

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

Проблеми екології та медицини

Том 22 N 1-2 2018

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Заснований в 1997 році

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ФЕРМЕНТІВ ТКАНИННОГО ДИХАННЯ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С*

Багмут І.Ю., Граматюк С.М. 3

ENGLISH VERSION: PATHOPHYSIOLOGIC MECHANISMS OF THE INFLUENCE OF TISSUE RESPIRATION ENZYMES ON THE MITOCHONDRIAL FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Bagmut I.Y., Gramatiuk S.M. 7

АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ TLR2 (RS5743708) І TLR4 (RS4986790, RS4986791) ЗІ СТАНОМ ЗДОРОВ'Я ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ОСІБ*

Ізмайлова О.В. 11

ENGLISH VERSION: ANALYSIS OF ASSOCIATION BETWEEN THE POLYMORPHIC VARIANTS OF THE TLR2 (RS5743708) AND TLR4 (RS4986790, RS4986791) GENES WITH THE HEALTH STATUS OF APPARENTLY HEALTHY INDIVIDUALS*

Izmailova O.V. 17

ОСОБЛИВОСТІ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ХВОРИХ ІЗ ПОЛІТРАВМОЮ*

Мормоль І.А., Борзих О.А., Кайдашев І.П. 23

ENGLISH VERSION: FEATURES OF THERAPEUTIC SUPPORT FOR PATIENTS WITH POLYTRAUMA*

Mormol I.A., Borzykh O.A., Kaidashev I.P. 28

ГАЛЕКТИН-3 ЯК МАРКЕР ФУНКЦІЇ МІОКАРДУ У ЧОЛОВІКІВ 40-60 РОКІВ БЕЗ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ПАТОЛОГІЇ, НОСІЇВ ПОЛІМОРФНИХ ГЕНІВ AT1R*

Ружанська В.О., Сивак В.Г., Лозинська М.С., Жебель В.М. 33

ENGLISH VERSION: GALECTIN-3 AS A MARKER OF MYOCARDIAL FUNCTION IN MEN AGED 40-60 YEARS WITHOUT CARDIOVASCULAR PATHOLOGY, CARRIERS OF POLYMORPHIC GENES AT1R*

Ruzhanska V.O., Sivak V.G., Lozinska M.S., Zhebel V.M. 38

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ НЕСПРОМОЖНОСТІ ШВІВ АНАСТОМОЗІВ У ХВОРИХ НА ОНКОПАТОЛОГІЮ*

Мовчан О.В., Туткова А.В. 43

ENGLISH VERSION: PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF DEHISCENCE OF ANASTOMOSE SUTURES IN PATIENTS WITH ONCOPATHOLOGY*	
Movchan O.V., Titkova A.V.	48
THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN PATIENTS WITH THYROID CANCER*	
Bagmut I.Yu., Galmiz O.O., Gramatiuk S.M.	53
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА	
THE STRUCTURAL AND METABOLIC DISORDERS OF CELLS' MEMBRANES IN EXPERIMENT*	
Kolisnyk I.L., Titkova A.V., RezunenکوYu.K.,* Voiagina O.D.*	57
СОЦІАЛЬНІ АСПЕКТИ	
ВИКОРИСТАННЯ СИСТЕМИ КОМП'ЮТЕРНОЇ МАТЕМАТИКИ MAPLE У НАВЧАННІ МЕДИЧНИЙ І БІОЛОГІЧНИЙ ФІЗИЦІ*	
Мороховець Г. Ю., Саєнко М. С., Лисанець Ю. В., Сілкова О. В.	60
ENGLISH VERSION: THE USE OF MAPLE MATHEMATICAL SOFTWARE IN TEACHING MEDICAL AND BIOLOGICAL PHYSICS*	
Morokhovets H. Yu., Saienko M. S., Lysanets Yu. V., Silkova O. V.	63
ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ	66
INFORMATION FOR AUTHORS	67

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Багмут І.Ю., Граматюк С.М.

УДК:616.36-002.-022-008.9:(612.826.33. 015.22+577.112.853+546.172.6)

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ФЕРМЕНТІВ ТКАНИННОГО ДИХАННЯ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С*

Багмут І.Ю., Граматюк С.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти

Кафедра клінічної патофізіології, топографічної анатомії та оперативної хірургії Харків, Україна

Исследования, проведенные в течение нескольких десятилетий, в области патофизиологических механизмов митохондрий гепатоцитов, обычно были направлены на функциональные исследования изолированных митохондрий при отсутствии АДФ. Во многих случаях исследователи использовали данные для расчета параметров, включая коэффициент дыхательного контроля или количество потребляемой АДФ на каждое количество используемого кислорода. Однако до настоящего времени мало известно о том, как вирус может выжить в сильно окислительной среде, учитывая то, что окислительный стресс является важным клиническим признаком, связанным с инфицированием вирусом гепатита С. По нашему мнению, адаптация к окислительному стрессу - это патофизиологический механизм к выживанию вируса. Цель работы заключается в исследовании механизмов нарушения энергоснабжения, как механизма повреждения клеток, у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. В данное исследование было включено 62 пациента с наличием HCV-инфекции - основная группа, и 24 условно-здоровых пациента, не имевших в анамнезе заболеваний печени - группа контроля. Пациентов отбирали на основании их стабильного клинического состояния в течение последних 3 месяцев. У больных основной группы, HCV-инфекция была диагностирована положительно анти-HCV и HCV-RНК в течение не менее 6 месяцев. Митохондриальную целостность оценивали путем высвобождения цитохрома С с использованием коммерческого набора (цитохром С оксидазный Kit Sigma-Aldrich, USA), который указывает на наличие 96% интактных митохондрий. Внутренняя флуоресценция NADH была отслежена в изолированных митохондриях как маркер митохондриального окислительно-активного состояния NADH. Митохондриальное деление является ключевым патогенетическим механизмом контроля целостности митохондрий, при адаптации к клеточному патофизиологическому ответу вирус гепатита С модулирует ключевые процессы, связанные с инфицированием, для содействия сохранению вируса. Митохондриальное деление не всегда связано с разрушением клеток, также оно может защищать клетки от смерти, вызванной оксидативным стрессом и Ca^{2+} зависимыми апоптотическими стимуляторами. Механизм, с помощью которого ферменты энергетического обмена подавляют репликацию вируса гепатита С, не совсем понятен, но, вероятно, он включает кальций и диссоциацию комплекса репликации вируса из мембран. Детальное понимание механизма, с помощью которого ферменты энергетического обмена подавляют репликацию HCV-инфекции, требуют дополнительных исследований.

Ключевые слова: гепатит С, NAD/NADH₂, деление митохондрий.

Вступ

Вірусний гепатит С, що спостерігається у 3% світового населення, викликає клінічно важливе захворювання [1, 2]. Вірус гепатиту С визнаний найважливішим чинником розвитку фіброзу та цирозу печінки. Паренхіматозне ушкодження клітинних мембран гепатоцитів, може призвести до порушень метаболізму, що відіграє важливу роль у формуванні фіброзу печінки при вірусному гепатиті С [2-3].

Дослідження, що проведені протягом декількох десятиліть, в галузі патофізіологічних механізмів митохондрий гепатоцитів, зазвичай було спрямовано на функціо-

нальних дослідженнях ізольованих митохондрий за відсутності АДФ [1-3]. У багатьох випадках дослідники використовували дані для розрахунку параметрів, включаючи коефіцієнт дихального контролю або кількість спожитої АДФ на кожну кількість використуваного кисню [1]. Такі дослідження широко застосовуються для опису митохондриальної функції, на яку впливає безліч фізіологічних або патофізіологічних станів.

Компоненти метаболічної функції гепатоцитів: митохондриальна функція, стан дихального ланцюга та ендогенна інтоксикація в минулому оцінювалися різними методами. До них відносяться застосування креатину, креатинкінази [2-4], АТФази з наявності

* Цитування при атестації кадрів: Багмут І.Ю., Граматюк С.М. Патофізіологічні механізми впливу ферментів тканинного дихання на функціонування митохондрий у хворих на хронічний гепатит С. // Проблеми екології і медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 3-6.

надлишку АДФ [2, 5-7], а також співвідношення $NAD^+/NADH_2$, глюкози / гексокінази [4, 8].

Більшість цих досліджень були спрямовані на вивчення мітохондрії печінки, вірусний гепатит С встановлює хронічну інфекцію в умовах активної імунної відповіді та окисної оборони організму людини. Однак до теперішнього часу мало відомо про те, як вірус може вижити у сильно окисному середовищі, з огляду на те, що окислювальний стрес є такою видатною клінічною ознакою, що пов'язана з інфікуванням вірусом гепатиту С [6-12]. На нашу думку, адаптація до окисного стресу – є патофізіологічним механізмом до виживання вірусу.

Мета роботи полягає в дослідженні механізмів порушення енергопостачання гепатоцитів, як фактору пошкодження клітин у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С.

Матеріали та методи дослідження

У даному дослідженні було включено 62 пацієнти із наявністю HCV-інфекції – основна група, та 24 умовно-здорових пацієнта, що не мали в анамнезі захворювань печінки - група контролю. Пацієнтів відбирали на підставі їх стабільного клінічного стану протягом останніх 3 місяців. У хворих основної групи, HCV-інфекція була діагностована позитивністю анти-HCV і HCV-РНК протягом як мінімум 6 місяців.

Протокол дослідження було проведено у відповідності до Гельсінської декларації, переглянутої у 1989 році. Всі пацієнти були поінформовані про дослідження, і письмова згода була отримана у кожну з них.

Критеріями виключення з дослідження були наступні фактори: зловживання алкоголем, звичка паління, вагітність та застосування антиоксидантів, риб'ячої олії або препаратів заліза протягом останнього місяця, отримувана антивірусної та/або інтерфероно терапії, неконтрольоване підвищення артеріального тиску, сумарні рівні білірубину в сироватці вище 2 мг/дл, хронічний гепатит В або інші відомі захворювання печінки, аутоімунні розлади та різні інфекційні стани печінки, інфекція вірусу імунодефіциту людини, цукровий діабет, хронічна дихальна недостатність, ревматоїдний артрит, цироз печінки або злоякісна пухлина.

Вірусологічне дослідження – встановлювали на підставі виявлення реплікативної активності в сироватці крові RNAHCV якісним та кількісним методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням набору тест-систем ELISA kit виробництва США, згідно з інструкцією виробника на ПЛР-аналізаторі BIO-RadCFX96 Touch™ (США).

Підготовка мітохондрій еритроцитів. Еритроцити двічі промивали фосфатно-буферним ізотонічним розчином (145мМ NaCl, 5мМ NaPi та 1мМ EDTA, рН 7,4), а білі клітини видаляли фільтруванням через целюлозу [9]. Мітохондрії еритроцитів були підготовлені диференційним центрифугуванням та очищені за допомогою Percoll [10]. Мітохондріальну цілісність оцінювали шляхом вивільнення цитохрому С із використанням комерційного набору (цитохром С Оксидазний аналіз, Kit Sigma-Aldrich, США).

Дослідження співвідношення АДФ/АТФ за допомогою набору ADP/ATP Ratio Assay становить собою просту і пряму процедуру для вимірювання рівнів АДФ та АТФ у клітинах для визначення апоптозу, некрозу та проліферації клітин. Аналіз включає в себе два етапи. На першому етапі робочий реагент лізує клітини для вивільнення АТФ та АДФ. При наявності люциферази АТФ негайно реагує з субстратом D-люциферин для отримання світла. Інтенсивність світ-

ла є прямим показником внутрішньоклітинної концентрації АТФ.

Люцифераза

$ATP + D\text{-люциферин} + O_2 \text{ -----} \rightarrow \text{окислюциферин} + AMP + PPi + CO_2 + \text{світло}$

На другому етапі АДФ перетворюється на АТФ шляхом ферментної реакції. Щойно сформований АТФ реагує з D-люциферином, як і на першому етапі. Інтенсивність світла на другому етапі відображає загальну концентрацію АДФ та АТФ у препараті.

Реєстрація продукції H_2O_2 мітохондріями. Вироблення H_2O_2 оцінювали за продукцією АТФ, за методом Ю. Лі [14]. Була виміряна флуоресценція і проведена кількісна оцінка [13]. Всього в пробі, що містить 1,5 мМ цитохрому С або феррицитохрому С, додавали 0,5 мл виділених клітин в HBSS (приблизно 5×10^6 клітин на мілілітр).

Вимірювання перекису водню в мітохондріях. Вироблення перекису водню вимірювали флуориметрично, використовуючи барвник Amplex Red (Eugene, США) у поєднанні з пероксидазою хрому. У цих експериментах інкубаційне середовище доповнювали 1 л М амплекс-червоного, 5 мл пероксидази хрому та 40 мМ Cu, супероксиддисмутазою Zn. Наявність супероксиддисмутази запобігає автоматичному окисненню Amplex Red, що перешкоджає кількісній оцінці низьких показників вироблення H_2O_2 . Вироблення H_2O_2 у мітохондріальних суспензіях було зареєстровано як збільшення флуоресценції барвника при 585 нм, з довжиною хвилі збудження 550 нм. Реакцію барвника калібрували шляхом послідовних доповнень відомих кількостей розчину перекису водню або безперервної інфузії розчину H_2O_2 при 100-1000 пмоль/хв. Концентрація комерційного 30%-ного розчину H_2O_2 розраховували з оптичного поглинання світла при 240нм; запасний розчин розводили до 100 мМ з деіонізованою водою і негайно використовували для калібрування.

Модифікація методів дихального та мембранного потенціалів Ю. Лі [14]. Мітохондрії (0,05 мг/мл) інкубували при 37°C в 2 мл іонного дихального буфера (105мМ KCl, 10мМ NaCl, 5мМ Na_2HPO_4 , 2мМ $MgCl_2$, 10мМ HEPES, рН 7,2, 1мМ EDTA, 0,2% BSA) з 5 г/мкл гексокінази (Worthington Biochemical) та 5 мМ 2-дезоксиглюкози. Стандартну криву тетрафенілфосфонію розробляли в кожному режимі шляхом додавання хлориду тетрафенілфосфонію в концентраціях 0,25, 0,5, 0,75 та 1 мкМ перед додаванням до культури мітохондрій.

Методи статистичної обробки даних. Для об'єктивного судження про ступінь вірогідності результатів дослідження ми застосовували варіаційно-статистичний метод аналізу отриманих результатів на персональному комп'ютері Pentium III із використанням пакету статистичних програм «StatGraphics Plus 3.0».

