться в одиницях СІ, однак допустимими є й інші загальноживані позначення та одиниці вимірювання (l, min., h, C, Da, cal). Ілюстрації (рисунки, фотографії) повинні бути пронумеровані. Назви рисунків повинні бути надруковані на окремій сторінці. Малюнки повинні бути виконані з використанням інструментів, доступних у текстових редакторах або в Excel. Фотографії повинні бути високоякісними. Таблиці розміщуються на окремих аркушах, нумеруються послідовно, кожна сторінка супроводжується коротким заголовком. Рисунки є доповненням до тексту статті і не повинні повторювати інформації, поданої у рукописі. На звороті рисунків олівцем ставлять їхні порядкові номери, зазначають прізвище першого автора, скорочену назву статті. Список літератури оформлюється на окремих сторінках без скорочень. Автори подаються за абеткою, спочатку джерела кирилицею, потім латиницею. Посилання у тексті позначаються цифрами у [квадратних] дужках. Порядок оформлення списку літератури: для монографій – Прізвище, ініціали. Назва книги. Місце видання: видавництво, рік видання. Кількість сторінок; для журналів – Прізвище, ініціали. Назва статті. Назва журналу. Том, номер. Рік: сторінки, на яких вміщено статтю.

Одночасно, автори надають повний переклад тексту, підписаних підписів і табличних матеріалів англійською мовою. У переліку використаної літератури посилання, наведені кирилицею, транслітеруються із застосуванням програми "Trans 1.02" або подібних програм.

Усі рукописи журналу рецензовані незалежними експертами. Процедура рецензування включає перевірку статті протягом двох тижнів двома спеціалістами, призначеними редакційною радою. Рукопис із рецензією надсилається автору для внесення коректив перед остаточним поданням статті до редакції журналу.

Після публікації статті автори передають авторські права редакції журналу. Редакція залишає за собою право змінювати і виправляти рукопис, однак внесені корективи не повинні змінювати загального змісту та наукового значення статті.

Залучаючи до дослідження пацієнтів, автори несуть відповідальність за виконання етичних стандартів Гельсінкської декларації 1975 із поправками 2005 року. Рукопис повинен містити наступний пункт: "Ми заявляємо, що під час дослідження права пацієнтів були враховані у відповідності до вимог Гельсінкської конвенції". При виникненні сумнівів щодо відповідності рукопису до вимог Гельсінкської декларації, автори будуть зобов'язані відзвітуватися про сумнівні аспекти дослідження і обґрунтувати підстави свого підходу.

Якщо дослідження виконується без залучення лабораторних тварин, рукопис повинен містити наступний пункт: "Ми заявляємо, що ми не проводимо досліджень на тваринах". Дослідження, які проводяться на тваринах, повинні відбуватися у відповідності із встановленими інституціональними нормами використання лабораторних тварин. Науковці повинні керуватися принципами гуманного ставлення до тварин, що використовуються в дослідках. Необхідно подати наступну інформацію: вид тварин, генетичний статус: лінія (згідно правил стандартного позначення ліній лабораторних тварин); категорія лабораторних тварин або їх мікробіологічний статус; маса та вік тварин на початку експерименту; карантин або тривалість періоду акліматизації під час перевезення тварин на великі відстані; утримання тварин під час експерименту (параметри мікроклімату, температура, вологість, об'єм повітря, світловий режим, тип клітки, тип підстилки). Автори повинні підтвердити відповідність нормативам утримання та годування тварин (Європейська конвенція по захисту хребтових тварин, що використовуються з експериментальною або іншою метою. – Страсбург, 1986), наявність сертифікату якості, а також повідомити джерело набуття тварин. Необхідно описати всі процедури, які виконуються на тварині, дози препаратів, що вводилися, хірургічні втручання та інші дії, а також відмітити використання при цьому методів анестезії (див. інформацію про Права Людини і Тварини).

Ці правила поширюються на всі види рукописів, у тому числі статті, короткі доповіді, коментарі до клінічних випробувань. Рукописи, які не відповідають цим вимогам, будуть повернені авторам для корекції.

## INFORMATION FOR AUTHORS

In order to comply with the international regulations, the authors are strongly encouraged to consult the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" at [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

As an integral part of the publication process, the authors, reviewers and editors are required to confirm whether they have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these in the following Conflict of Interest Statement Form. The authors of the articles will respect the patients' right to privacy. Upon the familiarization with the abovementioned details, the patient must complete the Standard Statement of Informed Consent Form. The lack of confidential data must be certified by the act of expert committee attached to the article. The referral from the corresponding establishment with the statement that neither part of the suggested research has been published or accepted for publication in other journals must be sent with it as well.