Результати та їх обговорення

В результаті нашого дослідження, не було статистично значущих відмінностей між групами за віком та статтю ($p > 0,05$). Відсутня кореляція між рівнем АЛТ та рівнем HCV-РНК у пацієнтів із HCV-інфекцією ($p > 0,05$).

За результатами нашого дослідження встановлено, що HCV-інфекція індукує деформування мітохондрій та викликає окислювальний стрес і змінює гомеостаз кальцію, який спричинює дисфункцію та пошкодження мітохондрій. У нашому дослідженні HCV-інфіковані клітини демонструють відмінні фрагмента-

рні мітохондрії (мітохондріальне ділення), на відміну від неінфікованих клітин, у яких проявляється типова

трубчаста мітохондріальна мережа, що свідчить про здорові клітини (рис. 1).

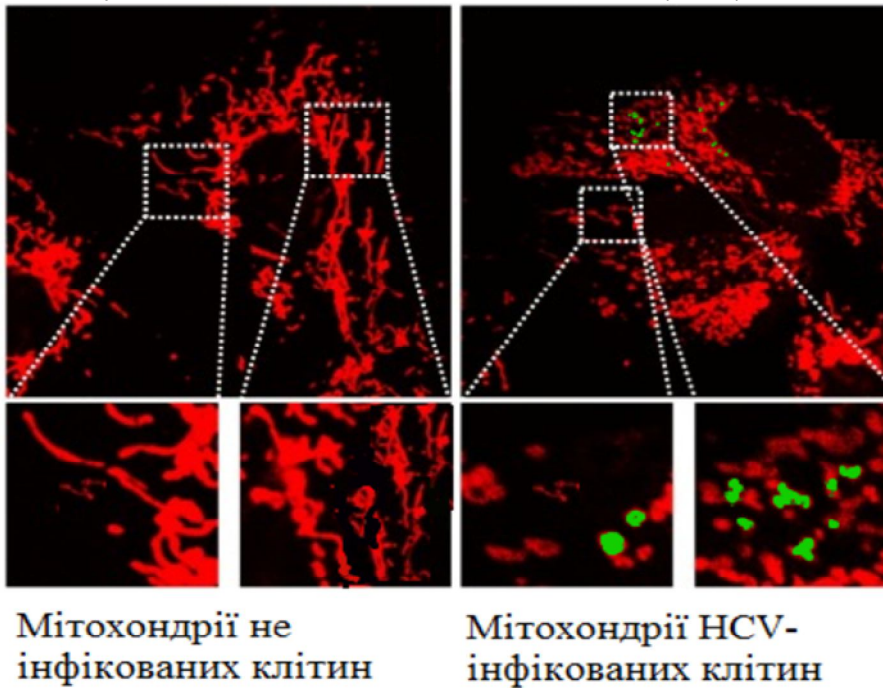


Рис. 1. Вірус гепатиту С індукує деформування мітохондрій. Аналіз результатів імунофлюоресценції, що демонструє розщеплення мітохондрій у клітинах, інфікованих HCV.

У контрольній групі ми спостерігали поступове збільшення показника O_2 при додаванні у розчин АДФ. Однак при порівнянні з групою пацієнтів, хворих на хронічний вірусний гепатит С, встановлено, що показники O_2 були достовірно ($p < 0,05$) вищі у пацієнтів з HCV-інфекцією.

Також достовірно ($p < 0,05$) вищими за контрольні значення були загальний рівень АТФ та АДФ, що склали $2,25 \pm 0,35$ нмоль та $3,40 \pm 0,45$ нмоль, відповід-

но. Відношення АТФ до АДФ становило 1:1,6 відповідно, (рис. 2 (А)). Мітохондріальна динаміка та контроль якості тісно пов'язані з клітинними метаболічними змінами та рівнями АТФ. Щоб дослідити, чи гальмування секреції вірусу гепатиту С, є наслідком зниження рівня клітинних АТФ, ми визначили загальний рівень АТФ та швидкість гліколізу, альтернативний спосіб генерації АТФ.

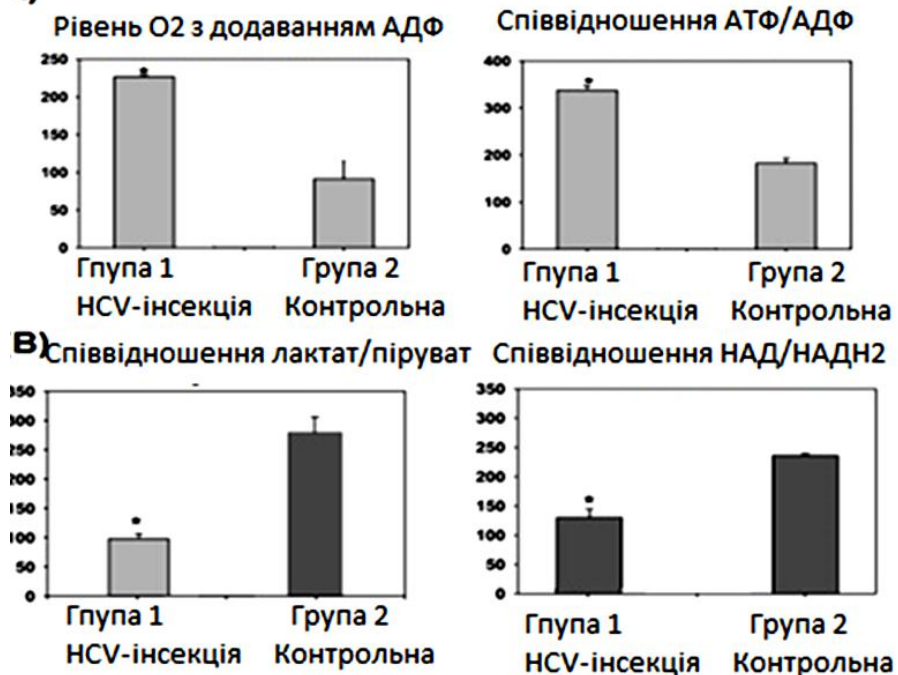


Рис. 2. Інгибування мітохондріального дихання та мітохондріальної функції. (А) - O_2 з додаванням АДФ і співвідношення АТФ / АДФ, (В) - співвідношення лактат / піруват, співвідношення NADH / NAD +.

Крім того, ми виявили, що співвідношення NADH/NAD^+ було позитивно співвіднесене з вмістом РНК ВГС ($r=0,95$, $p<0,001$). Пригнічення реплікації HCV при додаванні в культуральне середовище ціанаміду та пірувату, також було пов'язане з відповідним зменшенням співвідношення NADH/NAD^+ .

У пацієнтів з хронічним гепатитом С виявлено підвищений вміст окислених нікотинамідних коферментів.

Дослідження параметрів лактату та пірувату показали наступне. У пацієнтів, хворих на хронічний вірусний гепатит С, показники лактату перевищували показники контрольної групи і склали $1,89 \pm 0,45$ ммоль/л у порівнянні з контрольним значенням ($1,56 \pm 0,235$ ммоль/л). Показники пірувату сироватки крові були значно нижчими, ніж у контрольній групі ($0,056 \pm 0,011$ ммоль/л), і склали у пацієнтів з HCV-інфекцією $0,031 \pm 0,012$ ммоль/л та у пацієнтів другої групи – $0,0174 \pm 0,01$ ммоль/л (рис. 2 (В)). Піруват, який повторно окисляє цитозольні NADH до NAD^+ , повністю скасовує збільшення реплікації вірусу гепатиту С.

Висновок

Мітохондріальне ділення є ключовим патогенетичним механізмом контролю цілостності мітохондрій, а відтак вірус гепатиту С модулює ці ключові процеси при адаптації до клітинної патофізіологічної відповіді, що пов'язана із інфікуванням, для сприяння збереженню вірусу. Мітохондріальне ділення не завжди пов'язано з руйнуванням клітин, також воно може захищати клітини від смерті, викликані окислативним стресом та Ca^{2+} -залежними апоптотичними подразниками. Механізм, за допомогою якого ферменти енергетичного обміну пригнічують реплікацію вірусу гепатиту С, ще не зовсім зрозумілий, але, ймовірно, він включає кальцій та дисоціацію комплексу реплікації вірусу з мембран. Детальне розуміння механізму, за допомогою якого ферменти енергетичного обміну пригнічують реплікацію HCV-інфекції, потребують додаткових досліджень.

Література

1. Kim S.J., Syed G.H., Siddiqui A. Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. // *PLoS Pathog.* – 2013. – Т. 9(3). – P.1032-1085.
2. Korenaga M. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. // *J Biol Chem.* – 2005. – Т. 280(45). – P. 37481–37488.
3. Piccoli C. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. // *Hepatology.* – 2007. – Т. 46(1). – P.58–65.
4. Chan D.C. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. // *Annu Rev Genet.* – 2012. – Т. 46. – P. 265–287.
5. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – Т. 11. – P. 1289–1299.
6. Berglund A. K. Nucleotide pools dictate the identity and frequency of ribonucleotide incorporation in mitochondrial DNA. / Berglund A. K., Navarrete C., Engqvist M. K., Hoberg E., Szilagyi Z. // *PLoS Genet.* – 2017. – Т.1. – 13:e1006628. 10.1371/journal.pgen.1006628.
7. Calvo S. E., Clauser K. R., Mootha V. K. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Т.44. – P.1251–1257. 10.1093/nar/gkv1003.
8. Copeland W. C., Longley M. J. Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA. // Rep.* – 2015. – Т.19. – P.190–198. 10.1016/j.dnarep.2014.03.010.
9. Braverman N. E., Moser A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. // *Biochim. Biophys.* – 2013. – Т. 1822. – P. 1442–1452. 10.1016/j.bbdis.2012.05.008.
10. Brites P., Waterham H. R., Wanders R. J. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. // *Biochim. Biophys.* – 2015. – Т. Acta.1636. – P. 219–231. 10.1016/j.bbalip.2003.12.010.
11. Buchert R., Tawamie H., Smith C., Uebe S. A peroxisomal disorder of severe intellectual disability, epilepsy, and cataracts due to fatty acyl-CoA reductase 1 deficiency. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2014. – Т. 95. – P. 602–610. 10.1016/j.ajhg.2014.10.003.
12. Burdett K., Larkins L. K., Das A. K., Hajra A. K. Peroxisomal localization of acyl-coenzyme A reductase (long chain alcohol forming) in guinea pig intestine mucosal cells. // *J. Biol. Chem.* – Т. 266. – P. 12201–12206.
13. Cheng J. B., Russell D. W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. // *J. Biol. Chem.* - 2004. – Т. 279. – P. 37789–37797. 10.1074/jbc.M406225200.
14. Xing Du, Yi Li, Shu-Qun Liu Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models and methods // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol.17(2). – P.144-147.

Матеріал надійшов до редакції 05.03.2018

ENGLISH VERSION: PATHOPHYSIOLOGIC MECHANISMS OF THE INFLUENCE OF TISSUE RESPIRATION ENZYMES ON THE MITOCHONDRIAL FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Bagmut I.Y., Gramatiuk S.M.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Department of Clinical Pathophysiology, Topographic Anatomy and Operative Surger, Kharkiv, Ukraine

Studies conducted over several decades in the field of pathophysiological mechanisms of hepatocyte mitochondria have usually been directed to functional studies of isolated mitochondria in the absence of ADP. In many cases, researchers used data to calculate parameters, including the respiratory rate or the amount of ADP consumed for each amount of oxygen used. However, so far, little is known about how the virus can survive in a highly oxidizing environment, given that oxidative stress is such an outstanding clinical feature that is associated with infection with the hepatitis C virus. In our opinion, adaptation to oxidative stress is a pathophysiological mechanism for the survival of the virus. The objective is to research mechanisms of energy supply disturbance as a mechanism of damage to cells in patients with chronic viral hepatitis C. The 62 HCV+ patients and 24 healthy controls were enrolled in the present cross-sectional study. The patients were selected on the basis of their stable clinical condition over the past 3 months. The HCV infection was diagnosed by the positivity of anti-HCV and HCV-RNA for at least 6 months of period. Mitochondrial integrity was assessed by cytochrome C release using a commercial kit (Cytochrome C Oxidase Assay Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis) indicating a mean of 96% intact mitochondria. Intrinsic NADH fluorescence was monitored in isolated mitochondria as a marker of the mitochondrial NADH redox state. Mitochondrial division is a key determinant of mitochondrial quality control, and HCV modulates these key processes in the adaptation to cellular physiological perturbations associated with infection to promote viral persistence. Mitochondrial division is not invariably associated with cell death but can also protect cells from death induced by oxidative stress and Ca²⁺-dependent apoptotic stimuli. The mechanism by which enzymes for energy metabolism suppress the replication of the hepatitis C virus is not yet clear, but it probably includes calcium and dissociation of the mammalian replication complex. A detailed understanding of the mechanism by which energy enzymes suppress the replication of HCV infection require additional research.

Key words: hepatitis C, NAD/NADH₂, mitochondrial fission.

Introduction

The hepatitis C virus affects 3% of the world population and causes a clinically important disease [1, 2]. Hepatitis C virus is recognized as a major factor in fibrosis and cirrhosis development. Parenchymal damage of cell membranes may lead to metabolic disorders, which plays a major role of liver fibrosis in formation of hepatitis C [2-3]. The researches dating back to several decades have usually been carried out in functional studies of isolated mitochondria in the absence of ADP [1]. In many cases, investigators have used the data to calculate parameters including the respiratory control ratio or the amount of ADP consumed per amount of oxygen utilized [1]. Such studies have been widely applied to describe mitochondrial function as affected by a myriad of physiological or pathophysiological states.

The components of metabolic function of hepatocytes: mitochondrial function, respiratory states and endogenous intoxication have been assessed in the past by different methods designed to regenerate ADP for phosphorylation. These include the use of creatine, creatine kinase [2-4], ATPase with excess ATP [2, 5-7], and ratio NAD⁺/NADH₂, glucose/hexokinase [4, 8].

Most of these studies were directed at liver mitochondria. HCV establishes a chronic infection in the face of an active immune response and the host oxidative defense. However, little is known about how the virus can survive in a highly oxidative environment given that oxidative stress is such a prominent clinical feature associated with hepatitis C infection [6-12]. Adaptation to oxidative stress is key to virus survival.

The objective is to research mechanisms of energy

supply disturbance as a mechanism of damage to cells in patients with chronic viral hepatitis C.

Material and Methods

62 HCV+ patients and 24 healthy controls were enrolled in the present cross-sectional study. The patients were selected on the basis of their stable clinical condition over the past 3 months.

The study protocol was carried out in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 1989. All subjects were informed about the study and the written consent was obtained from each one.

HCV infection was diagnosed by the positivity of anti-HCV and HCV-RNA for at least 6 months period.

Exclusion criteria

History of alcohol abuse, smoking habit, pregnancy, and antioxidant use, fish-oil or iron supplement in the previous month, receiving antiviral and/or interferon therapy, uncontrolled elevated blood pressure, serum total bilirubin level higher than 2 mg/dL, concomitant chronic hepatitis B or other well-known liver diseases such as metabolic or autoimmune disorders and various infectious states of the liver, human immune deficiency virus infection, diabetes mellitus, chronic respiratory insufficiency, rheumatoid arthritis, cirrhosis, or malignant tumor.

Virological studies

Anti-HCV was assayed by micro particle ELISA method (Anti-HCV ELISA Kit, Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc., USA). HCV-RNA was determined using real time polymerase chain reaction (RT-PCR) method (RoboGene® HCV RNA Quantification Kit, Analytik Jena) in BioRad ICycler. Upper and lower detection limit (68 IU/ml).

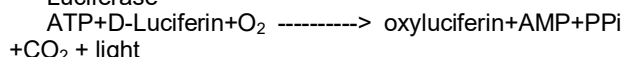
Preparation of erythrocytes mitochondria

* To cite this English version: Bagmut I.Y., Gramatiuk S.M. Pathophysiological mechanisms of the influence of tissue respiration enzymes on the mitochondrial function in patients with chronic hepatitis C. // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 7-10.

Erythrocytes were washed twice in phosphate-buffered saline (145 mM NaCl, 5 mM NaPi, and 1 mM EDTA, pH 7.4) and white cells were removed by filtration through cellulose [9]. Total erythrocytes mitochondria were prepared by differential centrifugation and purification on Percoll [10]. Mitochondrial integrity was assessed by cytochrome C release using a commercial kit (Cytochrome C Oxidase Assay Kit, Sigma-Aldrich, USA).

The study of the ADP/ATP ratio using the ADP/ATP Ratio Assay set is a simple and direct procedure for measuring ADP and ATP levels in cells to determine apoptosis, necrosis and cell proliferation. The analysis involves two stages. In the first stage, the working reagent lyses cells to release ATP and ADP. In the presence of luciferase, ATP reacts immediately with the substrate D-Luciferin to produce light. The intensity of light is a direct indicator of intracellular ATP concentration.

Luciferase



In the second stage, ADP is converted to ATP through an enzyme reaction. This newly formed ATP then reacts with the D-luciferin as in the first step. The second light intensity measured represents the total ADP and ATP concentration in the sample.

Registration of H₂O₂ products by mitochondria. The production of H₂O₂ was estimated by ATP production as described by Yi Li [14]. Fluorescence was measured and a quantitative estimate was made [13]. In total, in a sample containing 1.5 mM cytochrome C or ferricitochrom C, 0.5 ml of isolated cells were added to HBSS (approximately 5 × 10⁶ cells per milliliter).

Measurement of hydrogen peroxide in mitochondria. The production of hydrogen peroxide was measured fluorometrically using Amplex Red dye (Eugene, USA) in combination with horseradish. In these experiments, the incubation medium was supplemented with 1 L of ample red, 5 ml of horseradish peroxidase and 40 ml of Cu, superoxide dismutase Zn. The presence of superoxide dismutase prevents the automatic oxidation of Amplex Red, which prevents the quantitative assessment of low H₂O₂ production rates. The production of H₂O₂ in mitochondrial

suspensions was recorded as an increase in the fluorescence of the dye at 585 nm, with a wavelength of excitation of 550 nm. The dye reaction was calibrated by successive addition of known amounts of hydrogen peroxide solution or continuous infusion of H₂O₂ solution at 100-1000 pmol/min. The concentration of commercial 30% solution of H₂O₂ was calculated from optical absorption of light at 240 nM; The stock solution was diluted to 100 ml with deionized water and immediately used for calibration.

Respiration and membrane potential methods by Yi Li [14] in modification.

Mitochondria (0.05 mg/ml) were incubated at 37°C in 2 ml of ionic respiratory buffer (105 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES pH 7.2, 1 mM EGTA, 0.2% defatted BSA) with 5 U/ml hexokinase (Worthington Biochemical), and 5 mM 2-deoxyglucose. A tetraphenylphosphonium standard curve was performed in each run by adding tetraphenylphosphonium chloride at concentrations of 0.25, 0.5, 0.75, and 1 μM prior to the addition of mitochondria to the chamber.

Statistical Analysis

An independent (unpaired) Student's t-test (two-tailed) was chosen to test the significance of differences among means of small "n" sample sets, using the StatGraphics Plus 3.0 package.

Results and discussion

There were no statistically significant differences between the groups with respect to age and gender (p > 0.05). No correlation was observed between ALT and HCV-RNA level in HCV-infection patients (p > 0.05).

HCV-infection induces endogenous intoxication and oxidative stress salters which causes mitochondrial dysfunction and hepatocytes damage. The HCV-infected cells displayed fragmented mitochondria distinct from non-infected cells, in which the typical tubular mitochondrial network has been observed as indicative of normal healthy cells (Figure 1).

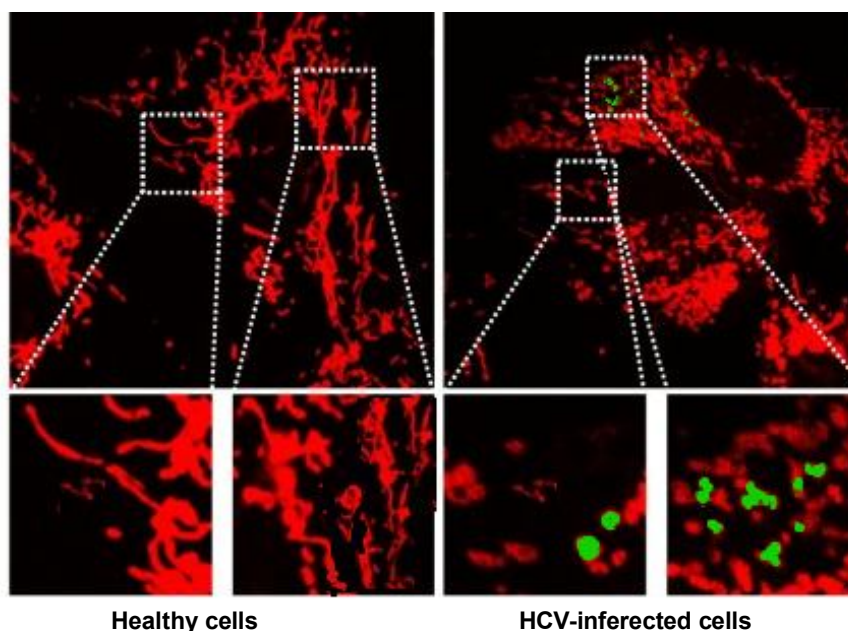


Figure 1. The mitochondrial HCV-infected and healthy cells.

In the control group, we observed a gradual increase in the O₂ index when added to the ADP solution. However, when compared with a group of patients with chronic viral hepatitis C, it was found that O₂ values were significantly (p<0.05) higher in patients with HCV infection.

The total levels of ATP and ADP secreted the patients with hepatitis C virus was 2.25±0.35 nmoles and

3.40±0.45 nmoles. The ratio of ATP to ADP, secreted from platelets upon activation, was 1:1.60 respectively (Figure 2 (A)). Mitochondrial dynamics and quality control are closely associated with cellular metabolic alterations and ATP levels. To investigate whether inhibition in HCV secretion is a result of reduction in cellular ATP levels, we determined the total ATP levels and rate of glycolysis, an alternative mode of ATP generation..

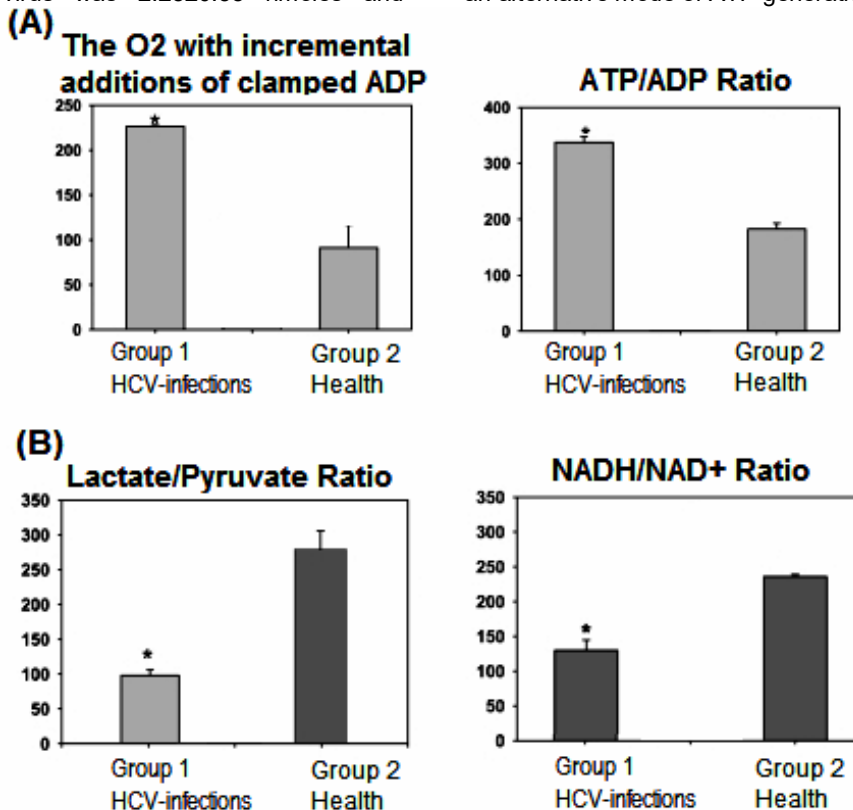


Figure 2. Inhibition of mitochondrial division and mitochondrial function. A– O₂ with incremental additions of clamped ADP and ATP/ADP ratio, B – Lactate/Pyruvate ratio, NADH/NAD⁺ ratio..

To detect bioenergetics changes, we examined the ratio of pyruvic acid and lactate as markers of carbohydrate metabolism oxidative stage (the ratio of aerobic and anaerobic phases), and NAD⁺ and NADH₂ levels as mandatory participants of oxidation-reduction reactions and regulators of cell metabolism. Decreased NADH₂ index (0.002±0.0001 mmol/l) was determined in comparison with control group (0.01±0.0005 mmol/l). The NAD⁺ concentration (0.494±0.03 mmol/l) was significantly (P<0.05) increased in patients with HCV-infection in comparison with normal content, respectively (Figure 2 (B)). The NADH fluorescence did not change at low ADP in patients with HCV-infection. The production of reactive oxygen species (ROS) was very high in HCV-infections. An increased content of oxidized nicotinamide coenzymes was detected in patients with chronic hepatitis C.

Lactate and pyruvate parameters study has found the following. In patients of Group 1 lactate indexes exceeded the parameters of control group and amounted 2.12±0.23 and 1.89±0.45 mmol/l in comparison with control value (1.56±0.235 mmol/l). Pyruvate serum indexes were significantly lower than in the control group (0.056±0.011 mmol/l) and composed for patients with HCV-infections 0.031±0.012 mmol/l, respectively (Figure 2 (B)). Pyruvate, which re-oxidizes cytosolic NADH to

NAD⁺, completely abrogated the increases in HCV replication.

Conclusion

Mitochondrial division is a key determinant of mitochondrial quality control, and HCV modulates these key processes in the adaptation to cellular physiological perturbations associated with infection to promote viral persistence. Mitochondrial division is not invariably associated with cell death but can also protect cells from death induced by oxidative stress and Ca²⁺-dependent apoptotic stimuli. The mechanism by which enzymes for energy metabolism suppress the replication of the hepatitis C virus is not yet clear, but it probably includes calcium and dissociation of the mammalian replication complex. A detailed understanding of the mechanism by which energy enzymes suppress the replication of HCV infection requires additional research.

References

1. Kim S.J., Syed G.H., Siddiqui A. Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. // PLoS Pathog. – 2013. – T. 9(3). – P.1032-1085.
2. Korenaga M. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. // J Biol Chem. – 2005. – T. 280(45). – P. 37481–37488.

3. Piccoli C. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. // *Hepatology*. – 2007. – T. 46(1). – P.58–65.
4. Chan D.C. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. // *Annu Rev Genet*. – 2012. – T. 46. – P. 265–287.
5. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. // *Antioxid Redox Signal*. – 2009. – T. 11. – P. 1289–1299.
6. Berglund A. K. Nucleotide pools dictate the identity and frequency of ribonucleotide incorporation in mitochondrial DNA. / Berglund A. K., Navarrete C., Engqvist M. K., Hoberg E., Szilagy Z. // *PLoS Genet*. – 2017. – T.1. - 13:e1006628. 10.1371/journal.pgen.1006628.
7. Calvo S. E., Clauser K. R., Mootha V. K. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – T.44. – P.1251–1257. 10.1093/nar/gkv1003.
8. Copeland W. C., Longley M. J. Mitochondrial genome maintenance in health and disease. DNA. // *Rep*. – 2015. – T.19. – P.190–198. 10.1016/j.dnarep.2014.03.010.
9. Braverman N. E., Moser A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. // *Biochim. Biophys*. – 2013. – T. 1822. – P. 1442–1452. 10.1016/j.bbadis.2012.05.008.
10. Brites P., Waterham H. R., Wanders R. J. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. // *Biochim. Biophys*. – 2015. – T. Acta.1636. – P. 219–231. 10.1016/j.bbailip.2003.12.010.
11. Buchert R., Tawamie H., Smith C., Uebe S. A peroxisomal disorder of severe intellectual disability, epilepsy, and cataracts due to fatty acyl-CoA reductase 1 deficiency. // *Am. J. Hum. Genet*. – 2014. – T. 95. – P. 602–610. 10.1016/j.ajhg.2014.10.003.
12. Burdett K., Larkins L. K., Das A. K., Hajra A. K. Peroxisomal localization of acyl-coenzyme A reductase (long chain alcohol forming) in guinea pig intestine mucosal cells. // *J. Biol. Chem*. – T. 266. – P. 12201–12206.
13. Cheng J. B., Russell D. W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. // *J. Biol. Chem*. - 2004. – T. 279. – P. 37789–37797. 10.1074/jbc.M406225200.
14. Xing Du, Yi Li, Shu-Qun Liu Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models and methods // *Int J Mol Sci*. – 2016. – Vol.17(2). – P.144-147.