Articles in Ukrainian, Russian or English are accepted for publication in *The Medical and Ecological Problems*. The article is submitted to journal in two copies. The article comprises the text of the research (15 pages for articles, 20 pages for reviews, 7 pages for brief reports); the list of cited literature (20 positions at most for articles; 50 positions at most for reviews; 15 positions at most for brief reports); tables, figures (no more than 4); legends and captions; summaries in Ukrainian, Russian and English (approximately 250 words) providing the arguments in support of the aim of the research, explanation of materials and methods, the results and conclusions.

The first page contains UDC code, author's record (name, initials, scholar degrees, title, the title of the article, institution, city) and keywords – from 5 to 10 words or phrases revealing the content of the article. Title of the paper in Russian, Ukrainian and English should be concise, it must not exceed 120 characters. A subtitle is acceptable. The text of original papers must be divided into paragraphs, including introduction, the aim of the research, materials and methods, results and conclusions. The last page must be manually signed by author(s) of the article, featuring first name, last name and patronymic, address, telephone numbers (office, home) for Editorial office to keep contact with. By submitting a paper to the editor, authors thereby confirm the original form of the articles, which means that the copyright or any other property rights of the third parties are not violated. The author(s) sign the article thereby certifying that neither part of the suggested research has been published or accepted for publication in other journals. The text of the manuscript must be in printing type no less than 2,8 mm, double-spaced, on A4-size sheets (210×297 mm); margins from each side – 20 mm. Along with 2 printed copies, the manuscript is provided in Microsoft Word format on electronic media. Latin notions and foreign words must be typed in italics. Only common abbreviations may be left unexplained. No abbreviations are acceptable in the title. All values are set in SI units; however, other generally used abbreviations and units (l, min., h, C, Da, cal) are also accepted. Figures (drawings, photographs) must be numbered. Figure captions are to be printed on a separate page. Drawings should be prepared using tools available in Word processors or in Excel. Photographs must be of high quality. Tables should be on separate sheets, numbered consecutively and headed by a concise title. Figures are adjuncts to the text and should not repeat material presented therein. On the reverse side of the figures it is necessary to write with a pencil their sequence numbers, name of the first author and the short title of the article. The list of cited literature is provided on a separate page without abbreviations. The authors are stated in alphabetical order, at first the sources in Cyrillic alphabet, then in Roman alphabet. The references in the text are indicated in [square] brackets. The cited works are to be compiled in the following way: for monographies – Name, initials. Book name. Place of publication. Publishing house, year. Total number of pages; for journals – Name, initials. Article name. Abbreviated name of journal. Volume, number: pages containing the article.

At the same time the authors provide full translation of the article's text, picture captions and table materials into English. In the list of references, the Cyrillic positions must be transliterated with the use of "Trans 1.02" or similar programs.

The original papers are peer-reviewed. Usually editorial staff chooses two readers who review papers during two weeks. The manuscript with review is sent to authors and after being corrected is delivered to editorial office for final acceptance.

Upon publication of the paper, the authors transfer the copyright to the Editorial office of the journal. The Editorial office reserves the right to alter and correct the manuscript considered for publication in the way that will not change its overall content and value.

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures were performed in accordance with the ethical standards of Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2005. Therefore the manuscript must include the following clause: "We declare that during research the rights of patients were taken into consideration according to Helsinki Convention". If doubts for that matter arise, the authors must account for the doubtful aspects of the study and explain the reasons for their approach.

If the research does not presuppose experiments on laboratory animals, the article must include the following statement: "We declare that we do not perform research on animals". When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the institutional and national guides for care and use of laboratory animals were respected. The authors must follow the principles of humane attitude to animals used in experiments. They must submit the following information: type of animals, genetic status: the line (according to standard rules of defining the lines of laboratory animals); the category of laboratory animals or their microbiological status; weight and age of animals at the beginning of the experiment; quarantine or acclimatization period during transportation over long distances; maintenance conditions during the experiment (microclimate parameters, temperature, humidity, air volume, light conditions, cage type, type of bedding material). The authors must prove the compliance with normative standards on animals maintenance and foddering (European Convention for the Protection of vertebral animals used in experiments or other purposes. – Strasbourg, 1986) and provide the information as to the acquisition source of animals, as well as the quality certificate. It is necessary to describe all procedures performed on animals, introduced doses of medications, surgical interventions and other actions, the use of anesthesia methods (See Statement of Human and Animal Rights).

The abovementioned requirements must apply to all original papers, including original research, brief reports, case reports and also for comments on clinical trials. Manuscripts that do not meet these requirements will be returned to authors for correction.