© Ізмайлова О.В.

УДК 575.1:611.08

АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ TLR2 (RS5743708) І TLR4 (RS4986790, RS4986791) ЗІ СТАНОМ ЗДОРОВ'Я ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ОСІБ*

Ізмайлова О.В.

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

Исследование однонуклеотидных полиморфизмов Toll-подобных рецепторов имеет важное прикладное и теоретическое значение для раскрытия механизмов формирования особенностей иммунитета и его коррекции. Целью работы было изучение имеющейся частоты полиморфных вариантов 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) и 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) гена TLR4 и оценка связи с состоянием здоровья практически здоровых лиц. Материалы и методы: в исследовании приняли участие 114 человек белой расы, проживающих в г. Полтава или Полтавской области минимум 2 года, которым проводился сбор анамнестических данных, данных объективного и клинического состояний. Определение полиморфных участков генов TLR2 (rs5743708) и TLR4 (rs4986790, rs4986791) осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР. Результаты распределения генотипов полиморфных вариантов 2258G/A гена TLR2 (rs5743708), 896A/G гена TLR4 (rs4986790), 1196C/T гена TLR4 (rs4986791) соответствовали теоретически ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,02$, $p=0,99$; $\chi^2=0,29$, $p=0,86$; $\chi^2=1,46$, $p=0,48$, соответственно). При сравнении наличия отдельных клинических проявлений, которые были отмечены при опросе, с наличием в генотипе полиморфных аллелей была установлена достоверная связь между наличием аллеля А в генотипе при полиморфном варианте гена TLR2 (rs5743708) с ревматизмом ($p = 0,05$), пиелонефритом ($p = 0,05$) и у лиц, имевших вредную привычку – курение ($p = 0,04$).

Ключевые слова: TLR, однонуклеотидный полиморфизм, генотип, лиганд, состояние здоровья

Toll-подібні рецептори (TLRs) відносяться до класу трансмембранних одноланцюгових сигнальних рецепторних білків, що розпізнають чужорідні для організму еволюційно консервативні молекулярні структури патогенів, які відомі як патоген-асоційовані молекулярні структури, та запускають каскад послідовних реакцій вродженого і антиген-специфічного адаптивного імунітету через сигнальні шляхи (MyD88-залежний і TRIF-залежний), у результаті чого відбувається експресія генів прозапальних цитокінів і модуляція запальної реакції організму [1].

Велика кількість наукових публікацій, що висвітлюють проблему розпізнавання чужорідних патогенних агентів, доводять провідну роль у цьому питанні TLRs, проте часом містять суперечливі дані стосовно впливу поліморфних варіантів генів, які кодують дані рецептори, на розпізнавання відповідних лігандів та інтенсивність імунної відповіді [2]. Генетична мінливість TLRs може визначати відмінності у сприйнятливості організмів до бактерій та вірусів, інтенсивність запального процесу [3].

Результатами досліджень, що проводилися групою дослідників підтверджена роль поліморфних варіантів генів TLR2 та TLR4 у чутливості до інфекцій та обтяженому перебігу таких захворювань, як atopічний дерматит зі схильністю до частих гострих респіраторних вірусних інфекцій [4], atopічна бронхіальна астма [5], урогенітальні захворювання [6], атеросклерозу [7].

У той же час, не був встановлений зв'язок між наявністю у генотипі поліморфних алелів 2258A гену TLR2 та 896G гену TLR4 і розвитком алергічного риніту [8].

Функціональний поліморфізм генів TLR, пов'язаний із заміною одиничних нуклеотидів (однонуклеотидний поліморфізм – ОНП). Ген TLR2 локалізований на дов-

гому плечі 4-ї хромосоми (4q32). При алейному варіанті rs5743708 (2258G/A) гена TLR2 відбувається заміна аргініну (Arg) глутаміном (Gln) у положенні 753 поліпептидного ланцюга. Це призводить до конфірмаційних змін у TIR-домені (внутрішньоклітинна частина рецептора), внаслідок чого втрачається можливість зв'язування внутрішньоклітинних адапторних молекул з цим доменом, порушується передача сигналу з рецептора, зменшується синтез прозапальних цитокінів і підвищується сприйнятливість до збудників інфекційних захворювань [9, 10].

Ген TLR4 локалізований на короткому плечі 9-ї хромосоми (9q33.1). Найбільше вивчені два несинонімічних алейних варіанта гена TLR4, що локалізовані у позаклітинному домені рецептора: rs4986790 (896A/G), який викликає заміну аспарагінової кислоти на гліцин в екзоні 3 у положенні 299 поліпептидного ланцюга та rs4986791 (1196C/T), заміну тирозину на ізолейцин у положенні 399. Дані ОНП призводять до порушення взаємодії рецептора з лігандами, внаслідок чого знижується імунна відповідь [10, 11].

Метою нашої роботи було вивчення наявної частоти поліморфних варіантів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) та 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) гену TLR4 та оцінка зв'язку зі станом здоров'я практично здорових осіб.

Дане дослідження проводилося згідно плану науково-дослідної роботи вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» «Визначення ролі поліморфізму Toll-подібних рецепторів у механізмах розвитку імунноопосередкованих захворювань», номер державної реєстрації 0109U001629.

* Цитування при атестації кадрів: Ізмайлова О.В. Аналіз зв'язку поліморфних варіантів генів TLR2 (rs5743708) і TLR4 (rs4986790, rs4986791) зі станом здоров'я практично здорових осіб // Проблеми екології і медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 11–16.

Матеріали та методи дослідження

Група, що була сформована, складалася зі 114 осіб білої раси, які проживали у м. Полтава чи Полтавській області щонайменше 2 роки: 25 (21,9%) осіб вказали місцем свого народження м. Полтаву чи Полтавську область, 83 (72,8%) особи народилися в інших регіонах України та 6 (5,3%) осіб народилися в іншій країні, хоча постійно проживають на території України. Група була врівноважена за віком і статтю: чоловіки – 51 (44,7%) особа, відповідно кількість осіб жіночої статі становила 63 (55,3%). Середній вік досліджуваних осіб склав $22,56 \pm 9,58$ років.

Збір анамнестичних даних, а також даних клінічного стану на час огляду і об'єктивних даних зі сторони різних органів та систем проводився на кафедрі внутрішньої медицини № 3 з фтизіатрією (завідувач кафедри – д.мед.н., професор І.П. Кайдашев). Отримані дані вносилися до карти спостереження учасника дослідження, яка первинно була розроблена співробітниками кафедри клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (завідувачка кафедри д.мед.н., професор В. В. Чоп'як).

Визначення поліморфних ділянок генів виконувалося на базі науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Усі дослідження проводилось із дозволу Комісії з етичних питань та біоетики, перед початком дослідження від усіх пацієнтів була отримана добровільна письмова згода на участь у науковому експерименті.

Матеріалом для дослідження була капілярна кров. Виділення геномної ДНК із лімфоцитів крові проводили із використанням системи пробоідготовки «ДНК-експрес» відповідно до рекомендацій фірми-виробника (НПФ «Литех», Росія).

Визначення алелей поліморфних ділянок генів TLR2 (rs5743708) і TLR4 (rs4986790, rs4986791) здійснювався методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із наступним аналізом довжин рестрикційних фрагментів продуктів ПЛР. Послідовність специфічних олігонуклеотидних праймерів, які синтезовані НВО «СибЭнзим» (Росія), температурні параметри приєднання праймерів, ендонуклеази рестрикції (НВО «СибЭнзим», Росія) взяті з літературних джерел [12, 13].

Статистичний аналіз отриманих даних проводили на персональному комп'ютері з використанням статистичного пакету програми «STATISTICA for Windows 6.0» (StatSoft Inc, США) і електронних таблиць MS Excel. Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга (PXB) із використанням критерію χ^2 при числі ступенів свободи рівному 2 ($df = 2$). Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Нами були проаналізовані дані, отримані шляхом опитування та проведення стандартного обстеження.

Виявлено, що 7 (6,1%) осіб раніше проживали у забрудненій, внаслідок Чорнобильської аварії, зоні, у 5 (4,4%) опитаних батьки родом із зони Чорнобильської атомної електростанції. Також 7 (6,1%) осіб вказа-

ли на зловживання алкоголем і 33 (28,9%) особи – на тютюнопаління.

При зборі анамнезу була встановлена обтяжена спадковість із ендокринними захворюваннями у 12 (10,5%) осіб, із алергічними захворюваннями також у 12 (10,5%) осіб, у 6 (5,3%) осіб у найближчих родичів в анамнезі були онкологічні захворювання, на наявність неврологічної патології у батьків вказали 2 (1,8%) особи, на наявність дифузних захворювань сполучної тканини – 1 (0,9%) особа. Не відмітили наявності спадкової схильності до різних хвороб 81 (71,0%) особа.

За материнською лінією, були встановлені такі захворювання, як гіпертонічна хвороба і варикозне розширення вен нижніх кінцівок (вказала 1 особа), хвороба Паркінсона (вказала 1 особа), захворювання щитоподібної залози (вказала 1 особа), інсульт (вказала 1 особа), туберкульоз (вказала 1 особа), бронхіальна астма (вказала 1 особа), онкологічні захворювання (вказала 1 особа). По лінії батька були відмічені: гіпертонічна хвороба (вказали 5 осіб), варикозне розширення вен нижніх кінцівок (вказала 1 особа), цукровий діабет (вказали 3 особи), хвороба Боткіна (вказали 2 особи), онкологічні захворювання (вказали 4 особи), туберкульоз (вказали 2 особи), ектодермальна дисплазія (вказала 1 особа).

Дані епідеміологічного анамнезу вказують на таку частоту захворюваності на гострі респіраторні захворювання: 1 раз на рік хворіють 29 (25,4%) обстежених осіб, 2 рази на рік – 33 (28,9%) опитаних, від 3 до 5 разів на рік хворіють 13 (11,4%) осіб та більше 5 разів на рік хворіють лише 2 особи (1,8%).

Серед інфекцій, що були перенесені раніше, переважали вітряна віспа – 64 (56,1%) опитаних осіб, краснуха – 29 (25,4%) осіб, шкірні вірусні (герпетичні) інфекції – 12 (10,5%) осіб, кір та інфекції шлунково-кишкового тракту – по 10 (8,8%) осіб, а також 8 (7,0%) осіб раніше хворіли на шкірні грибові інфекції, по 7 (6,1%) осіб вказали на перенесені раніше коклюш і паротит, по 3 (2,6%) особи – на інфекційні гепатити і шкірні бактеріальні інфекції, по 2 (1,8%) особи – на скарлатину, ревматизм, урогенітальні інфекції та геніальний герпес, крім того, на перенесені дифтерію, поліомієліт, інфекційний мононуклеоз, туберкульоз і нейроінфекції вказали по 1 (0,9%) особі.

Структура захворювань шкіри та слизових оболонок у даній групі була представлена кропив'янкою – вказали 6 (5,3%) із усіх опитаних осіб, дерматитом – 4 (3,5%) особи, гіперпігментацією – 9 (7,9%) осіб та пурпурою – 1 (0,9%) особа.

Серед захворювань сечовидільної системи були вказані цистит – 9 (7,9%) осіб та по 2 (1,8%) особи – енурез і пієлонефрит.

Одним із перспективних напрямів вивчення генетичної схильності до розвитку і/або особливостей перебігу імуноопосередкованих захворювань є встановлення алельних варіантів генів рецепторів вродженого імунітету, оскільки пошук генетичних маркерів є основою персоналізованої медицини, що дозволяє прогнозувати схильність до захворювання, його перебіг, а також розробку індивідуальних профілактичних і лікувальних заходів на основі використання імуномодуляторів – агоністів чи антагоністів TLRs.

Наступним етапом нашого дослідження стало вивчення частоти зустрічальності та відповідність розподілу генотипів поліморфних варіантів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) і 896A/G (rs4986790), 1196C/T

(rs4986791) гену TLR4 рівновазі Харді-Вайнберга (PXB) у досліджуваній групі.

У таблиці 1 представлені дані внутрішньогрупового аналізу розподілу генотипів та алелей поліморфних

варіантів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) і 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) гену TLR4.

Таблиця 1
Внутрішньогруповий аналіз розподілу частот генотипів і алелей поліморфних варіантів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) і 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) гену TLR4

Генотипи	Розподіл генотипів		Порівняння частот генотипів, що спостерігаються, з очікуваними (df = 2)		Коефіцієнт інбридингу популяції, F	Адекватне врахування рідкісних алелей, μ	Частка рідкісних алелей, h
	що спостерігаються, (n = 114)	очікувані	χ^2	p			
Поліморфізм 2258G/A гена TLR2							
GG	111 (97,37)	111,05	0,02	0,99	-0,01	1,23	0,39
GA	3 (2,63)	2,93					
AA	-	0,02					
Поліморфізм 896A/G гена TLR4							
AA	103 (90,35)	103,32	0,29	0,86	-0,05	1,43	0,29
AG	11 (9,65)	10,42					
GG	-	0,26					
Поліморфізм 1196C/T гена TLR4							
CC	103 (90,35)	102,26	1,46	0,48	0,12	1,45	0,28
CT	10 (8,77)	11,40					
TT	1 (0,88)	0,34					

Розподіл генотипів поліморфного варіанту 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) виявився наступним: генотип GG зустрічався у 111 (97,37%) осіб, GA – у 3 (2,63%) осіб, гомозиготний генотип AA не був виявлений у жодного з обстежуваних. Частота алелі G, при такому розподілі генотипів, становила 98,68%, а частота алелі A – 1,32%.

Дані, представлені на сайті Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI – The National Center for Biotechnology Information), вказують, що глобальна частота алелі A поліморфного варіанту 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) незначна і становить 0,68% [14]. Майже на таку саму загальну частоту зустрічальності алелі A (0,7%) вказують і на сайті Ensembl. На цьому ж таки сайті надана інформація стосовно розподілу частот алелей поліморфного варіанту 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) у популяції європейців, яка значно вища за глобальну і становить 2,4%. Розподіл за субпопуляціями значно різниться, а саме: частота алелі A серед іберійського населення Іспанії є найменшою і становить 0,5%, серед населення Тосканії – 1,9%, серед британців і шотландців – 2,7%, серед фінського населення – 3,0% [15].

Отримана нами частота алелі A (1,32%) є майже в два рази меншою за середню частоту, що зустрічається в популяції європейців, але також перевищує глобальну частоту алелі A поліморфного варіанту 2258G/A гена TLR2 (rs5743708).

При розрахунку очікуваної частоти генотипів були отримані наступні результати: розрахована частота генотипу GG склала 111,05; генотипу GA – 2,93 та генотипу AA – 0,02. Такий розподіл генотипів у групі відповідав очікуваному при PXB ($\chi^2 = 0,02$; p = 0,99). Показники врахування рідкісних алелей, який менше 2 ($\mu = 1,23$), та частка рідкісних алелей, що більша за нуль ($h = 0,39$) вказують на нерівномірний розподіл алелей. Про наближення до рівноваги генетичної структури даної вибірки також свідчить коефіцієнт інбридингу популяції, який наближався до нуля (F = -0,01).

Аналіз розповсюдженості поліморфного варіанту 896A/G гену TLR4 (rs4986790) показав, що генотип AA зустрічався у 103 (90,35%) осіб, генотип AG – у 11

(9,65%) осіб, генотип GG не був виявлений у даній групі. Частота алелі A становила 95,18%, а частота алелі G – 4,82%. Розрахунок очікуваної частоти генотипів у даній групі виявив співпадання з такою, що спостерігалася, та становив: генотип AA – 103,32; генотип AG – 10,42; генотип GG – 0,26, що відповідало теоретично очікуваному при PXB ($\chi^2 = 0,29$; p = 0,86).

Окрім цього, спостерігали нерівномірний розподіл алелей, оскільки показник врахування рідкісних алелей був 1,43, а частка рідкісних алелей становила 0,29. Коефіцієнт інбридингу вказував на незначний дефіцит гетерозигот (F = 0,05).

Деяко різнилися результати, які були отримані при проведенні досліджень із вивчення частоти зустрічальності поліморфного варіанту 896A/G гену TLR4 в інших регіонах України серед груп практично здорових осіб. Так, при обстеженні 285 жителів АР Крим генотип AA був виявлений у 85% осіб, генотип AG – у 14%, генотип GG – у 1% всіх обстежених [16].

Розподілі частот генотипів поліморфного локусу 1196C/T гену TLR4 (rs4986791) був таким: генотип CC виявлено у 103 (90,35%) осіб, генотип CT – у 10 (8,77%) та генотип TT – у 1 (0,88%) особи. За частотою алелей розподіл виявився наступним: частота алелі C становила 94,74%, а частота алелі T – 5,26%.

Розрахунок очікуваної частоти генотипів показав наступні результати: CC виявлено – 102,26, генотип CT – 11,40 та генотип TT – 0,34. Такий розподіл генотипів у групі відповідав очікуваному при PXB ($\chi^2 = 1,46$; p = 0,48). Показники врахування рідкісних алелей ($\mu = 1,45$) та частка рідкісних алелей ($h = 0,28$) вказують на нерівномірний розподіл алелей у даній групі. Коефіцієнт інбридингу свідчить про недостатність гетерозигот у популяції та становив 0,12.

Також, опираючись на дані NCBI та Ensembl, відомо, що глобальна частота алелі G при поліморфному варіанті 896A/G гена TLR4 (rs4986790) становить 5,99%, а глобальна частота алелі T при поліморфному варіанті 1196C/T гена TLR4 (rs4986791) – 4,07% [17, 18]. Розповсюдженість алелі G поліморфного варіанту гена TLR4 (rs4986790) серед європейців у середньому становить 5,7% та варіюється від 3,7% – у іберійського населення

Іспанії до 11,6% – у населення Фінляндії, у британців і шотландців дана алель зустрічається з частотою 4,4%, а у тосканців – із частотою 4,7%.

Частота, з якою зустрічається алель Т поліморфного варіанта 1196С/Т гена TLR4 (rs4986791) серед європейців, перевищує глобальну і складає 5,8%. Розподіл за субпопуляціями також сильно варіюється і є наступним: найвища частота виявлення алелі Т вказана для населення Фінляндії – 11,6%, серед іберійців та тосканців дана алель зустрічається з частотою 4,7%, найнижча частота вказана для британців і шотландців – 3,8% [19].

Отримані нами частоти алелей G поліморфного варіанту 896A/G гена TLR4 (rs4986790) та Т поліморфного варіанта 1196С/Т гена TLR4 (rs4986791) є дещо нижчими за середні частоти цих алелей серед населення Європи, проте суттєво не відрізнялися.

Подальше наше дослідження було спрямоване на порівняння наявності окремих клінічних проявів, що були відмічені при опитуванні, з наявністю у генотипі алелі А (носії генотипу GA) поліморфного варіанту гену TLR2 (rs5743708) (Таблиця 2).

Таблиця 2
Аналіз клінічних ознак при наявності у генотипі поліморфного варіанту гену TLR2 (rs5743708)

Наявність ознаки		Носії генотипу GG (n = 111)	Носії генотипу GA (n = 3)	p*
1		2	3	4
Мають шкідливу звичку – тютюнопаління	так	30	3	0,04
	ні	81	0	
В анамнезі гострі респіраторні захворювання 1-2 рази на рік	так	74	3	0,55
	ні	37	0	
Краснуха	так	27	2	0,32
	ні	84	1	
Кір	так	9	1	0,62
	ні	102	2	
Вітряна віспа	так	62	2	0,83
	ні	49	1	
Паротит	так	6	1	0,44
	ні	105	2	
Шкірні вірусні (герпетичні) інфекції	так	11	1	0,73
	ні	100	2	
Ревматизм	так	1	1	0,05
	ні	110	2	
Дерматит	так	3	1	0,21
	ні	108	2	
Пієлонефрит	так	1	1	0,05
	ні	110	2	

Було встановлено, що у носіїв алелі А (генотип GA) достовірно частіше спостерігалися запальні захворювання, що пов'язані з бактеріальною інфекцією, а саме ревматизм та пієлонефрит (p = 0,05). Усі три особи із генотипом GA гену TLR2 (rs5743708) мали шкідливу звичку – тютюнопаління (p = 0,04).

Також був проведений порівняльний аналіз наявних клінічних проявів із наявністю у генотипі алелі G (носії генотипу AG) поліморфного варіанту гену TLR4 (rs4986790) (Таблиця 3).

Таблиця 3
Аналіз клінічних ознак при наявності у генотипі поліморфного варіанту гену TLR4 (rs4986790)

Наявність ознаки		Носії генотипу AA (n = 105)	Носії генотипу AG (n = 9)	p*
Батьки із зони ЧАЕС	так	4	1	0,86
	ні	101	8	
Мають шкідливу звичку – тютюнопаління	так	31	2	0,94
	ні	74	7	
Наявність у близьких родичів ендокринних захворювань	так	10	2	0,53
	ні	95	7	
Наявність у близьких родичів алергічних захворювань	так	10	2	0,53
	ні	95	7	
В анамнезі гострі респіраторні захворювання 1-2 рази на рік	так	72	5	0,67
	ні	33	4	
Коклюш	так	5	2	0,17
	ні	100	7	
Скарлатина	так	1	1	0,37
	ні	104	8	
Краснуха	так	26	3	0,87
	ні	79	6	
Кір	так	9	1	0,72
	ні	96	8	

Наявність ознаки		Носії генотипу AA (n = 105)	Носії генотипу AG (n = 9)	p*
Вітряна віспа	так	57	7	0,31
	ні	48	2	
Паротит	так	5	2	0,17
	ні	100	7	
Інфекційний гепатит	так	2	1	0,57
	ні	103	8	
Шкірні вірусні (герпетичні) інфекції	так	11	1	0,61
	ні	94	8	
Інфекції шлунково-кишкового тракту	так	9	1	0,72
	ні	96	8	
Урогенітальні інфекції	так	1	1	0,37
	ні	104	8	
Нейроінфекції	так	0	1	0,12
	ні	105	8	
Кропив'янка	так	4	2	0,11
	ні	101	7	
Цистит	так	8	1	0,79
	ні	97	8	

Як видно з таблиці 3, не було виявлено достовірного зв'язку між наявністю алелі G у генотипі (носії генотипу AG) поліморфного варіанту гену TLR4 (rs4986790) та вказаними при опитуванні і перерахованими в таблиці анамнестичними даними.

Проаналізовано наявність окремих клінічних проявів у осіб, що є носіями іншого поліморфного варіан-

ту гену TLR4 (rs4986791). Оскільки тільки одна особа мала гомозиготний генотип ТТ, то для проведення аналізу ми об'єднали носіїв даного генотипу із носіями гетерозиготного генотипу СТ. Таким чином, кількість осіб, що є носіями поліморфної алелі Т становила 11 (Таблиця 4).

Таблиця 4
Аналіз клінічних ознак при наявності у генотипі поліморфного варіанту гену TLR4 (rs4986791)

Наявність ознаки		Носії генотипу CC (n = 103)	Носії алелі T (генотипи СТ і ТТ) (n = 11)	p*
Мають шкідливу звичку – тютюнопаління	так	29	4	0,83
	ні	74	7	
В анамнезі гострі респіраторні захворювання 1-2 рази на рік	так	69	8	0,96
	ні	34	3	
Коклюш	так	6	1	0,82
	ні	97	10	
Краснуха	так	27	2	0,83
	ні	76	9	
Вітряна віспа	так	57	7	0,84
	ні	46	4	
Інфекційні гепатити	так	2	1	0,68
	ні	101	10	
Шкірні грибкові інфекції	так	7	1	0,74
	ні	96	10	
Ревматизм	так	1	1	0,46
	ні	102	10	
Кропив'янка	так	5	1	0,91
	ні	98	10	
Цистит	так	7	2	0,46
	ні	96	9	
Пієлонефрит	так	1	1	0,46
	ні	102	10	

Порівняльний аналіз наявності в генотипі алелі Т (генотипи СТ і ТТ) гену TLR4 (rs4986791) із визначеними при опитуванні клінічними проявами окремих захворювань не виявив жодного достовірного зв'язку.

Отже, результатом проведеного дослідження зв'язку наявності у генотипі поліморфних варіантів генів TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986790, rs4986791) із загальним соматичним станом було виявлення достовірного зв'язку між наявністю алелі А у генотипі при поліморфному варіанті гену TLR2 (rs5743708) із рев-

матизмом (p = 0,05), пієлонефритом (p = 0,05) та у осіб, що мали шкідливу звичку – тютюнопаління (p = 0,04).

Література

1. Takeda K. Toll-Like Receptors / K. Takeda, S. Akira // Current protocols in immunology. – 2015. – Vol. 109, Issue 1. – P. 14.12.1-14.12.10.
2. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке Toll-подобных рецепторов человека / Л.В. Ковальчук, М.В. Хорева,

- А.С. Варивода [и др.] // Иммунология. – 2008. - № 4. – С. 223-227.
3. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* / Liadaki K., Petinaki E., Skoulakis C. [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2011. – Vol. 18, N. 2. – P. 217-222.
 4. Поліморфізм 896A/G гена TLR4, а не 1196C/T гена TLR4 ТА 2258G/A гена TLR2 визначає тяжкий та ускладнений перебіг atopічного дерматиту у дітей / Л. Ю. Левченко, О. В. Ізмайлова, О. А. Шликова [та ін.] // Цитологія і генетика. – 2013. - Т. 47, № 3. - С. 46-53.
 5. Роль поліморфізмів генів Толл-подібних рецепторів 2, 4 та білка клітин Клара в розвитку бронхіальної астми у дорослих / Н.В. Ляховська, О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова [та ін.] // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 71-75.
 6. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих уrogenітальних інфекцій / О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, Н.О. Боброва [та ін.] // Цитологія і генетика. – 2011. – Т. 45, № 4. – С. 29-35.
 7. Роль некоторых пародонтопатогенных микроорганизмов и Asp299Gly полиморфизма гена TLR4 в патогенезе атеросклероза / О.В. Скочко, Н.А. Боброва, О.В. Измайлова [и др.] // Жур. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. - № 5. – С. 83-86.
 8. Сакевич В.Д. Розповсюдженість гаплотипів поліморфних генів TLR2, TLR4, CLC-10 та їх зв'язок з окремими імунологічними показниками у хворих на алергічний риніт / В.Д. Сакевич // Проблеми екології та медицини. – 2013. – Вип. 17., № 5-6. – С. 16-23.
 9. Different patterns of Toll-like receptor 2 polymorphisms in populations of various ethnic and geographic origins / M. Ioana, V. Ferwerda, T.S. Plantinga [et al.] // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 80, No. 5. – P. 1917-1922.
 10. Генетические факторы (гены рецепторов врожденного иммунитета – TLRs) в патогенезе атеросклероза и его осложнений / И.И. Жидкова, А.В. Понасенко, М.В. Хуторная [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 241-254.
 11. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases / C.R. Balistreri, G. Colonna-Romano, D. Lio, [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2009. – Vol. 29. – P. 406-415.
 12. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for gram-negative and haematogenous osteomyelitis / A.H. Montes, V. Asensi, V. Alvarez [et al.] // J. Clin. Exp. Immunol. – 2006. – Vol. 143 (3). – P. 404-413.
 13. Erridge C. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling / C. Erridge, J. Stewart, I.R. Poxton // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 197 (12). – P.1787-1791.
 14. Режим доступу до сайту: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TLR2>.
 15. Режим доступу до сайту: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=4:153704665-153705665;v=rs5743708;vdb=variation;vf=3234468#population_freq_EUR.
 16. Asp299Gly Polymorphism of the TLR-4 Gene in Adult Patients with Fixed and with Reversible Airflow Obstruction in the Population of Crimea, Ukraine / Yuriy Bisyuk, A. Kurchenko, O. Akhtemiichuk [et al.] // J. of Allergy and Clin. Immunol. – 2017. – Vol. 139 (2). – P. AB198.
 17. Режим доступу до сайту: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TLR4>.
 18. Режим доступу до сайту: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:117712524-117713524;v=rs4986790;vdb=variation;vf=3210403_
 19. Режим доступу до сайту: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:117712824-117713824;v=rs4986791;vdb=variation;vf=3210404_.

Матеріал надійшов до редакції 1.03.2018

ENGLISH VERSION: ANALYSIS OF ASSOCIATION BETWEEN THE POLYMORPHIC VARIANTS OF THE TLR2 (RS5743708) AND TLR4 (RS4986790, RS4986791) GENES WITH THE HEALTH STATUS OF APPARENTLY HEALTHY INDIVIDUALS*

Izmailova O.V.

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

The study of single-nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors has an important applied and theoretical value for revealing the mechanisms in formation of immunity features and its correction. The aim of the research was to study the available frequency of polymorphic variants of the TLR2 gene (rs5743708) and 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) of the TLR4 gene, and to assess the association with the health status of apparently healthy individuals. Materials and methods: the study involved 114 Caucasian individuals living in Poltava or Poltava oblast for a minimum of 2 years, who underwent the collection of anamnestic data, as well as the data of objective and clinical examinations. The polymorphic sites of the TLR2 (rs5743708) and TLR4 genes (rs4986790, rs4986791) were determined by polymerase chain reaction (PCR) followed by analysis of the restriction fragments length of the PCR products. The results of distribution of polymorphic variants 2258G/A in the genotypes of the TLR2 gene (rs5743708), 896A/G of the TLR4 gene (rs4986790), and 1196C/T of the TLR4 gene (rs4986791) corresponded to the theoretically expected ones at the Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.02, p = 0.99$; $\chi^2 = 0.29, p = 0.86$; $\chi^2 = 1.46, p = 0.48$, respectively). When comparing the presence of individual clinical manifestations that were detected during the interviewing, with the presence of polymorphic alleles in the genotype, a reliable relationship was established between the presence of the A allele in the polymorphic version of the TLR2 gene (rs5743708) in the genotype with rheumatism ($p = 0.05$), pyelonephritis ($p = 0.05$) and a bad habit of smoking ($p = 0.04$).

Key words: TLR, single nucleotide polymorphism, genotype, ligand, state of health

Toll-like receptors (TLRs) belong to the class of transmembrane single-chain signal receptor proteins that recognize foreign evolutionarily conservative molecular structures of pathogens, known as pathogen-associated molecular structures and trigger the cascade of sequential reactions of congenital and antigen-specific adaptive immunity through signaling pathways (MyD88-dependent and TRIF-dependent), resulting in the expression of genes of proinflammatory cytokines and modulation of the inflammatory response of the body [1].

A large number of research publications covering the problem of recognizing foreign pathogens prove the leading role of TLRs in this issue, but sometimes contain controversial data regarding the influence of polymorphic variants of genes encoding these receptors on the recognition of the corresponding ligands and the intensity of the immune response [2]. Genetic variability of TLRs can determine the differences in the susceptibility of organisms to bacteria and viruses, the intensity of the inflammatory process [3].

The results of studies, conducted by a group of researchers, confirmed the role of polymorphic variants of the TLR2 and TLR4 genes in the sensitivity to infections and aggravated course of such diseases as atopic dermatitis with a predisposition to frequent acute respiratory viral infections [4], atopic bronchial asthma [5], urogenital diseases [6], atherosclerosis [7].

At the same time, the association between the presence of polymorphic alleles in 2258A genotype of the TLR2 gene and 896G of the TLR4 gene with the development of allergic rhinitis has not been established [8].

Functional polymorphism of the TLR genes, associated with replacement of single nucleotides (single nucleotide polymorphism – SNP). The TLR2 gene is localized on the long shoulder of the 4th chromosome (4q32). In the allelic variant of rs5743708 (2258G/A) of the TLR2 gene, there is a replacement of arginine (Arg) with glutamine (Gln) at position 753 of the polypeptide chain. This leads to confirmatory changes in the TIR domain (the in-

tracellular part of the receptor), resulting in the loss of the ability to bind intracellular adapter molecules to this domain, the transmission of signal from the receptor is disrupted, the synthesis of proinflammatory cytokines and the susceptibility to pathogens of infectious diseases are increased [9, 10].

The TLR4 gene is localized on the short shoulder of the 9th chromosome (9q33.1). The most studied are two non-synonymic allelic variants of the TLR4 gene, localized in the extracellular domain of the receptor: rs4986790 (896A/G), which causes the aspartic acid to be replaced with glycine in exon 3 at position 299 of the polypeptide chain and rs4986791 (1196C/T), the replacement of tyrosine with isoleucine in position 399. These SNP result in the disruption of the receptor interaction with ligands, which leads to the reduction of the immune response [10, 11].

The aim of the present research was to study the available frequency of polymorphic variants 2258G/A of the TLR2 gene (rs5743708) 896A/G (rs4986790), and 1196C/T (rs4986791) of the TLR4 gene, and to assess the association with the health status of apparently healthy individuals.

This study was conducted in accordance with the plan of research work of Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy» «Determining the role of polymorphism of Toll-like receptors in the mechanisms of development of immune-mediated diseases», the state registration number 0109U001629.

Materials and methods of research

The formed group consisted of 114 Caucasian men who had lived in Poltava or Poltava oblast for at least 2 years: 25 (21.9%) people indicated their place of birth in Poltava or Poltava oblast, 83 (72.8%) individuals were born in other regions of Ukraine and 6 (5.3%) respondents were born in another country, although they live permanently in the territory of Ukraine. The group was

* To cite this English version: O.V. Izmailova Analysis of association between the polymorphic variants of the TLR2 (rs5743708) and TLR4 (rs4986790, rs4986791) genes with the health status of apparently healthy individuals. // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 17–22.

balanced by age and gender: males – 51 (44.7%), females – 63 (55.3%). The average age of the subjects was 22.56 ± 9.58 years.

Collection of anamnestic data, as well as clinical data at the time of examination and objective data on the part of various organs and systems, was conducted at the Department of Internal Medicine No. 3 with Phthysiology. The received data was entered into the observation card of the participant of the study, which was originally developed by the staff of the Department of Clinical Immunology and Allergology of Danylo Halytskyi National Medical University of Lviv.

Determining the polymorphic sites of genes was carried out on the basis of the Research Institute of Genetic and Immunological Foundations of the Development of Pathology and Pharmacogenetics of Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy».

All studies were conducted with the permission of the Ethics and Bioethics Committee; before the study, all volunteers signed a written consent to participate in the scientific experiment.

The capillary blood was the material for the study. The isolation of genomic DNA from blood lymphocytes was carried out using the DNA-Express test system in accordance with the recommendations of the manufacturer (NPF "Litech", Russia).

Identifying the alleles of polymorphic sites of TLR2 (rs5743708) and TLR4 gene (rs4986790, rs4986791) was carried out by polymerase chain reaction (PCR) followed by analysis of restriction fragment length of PCR products. The sequence of specific oligonucleotide primers which are synthesized NGO "SybEnzym" (Russia), temperature settings accession primers, restriction endonuclease (Scientific and Production Association "SibEnzim", Russia) taken from the scientific literature [12, 13].

The statistical analysis of the data was performed on a personal computer using the STATISTICA for Windows 6.0 (StatSoft Inc., USA) and MS Excel spreadsheets. The genotypic distribution of the studied polymorphic loci was checked for compliance with the Hardy-Weinberg equation (PCV) using the χ^2 criterion for degrees of freedom equal to 2 ($df = 2$). The exact two-sided Fischer criterion (for small groups) was used to assess the validity of the differences between the groups. Statistically significant differences were considered at $p < 0.05$.

Results and discussion

We analyzed the data obtained through interviews and standard examination.

It was revealed that 7 (6.1%) respondents previously lived in the polluted area due to Chernobyl accident, and 5 (4.4%) had parents from the area of Chernobyl nuclear power plant. Furthermore, 7 (6.1%) people indicated alcohol abuse and 33 of them (28.9%) were smokers.

In the collection of anamnesis, a complicated heredity with endocrine diseases was detected in 12 (10.5%) people, with allergic diseases in 12 (10.5%) people, in 6 (5.3%) respondents the immediate family had oncological disease in the anamnesis, 2 (1.8%) respondents indicated the presence of neurological pathology in their parents, the presence of diffuse connective tissue diseases

– 1 (0.9%) person. 81 (71.0%) people reported no hereditary predisposition to various diseases.

According to the maternal line, we detected such diseases as hypertension and varix dilatation of the lower limbs (indicated by 1 person), Parkinson's disease (indicated by 1 person), thyroid disease (indicated by 1 person), stroke (indicated by 1 person), tuberculosis (indicated 1 person), bronchial asthma (indicated by 1 person), oncological diseases (indicated by 1 person). According to the paternal line, we detected: hypertension (indicated by 5 people), varix dilatation of the lower limbs (indicated by 1 person), diabetes mellitus (indicated by 3 respondents), Botkin's disease (indicated by 2 people), cancer (indicated by 4 respondents), tuberculosis (indicated by 2 people), ectodermal dysplasia (indicated by 1 person).

The data of the epidemiological history indicate the incidence of acute respiratory diseases: once a year – 29 (25.4%) of the examined respondents, twice a year – 33 (28.9%) of respondents, from 3 to 5 times a year – 13 (11.4%) people and more than 5 times a year – only 2 respondents (1.8%).

Among the infections that had been transmitted earlier, chicken pox was prevalent – 64 (56.1%) respondents, rubella – 29 (25.4%), herpes infections – 12 (10.5%), measles and infections of the gastrointestinal tract – 10 (8.8%), as well as 8 (7.0%) people with past cutaneous fungal infections, 7 (6.1%) people reported having had a history of pertussis and parotitis, 3 (2.6%) respondents – infectious hepatitis and bacterial skin infections, 2 (1.8%) – scarlet fever, rheumatism, urogenital infections and genital herpes, in addition, diphtheria, poliomyelitis, infectious mononucleosis, tuberculosis and neuroinfections were reported by 1 (0.9%) person each.

The structure of diseases of the skin and mucous membranes in this group was represented by hives – 6 (5.3%) of all interviewed individual, 4 (3.5%) respondents – with dermatitis, 9 (7.9%) – with hyperpigmentation and purpura – 1 (0.9%) person.

Among the diseases of the urinary system there were cystitis – 9 (7.9%), enuresis and pyelonephritis – 2 (1.8%) respondents.

One of the promising directions for studying the genetic predisposition to the development and / or characteristics of the course of immunoregulatory diseases is the establishment of allelic variants of the genes of the innate immune receptors, since the search for genetic markers is the basis of personalized medicine, which allows predicting the susceptibility to disease, its course, as well as the development of individual preventive and therapeutic measures based on the use of immunomodulators – agonists or antagonists of TLRs.

The next step in our research was to study the frequency of occurrence and compliance in distribution of the genotypes of the 2258G/A polymorphic variants of the TLR2 (rs5743708) and 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) of the TLR4 gene with the Hardy-Weinberg equation in the study group.

Table 1 presents the inter-group analysis of the distribution of genotypes and alleles of the polymorphic variants 2258G/A TLR2 (rs5743708) and 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) of the TLR4 gene.

Table 1

The inter-group analysis of the frequency distribution of genotypes and alleles of the polymorphic variants 2258G/A gene of TLR2 (rs5743708) and 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) of the TLR4 gene

Genotypes	Genotypes distribution		Comparison of observed frequencies of genotypes with the expected ones (df = 2)		Coefficient of population inbreeding, F	Adequate consideration of rare alleles, μ	Part rare alleles, h
	observed (n = 114)	expected	χ^2	p			
The 2258G/A polymorphism of the TLR2 gene							
GG	111 (97.37)	111.05	0.02	0.99	-0.01	1.23	0.39
GA	3 (2.63)	2.93					
AA	-	0.02					
The 896A/G polymorphism of the TLR4 gene							
AA	103 (90.35)	103.32	0.29	0.86	-0.05	1.43	0.29
AG	11 (9.65)	10.42					
GG	-	0.26					
The 1196C/T polymorphism of the TLR4 gene							
CC	103 (90.35)	102.26	1.46	0.48	0.12	1.45	0.28
CT	10 (8.77)	11.40					
TT	1 (0.88)	0.34					

The distribution of the genotypes of the polymorphic variant of 2258G/A of the TLR2 gene (rs5743708) was as follows: the GG genotype was found in 111 (97.37%) respondents, GA – in 3 (2.63%), the homozygous genotype AA was not detected in any of the subjects. The allele G frequency with this distribution of genotypes was 98.68%, and the allele A frequency was 1.32%.

The data presented at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website indicates that the global allele A of the polymorphic variant of the 2258G/A of the TLR2 gene (rs5743708) is negligible and is 0.68% [14]. Almost the same common frequency of occurrence of A (allele 0.7%) is also indicated at the Ensembl website. At the same site, there is information on the frequency distribution of the alleles of the polymorphic variant 2258G/A of the TLR2 gene (rs5743708) in the European population, which is considerably higher than the global one and is 2.4%. The distribution of subpopulations varies considerably, namely: the frequency of the A allele among the Iberian population of Spain is the lowest and is 0.5%, among the population of Tuscany – 1.9%, among the British and Scots – 2.7%, among the Finnish population – 3.0% [15]. The frequency of the A allele (1.32%) obtained by us is almost twice less than the average frequency found in the Europeans population, but also exceeds the global A allele frequency of the 2258G/A polymorphic variant of the TLR2 gene (rs5743708).

In calculating the expected frequency of genotypes, the following results were obtained: the calculated frequency of GG genotype was 111.05; GA genotype – 2.93 and AA genotype – 0.02. Such a distribution of genotypes in the group corresponded to that expected at Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.02$; p = 0.99). Rare allele counting less than 2 ($\mu = 1.23$) and the proportion of rare alleles above zero (h = 0.39) indicate uneven distribution of alleles. The approximation to the equilibrium of the genetic structure of this sample is also evidenced by the population inbreeding rate approaching zero (F = -0.01).

The analysis of prevalence of polymorphic variant 896A/G of the TLR4 gene (rs4986790) showed that the AA genotype was found in 103 (90.35%) people, AG genotype – in 11 (9.65%), GG genotype was not found in this group. The allele A frequency was 95.18%, and the allele G frequency was 4.82%. The calculation of the ex-

pected frequency of genotypes in the given group showed a coincidence with the observed one and was: AA genotype – 103.32; AG genotype – 10.42; GG genotype – 0.26, which corresponded to the theoretically expected at Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.29$; p = 0.86).

In addition, an uneven distribution of alleles was observed, since the rate of inclusion of rare alleles was 1.43, and the proportion of rare alleles was 0.29. The inbreeding rate indicated an insignificant heterozygotes deficiency (F = 0.05).

The results obtained in studies on the frequency of occurrence of the polymorphic variant 896A/G of the TLR4 gene in other regions of Ukraine among the groups of apparently healthy individuals somewhat differed. Thus, when examining 285 inhabitants of Crimea, AA genotype was detected in 85% of people, AG genotype – in 14%, GG genotype – in 1% of all respondents [16].

The distribution of the frequencies of genotypes of the polymorphic locus 1196C/T of the TLR4 gene (rs4986791) was as follows: the SS genotype was found in 103 (90.35%) people, the ST genotype – in 10 (8.77%) and the TT genotype – in 1 (0.88%) person. By the frequency of alleles, the distribution was as follows: the C allele frequency was 94.74%, and the T allele frequency was 5.26%.

The calculation of the expected frequency of genotypes showed the following results: CC genotype – 102.26, CT genotype – 11.40 and TT genotype – 0.34. Such a distribution of genotypes in the group corresponded to that expected at Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 1.46$; p = 0.48). Indicators for the inclusion of rare alleles ($\mu = 1.45$) and the proportion of rare alleles (h = 0.28) indicate uneven distribution of alleles in this group. The inbreeding rate indicates insufficient heterozygotes in the population and was 0.12.

Moreover, based on the NCBI and Ensembl data, it is known that the global frequency of G allele in the polymorphic variant 896A/G of the TLR4 gene (rs4986790) is 5.99%, and the global frequency of T allele of the TLR4 (rs4986791) polymorphic variant 1196C/T gene of the TLR4 gene (rs4986790) is 4.07% [17, 18]. The prevalence of the G allele of the polymorphic variant of the TLR4 gene (rs4986790) among the Europeans is on average 5.7% and varies from 3.7% – from the Iberian population of Spain to

11.6% – in the population of Finland, in British and Scots this allele is found with a frequency of 4.4%, and Tuscans – with a frequency of 4.7%.

The frequency with which the T allele of the polymorphic variant of the TLR4 gene (rs4986791) is found among Europeans exceeds the global one and is 5.8%. The distribution by subpopulation also varies greatly and is as follows: the highest frequency of T allele is indicated for the population of Finland – 11.6%, among the Iberians and Tuscans, this allele is found at 4.7%, the lowest frequency is for British and Scots – 3.8% [19].

The obtained frequencies of G alleles of the polymorphic variant 896A/G of the gene TLR4 (rs4986790) and the T-polymorphic variant 1196C/T of the TLR4 gene (rs4986791) are slightly lower than the average frequencies of these alleles among the European population, but did not differ significantly.

Our further study was aimed at comparing the presence of certain clinical manifestations, which were noted during the interviewing, with the presence of the A allele in the genotype (carriers of GA genotype) polymorphic variant of the gene TLR2 (rs5743708) (Table 2).

Table 2
Analysis of clinical signs in the presence of polymorphic variant of the TLR2 gene (rs5743708) in the genotype

The presence of the sign		Carriers of GG genotype (n = 111)	Carriers of GA genotype (n = 3)	p [*]
1		2	3	4
A bad habit of smoking	yes	30	3	0.04
	no	81	0	
Acute respiratory diseases in the anamnesis – 1-2 times a year	yes	74	3	0.55
	no	37	0	
Rubeola	yes	27	2	0.32
	no	84	1	
Measles	yes	9	1	0.62
	no	102	2	
Chicken pox	yes	62	2	0.83
	no	49	1	
Parotitis	yes	6	1	0.44
	no	105	2	
Skin viral (herpetic) infections	yes	11	1	0.73
	no	100	2	
Rheumatism	yes	1	1	0.05
	no	110	2	
Dermatitis	yes	3	1	0.21
	no	108	2	
Pyelonephritis	yes	1	1	0.05
	no	110	2	

It was found that in carriers of the A allele (genotype GA) had significantly more cases of inflammatory diseases associated with bacterial infection, namely rheumatism and pyelonephritis (p = 0.05). All three people with the GA genotype of the TLR2 gene (rs5743708) had a bad habit of smoking (p = 0.04).

Further, a comparative analysis of existing clinical manifestations with the presence of the G allele in the genotype (carriers of AG genotype) of the polymorphic variant of the TLR4 gene (rs4986790) was performed (Table 3).

Table 3
Analysis of clinical signs in the presence of polymorphic variant of the TLR4 gene (rs4986790) in the genotype

The presence of the sign		Carriers of AA genotype (n = 105)	Carriers of AG genotype (n = 9)	p [*]
Parents from the area of Chernobyl nuclear power plant	yes	4	1	0.86
	no	101	8	
A bad habit of smoking	yes	31	2	0.94
	no	74	7	
The presence of endocrine diseases in close relatives	yes	10	2	0.53
	no	95	7	
The presence of allergic diseases in close relatives	yes	10	2	0.53
	no	95	7	
Acute respiratory diseases in the anamnesis – 1-2 times a year	yes	72	5	0.67
	no	33	4	
Pertussis	yes	5	2	0.17
	no	100	7	
Scarlet fever	yes	1	1	0.37
	no	104	8	
Rubeola	yes	26	3	0.87
	no	79	6	
Measles	yes	9	1	0.72
	no	96	8	

The presence of the sign		Carriers of AA genotype (n = 105)	Carriers of AG genotype (n = 9)	p [*]
Chicken pox	yes	57	7	0.31
	no	48	2	
Parotitis	yes	5	2	0.17
	no	100	7	
Infectious hepatitis	yes	2	1	0.57
	no	103	8	
Skin viral (herpetic) infections	yes	11	1	0.61
	no	94	8	
Infections of the gastrointestinal tract	yes	9	1	0.72
	no	96	8	
Urogenital infections	yes	1	1	0.37
	no	104	8	
Neuroinfections	yes	0	1	0.12
	no	105	8	
Hives	yes	4	2	0.11
	no	101	7	
Cystitis	yes	8	1	0.79
	no	97	8	

As can be seen from Table 3, no reliable association was found between the presence of the G allele in the genotype (carriers of the AG genotype) of the polymorphic variant of the TLR4 gene (rs4986790) and data, reported during the interviewing and listed in the table.

The presence of individual clinical manifestations in individuals who are carriers of another polymorphic vari-

ant of the TLR4 gene (rs4986791) has been analyzed. Since only one person had the homozygous TT genotype, we combined the carriers of this genotype with carriers of the heterozygous CT genotype. Thus, the number of individuals carrying the polymorphic allele T was 11 (Table 4).

Table 4
Analysis of clinical signs in the presence of polymorphic variant of the TLR4 gene (rs4986791) in the genotype

The presence of the sign		Carriers of CC genotype (n = 103)	Carriers of the T allele (CT and TT genotypes) (n = 11)	p [*]
A bad habit of smoking	Yes	29	4	0.83
	no	74	7	
Acute respiratory diseases in the anamnesis – 1-2 times a year	Yes	69	8	0.96
	no	34	3	
Pertussis	Yes	6	1	0.82
	no	97	10	
Rubeola	Yes	27	2	0.83
	no	76	9	
Chicken pox	Yes	57	7	0.84
	no	46	4	
Infectious hepatitis	Yes	2	1	0.68
	no	101	10	
Skin fungal infections	Yes	7	1	0.74
	no	96	10	
Rheumatism	Yes	1	1	0.46
	no	102	10	
Hives	Yes	5	1	0.91
	no	98	10	
Cystitis	yes	7	2	0.46
	no	96	9	
Pyelonephritis	Yes	1	1	0.46
	no	102	10	

A comparative analysis of the presence of the allele T in the genotype (CT and TT genotypes) of the TLR4 gene (rs4986791) with definite clinical manifestations of individual diseases did not reveal any reliable association.

Thus, the result of the conducted study of the presence of association in the genotypes of polymorphous variants of the TLR2 (rs5743708), TLR4 (rs4986790, rs4986791) genes with a general somatic state was the detection of a reliable link between the presence of the A

allele in the genotype of the polymorphic variant of the TLR2 gene (rs5743708) with rheumatism (p = 0.05), pyelonephritis (p = 0.05), and a bad habit of smoking (p = 0.04).

References

1. [Takeda K.](#) Toll-Like Receptors / [K. Takeda](#), S. Akira // Current protocols in immunology. – 2015. – Vol. 109, Issue 1. – P. 14.12.1-14.12.10.

2. Receptors of congenital immunity: approaches to quantitative and functional evaluation of Toll-like human receptors / L.V. Kovalchuk, M.V. Khorev, A.S. Varivoda [and others] // *Immunology*. – 2008. – № 4. – P. 223-227.
3. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* / Liadaki K., Petinaki E., Skoulakis C. [et al.] // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2011. – Vol. 18, N. 2. – P. 217-222.
4. 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. 46-53.
5. The role of polymorphisms of Toll-like receptors genes 2, 4 and Clara cells in the development of bronchial asthma in adults / N.V. Lyakhovskaya, O.V. Izmailova, O.A. Shlykova, I.P. Kaidashev // *Problems of ecology and medicine*. – 2013. – Vol. 17, № 5-6. – P. 71-75.
6. Relationship of TLR2 and TLR4 gene polymorphism with a penchant for individual urogenital infections / Izmailova O.V., Shlykova O.A., Bobrova N.O., Kaidashev I.P. // *Tsitol Genet.* – 2011. – Vol. 45, № 4. – P. 29-35.
7. . 2011 Sep-Oct;(5):83-6.
8. Role of several periodontopathogenic microorganisms and tlr4 gene Asp299Gly polymorphism in atherosclerosis pathogenesis / Skochko O.V., Bobrova N.A., Izmaylova O.V, Kaidashev I.P. // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* – 2011. – № 5. – P. 83-86.
9. Sakevich V.D. The prevalence of haplotypes of TLR2, TLR4, CLC-10 polymorphic genes and their association with individual immunological parameters in patients with allergic rhinitis / V.D. Sakevich // *Problems of ecology and medicine*. – 2013. – Vol. 17, № 5-6. – P. 16-23.
10. Different patterns of Toll-like receptor 2 polymorphisms in populations of various ethnic and geographic origins / M. Ioana, B. Ferwerda, T.S. Plantinga [et al.] // *Infect. Immun.* – 2012. – Vol. 80, No. 5. – P. 1917-1922.
11. Genetic factors (genes of receptors of congenital immunity – TLRs) in the pathogenesis of atherosclerosis and its complications / I.I. Zhidkova, A.V. Ponasenko, M.V. Khutornaya [et al] // *Medical immunology*. – 2017. – T. 19, № 3. – P. 241-254.
12. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases / C.R. Balistreri, G. Colonna-Romano, D. Lio, [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 406-415.
13. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for gram-negative and haematogenous osteomyelitis / A.H. Montes, V. Asensi, V. Alvarez [et al.] // *J. Clin. Exp. Immunol.* – 2006. – Vol. 143 (3). – P. 404-413.
14. Erridge C. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling / C. Erridge, J. Stewart, I.R. Poxton // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 197 (12). – P.1787-1791.
15. Mode of access to the website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TLR2>.
16. Mode of access to the website: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=4:153704665-153705665;v=rs5743708;vdb=variation;vf=3234468#population_freq_EUR.
17. Asp299Gly Polymorphism of the TLR-4 Gene in Adult Patients with Fixed and with Reversible Airflow Obstruction in the Population of Crimea, Ukraine / Yu. Bisyuk, A. Kurchenko, O. Akhtemiichuk [et al.] // *J. of Allergy and Clin. Immunol.* – 2017. – Vol. 139 (2). – P. AB198.
18. Mode of access to the website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TLR4>.
19. Mode of access to the website: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:117712524-117713524;v=rs4986790;vdb=variation;vf=3210403.
20. Mode of access to the website: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=9:117712824-117713824;v=rs4986791;vdb=variation;vf=3210404.

© Мормоль І.А., Борзих О.А., Кайдашев І.П.
УДК 616-001:616.25-003.215

ОСОБЛИВОСТІ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ХВОРИХ ІЗ ПОЛІТРАВМОЮ*

Мормоль І.А., Борзих О.А., Кайдашев І.П.

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

Актуальність питання своєчасної діагностики і лікування політравми на сьогоднішній день остається важливим. Політравма - серйозний патологічний процес, який включає одночасне початок і розвиток кількох патологічних станів і характеризується основними порушеннями всіх видів обміну речовин, змінами центральної нервової системи, серцево-судинної і дихальної. Даний клінічний випадок доводить нам цілісність розробки персоналізованого підходу до ведення пацієнтів з політравмою, використовуючи індивідуальні алгоритми.

Ключеві слова: політравма, гемопневмоторакс, тактика лікування

Політравма — сукупність травм, які характеризуються значними змінами структури та функції органів і систем органів. Крім механічних пошкоджень, на стан постраждалого може мати вплив ряд інфекційних ускладнень. Політравми відрізняються особливою важкістю клінічних проявів, що супроводжуються розладом життєво-важливих функцій організму, складністю діагностики та лікування, великим процентом інвалідності і високою летальністю. Подібні пошкодження часто супроводжуються травматичним шоком, великою крововтратою, розладом кровообігу і дихання, інколи термінальним станом. При політравмі перебіг травматичної хвороби особливо важкий, а характер домінуючого пошкодження може змінюватися [1,2].

Термін «політравма» є збірним поняттям, що включає такі види пошкоджень: множинні, поєднані і комбіновані.

До множинних механічних травм відносять пошкодження двох і більш внутрішніх органів в одній порожнині (поранення тонкої і товстої кишок, розрив печінки і селезінки, пошкодження обох нирок), травми в межах двох і більш анатомо-функціональних утворень опорно-рухової системи (перелом стегна, перелом обох п'яткових кісток).

Поєднана травма — пошкодження внутрішніх органів в різних порожнинах (травма легень і печінки, струс головного мозку і травма нирки), або пошкодження внутрішніх органів і опорно-рухового апарату (пошкодження органів грудної порожнини і перелом кісток кінцівок, черепно-мозкова травма, пошкодження тазових кісток та ін.).

Комбінована травма — це одночасна дія на потерпілого двох і більш факторів: перелом і опік стегна; гостра променева хвороба і перелом хребта. Іншими словами, механічні травми можуть входити до складу комбінованих пошкоджень як один із складових компонентів [3].

Політравма перш за все характеризується пошкодженням опорно-рухової системи. За даними деяких авторів вона переважає у молодих людей (53%, переважно чоловіки) віком 14-45 років. Основною причиною травмування є дорожні аварії — 80,6%.

При політравмі множинні ушкодження опорно-рухової системи уражають нижні кінцівки у 49,4% ви-

падках, верхні — у 33,2%, таз — у 14,1%. Крім цих травм 75% пацієнтів мають супутні пошкодження: голова і мозок — у 92,2%, грудна клітка — у 31,5%, живіт — у 21,3%.

При лікуванні хворих із політравмою найважливішими принципами є запобігання смерті пацієнта від шоку і крововтрати та запобігання ускладненням у ранньому періоді від поліорганної недостатності та сепсису [4].

За даними ВООЗ щоденно внаслідок травм гине близько 16 тис. осіб, щорічно - 300 тис. працездатних людей, а 7-8 млн. стає інвалідами.

За останні 10 років смертність від травм в Україні збільшилася на 38,7%. За даними МОЗ України від травм щорічно гине 31-44 тис. осіб, з них - 20-25% - від поєднаної травми.

Частота політравми в останні роки складає 5,5-35% серед всіх травмованих пацієнтів.

Летальність при політравмі складає 12,2-63,4%, з них: в перші 24-48 годин помирає 65,1-70,0% потерпілих (з них - 35,0% в перші 15 хвилин від моменту травми). [8]

В економічно розвинутих країнах травматизм займає 3 місце серед причин смертності після онкологічних та серцево-судинних захворювань.

Поліморфізм пошкоджень не дозволяє в повному об'ємі регламентувати об'єм і порядок застосування інструментальних обстежень. Загалом діагностична програма включає:

1. загальноклінічні обстеження;
2. катетеризацію сечового міхура;
3. обробка ран з їх ревізією;
4. ультразвукове дослідження;
5. рентгенографію ОГК і черевної порожнини;
6. торако- і лапароцентез;
7. діагностичну лапароскопію.

Орієнтовний перелік першочергових діагностичних тестів у пацієнта з нестабільним станом наступний:

1. визначення симптомів дислокації мозку;
2. торакопункція, торакоцентез;
3. лапароцентез, лапароскопія.

Існує велика кількість шкал для оцінки важкості пошкодження: AIS (Abreviated Index Severity), ISS (Injury Severity Score), ЦИТО, NISS (New Injury Severity

* Цитування при атестації кадрів: Мормоль І.А., Борзих О.А., Кайдашев І.П. Особливості терапевтичного забезпечення хворих із політравмою. // Проблеми екології і медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 23–27.

Score), ICISS (International Classification Injury Severity Score), OIS (Organ Injury Scaling) та інші.

Серед числених шкал оцінки важкості травми найбільш вживане є шкала TRISS (Injury Severity Score ± Revised Trauma Score = Trauma Injury Severity Score). В теперешній час важливості набувають особливості терапевтичного забезпечення хворих із політравмою. Для ілюстрації наведено клінічний випадок.

Хворий чоловік, 1974 р.н., госпіталізований 14.11.16 р. о 18:00 год. в реанімаційне відділення міської лікарні зі скаргами на болі в грудній клітині, кашель, задишку. З анамнезу відомо, що отримав травму грудної клітини при пірнанні у воду. При об'єктивному огляді загальний стан хворого тяжкий. В свідомості, адекватний. Шкіра та видимі слизові блідо-рожеві, вологі на дотик. Дихання самостійне, ЧД – 22 в 1 хв. При аускультатії в легенях вислуховуються ослаблене дихання та вологі хрипи, більше справа. Перкуторно межі серця в межах вікової норми. Серцеві тони ритмічні, ослаблені, глухі. АТ – 100/60 мм.рт.ст., PS – 106 уд. за 1 хв., SpO₂ – 87%. Живіт м'який, безболісний.

В загальному аналізі крові: еритроцити – $4,9 \cdot 10^{12}/л$; лейкоцити – $15,2 \cdot 10^9/л$; швидкість зсідання еритроцитів (ШЗЕ) – 4 мм/год, концентрація гемоглобіну (Hb) – 158 г/л; кольоровий показник (КП) – 0,96; лейкоцитарна формула: паличкоядерні (п/я) – 3%; сегментоядерні (с/я) – 81%; еозинофіли – 1%; лімфоцити – 10%; моноцити – 5%.

В біохімічному аналізі крові: білірубін: загальний – 16,5; пряий – 3,1; непряий – 13,4 мкмоль/л; креатинін – 80,5 мкмоль/л; сечовина – 4,9 ммоль/л; залишковий азот – 25 мг%; загальний білок – 66 г/л. Коагулограма: фібриноген – 1,7 г/л, протромбін – 61%.

Результати ЕКГ: синусова тахікардія, ЧСС – 128 уд. в 1 хв., ЕВС не відхилена. Порушення внутрішньошлуночкової провідності. Ознаки гіпертрофії міокарду лівого шлуночка.

Дані УЗД органів черевної порожнини та нирок: печінка: не збільшена, розміщення – типове, форма – звичайна, контури – чіткі, розміри: права доля – 12,6 см, ліва доля – 6,2 см, паренхіма: ехогенність – нормальна, структура – однорідна. Внутрішньопечінкові протоки – нерозширені, стінки – не змінені, холедох – 0,4 см, стан судин – не розширені. Жовчний міхур: розміщення – типове, форма – овоїдна, товщина стінки – 0,2 см, ущільнена, осадок жовчі на ½ міхура. Підшлункова залоза не збільшена. Розміри: голівка – 2,8 см, тіло – 1,3 см, хвіст – 2,7 см. Контури – рівні, ехогенність – нормальна, структура – однорідна. Вірсунгов проток – не розширений. Селезінка не збільшена, контури – чіткі, ехогенність – нормальна, структура – однорідна. Права нирка: не збільшена, контури – чіткі, паренхіма – 1,5 см., площа центр. комплексу – збільшена, 1,9 см, за рахунок мікролітів 0,1 см. Ліва нирка: не збільшена, контури – чіткі, паренхіма – 1,8 см., площа центр. комплексу – збільшена, 2,0 см, за рахунок мікролітів 0,1 см. Наявність вільної рідини в черевній порожнині: не знайдено. Заключення: УЗО хронічного холецисто-панкреатиту, сечокислого діатезу, вільної рідини в черевній порожнині не виявлено.

УЗД не вдається провести ретельно по технічним причинам (із-за несправності апарату), але не можна виключити пневмоторакс грудної клітини або наявність підшкірної емфіземи.

Результати рентгенографії органів грудної клітини: підсилення легеневого малюнка. Корені розширені. Синуси вільні. Сog – збільшено в поперечнику.

Діагноз при госпіталізації: Тяжка комбінована травма. Тяжка поєднана краніо-торакальна травма. ЗЧМТ: струс головного мозку. Закрита травма грудної клітини: перелом III ребра справа, двобічний гемопневмоторакс. Забій серця та легень. Баротравма легень. Двобічний пульмоніт.

Призначено лікування: глюкоза, амікацин, максіцин, лазолван, лазікс, тугіна, препарати калію, контрлол. Рекомендовано: консультація торакального хірурга, пульмонолога, кардіолога, травматолога та проведення комп'ютерної томографії (КТ) органів грудної клітини, бронхоскопії.

Проведено пункцію та дренивання плевральної порожнини справа.

На 15.11.16 р. загальний стан хворого тяжкий, в свідомості, доступний продуктивному контакту. Скарги на біль в грудній клітині, задуху, виражену загальну слабкість. Дихання – ШВЛ через інтубаційну трубку. SpO₂ – 98%. Аускультативно в легенях – жорстке дихання, в нижніх відділах ослаблене. Через дренажі з плевральних порожнин виділяється геморагічна рідина справа – 70 мл, зліва – 100 мл. Гемодинаміка стабільна. Тони серця ритмічні, ослаблені. Живіт без особливостей.

В загальному аналізі крові зростає рівень лейкоцитів до $19,0 \cdot 10^9/л$ та знижується рівень Hb – 105 г/л. Коагулограма: фібриноген – 2,87 г/л, протромбін – 101,4%.

В біохімічному аналізі крові зростає рівень креатиніну до 109 мкмоль/л, залишкового азоту до 52 мг% та знижується рівень загального білка до 59 г/л. Отримані результати аналізу крові на електроліти: калій – 4,32 ммоль/л; натрій – 147,7 ммоль/л; хлоридів – 101 ммоль/л; кальцій – 1,0 ммоль/л.

Результати УЗД серця: УЗ ознаки зниження скоротливої здатності міокарду, забій серця.

Результати ЕКГ: синусова тахікардія, ЧСС – 103 уд. в 1 хв, ЕВС не відхилена. Порушення внутрішньошлуночкової провідності. Ознаки гіпертрофії міокарду лівого шлуночка.

Бронхофіброскопія. Заключення: кровотеча з правого бронха.

Пацієнт оглянутий торакальним хірургом. Встановлений діагноз: Тяжка комбінована травма. Тяжка поєднана краніо-торакальна травма. ЗЧМТ: струс головного мозку, забій лицевого черепа. ЗТГ: перелом III ребра справа; 2 - х сторонній гемопневмоторакс; забій серця та легень. Баротравма легень. Двосторонній пульмоніт. Рекомендовано провести КТ головного мозку та грудей, бронхоскопію, консультацію кардіолога.

Проведенно переливання свіжозамороженої плазми в кількості 300,0 мл.

На 16.11.16 р. загальний стан пацієнта вкрай тяжкий, в стані медикаментозної седатії, дихання – ШВЛ через інтубаційну трубку. З плевральних порожнин по дренажам виділяється геморагічний ексудат: зліва – 100 мл, справа – 190 мл. SaO₂ – 92%. Гемодинаміка стабільна.

В загальному аналізі крові продовжує зростати кількість лейкоцитів до $16,7 \cdot 10^9/л$ (за рахунок п/я – 12%) та ШЗЕ – 12 мм/год.

В біохімічному аналізі крові залишається підвищений рівень сечовини до 12,0 ммоль/л та залишкового азоту до 46 мг%, інших суттєвих змін не виявлено.

Коагулограма: фібриноген – 4,99 г/л, протромбін – 59,1%.

Результати ЕКГ: синусова тахікардія, ЧСС – 100 уд в 1 хв, синусова тахікардія, передсердна екстрасистоля, ЕВС вертикальна. У порівнянні з ЕКГ від 15.11.16 р. спостерігається погіршення коронарного кровотоку по задній стінці лівого шлуночка.

Результати УЗД серця: УЗО помірного зниження скоротливої здатності міокарду, гіпертрофії ЗСЛШ. В правому синусі грудної клітини – гідроторакс.

Результати рентгенографії органів грудної клітини: справа – пневмоторакс (легеня зменшена на 2/3 свого об'єму). Підшкірна та м'язова емфізема. Зліва – масивні інфільтрати зливного характеру.

Проведенно переливання свіжозамороженої плазми в кількості 300,0 мл.

Результати бронхоскопії: кровотеча з правого та лівого бронхів. Двобічний дифузний ендотрахеїт.

Загальний стан хворого залишається вкрай тяжким і на 17.11.16 р. Пацієнт знаходиться в стані постійної медикаментозної седації. Дихання апаратне – ШВЛ, SpO₂ – 96%. Аускультативно в легенях – жорстке дихання, велика кількість сухих та вологих хрипів, справа – різко ослаблене. Дренажна система з обох плевральних порожнин функціонує, з правої та лівої легені виділяється по 300 мл геморагічного ексудату.

В загальному аналізі крові зростає кількість лейкоцитів до 21,2·10⁹/л та ШЗЕ – 17 мм/год, знижується Hb до 100 г/л та КП – 0,85.

В біохімічному аналізі крові суттєвих змін за добу не виявлено. Рівень електролітів в крові зростає: калій – 4,55 ммоль/л; натрій – 152,5 ммоль/л; хлоридів – 112,8 ммоль/л; кальцій – 1,20 ммоль/л. Коагулограма: фібриноген – 7,71 г/л, протромбін – 90,0%.

Результати ФГДС: даних за травму ШКТ не виявлено.

Результати ЕКГ: синусова тахікардія, ЧСС – 103 уд в 1 хв. У порівнянні з ЕКГ від 16.11.16 р. спостерігається зміна ЕВС (зміщення вліво) – вірогідно зміна провідності по передній гілці лівої ніжки п. Гіса.

Результати рентгенографії органів грудної клітини: динаміка негативна, зберігається вогнищева інфільтрація на всі легеневі поля обох легень. Сог – без особливостей. Збільшується підшкірна емфізема.

Проведенно переливання свіжозамороженої плазми в кількості 300,0 мл. Результати бронхоскопії: кровотеча з сегментарних бронхів правої легені. Двобічний дифузний ендотрахеїт II ст.

На 18.11.16 р. в об'єктивному статусі хворого змін не має, хворому проводять парентеральне харчування через позагастральний зонд. Проведена заміна інтубаційної трубки. Через дренажі з кожної плевральної порожнини виділяється по 400 мл геморагічної рідини. SpO₂ – 98%.

В загальному аналізі крові зберігається лейкоцитоз – 17,3 ×10⁹/л, підвищення ШЗЕ – 11 мм/год та зниження Hb – 112 г/л.

В біохімічному аналізі крові клінічно-значимих змін у порівнянні з минулою добою не виявлено. Коагулограма: фібриноген – 4,99 г/л, протромбін – 53,6%.

Результати бронхоскопії: кровотеча з сегментарних бронхів нижньої частки правої легені. Двобічний дифузний ендотрахеїт.

Враховуючи стан хворого і тривалий період перебування на ШВЛ хворому 19.11.16 р. була виконана трахеостомія, через яку санується велика кількість геморагічного харкотиння. А через дренажі з плевра-

льних порожнин продовжує виділяється рідина з геморагічним компонентом: справа в кількості – 500 мл., зліва – 500 мл. SpO₂ – 95%.

В загальному аналізі крові: ер. – 4,2×10¹²/л; лейк. – 18,6 ×10⁹/л; ШЗЕ – 5 мм/год, Hb – 128 г/л; КП – 0,95; п/я – 8%; с/я – 70%; е – 1%; л – 15%; м – 6%.

В біохімічному аналізі крові: білірубін: загальний - 13,5 мкмоль/л; прямий - 3,1 мкмоль/л; непрямий - 10,4 мкмоль/л; креатинін – 80,1 мкмоль/л; сечовина – 6,3 ммоль/л; залишковий азот – 29 мг%; загальний білок – 65 г/л; калій – 4,7 ммоль/л; натрій – 143,8 ммоль/л; хлоридів – 100,7 ммоль/л. Коагулограма: фібриноген – 4,5 г/л, протромбін – 52%.

На 20.11.16 р. загальний стан хворого тяжкий, в стані постійної медикаментозної седації. Дихання – ШВЛ, SpO₂ – 95%. Через дренажі з плевральних порожнин виділяється геморагічна рідина справа – 500 мл, зліва – 500 мл. Гемодинаміка стабільна. Тони серця ритмічні, ослаблені. Живіт без особливостей.

В загальному аналізі крові зберігається лейкоцитоз до 11,7·10⁹/л, підвищення ШЗЕ – 19 мм/год, Hb – 122 г/л; КП – 0,91; п/я – 12%; с/я – 72%; е – 1%; л – 13%; м – 2%.

В біохімічному аналізі крові спостерігається підвищений рівень залишкового азоту – 30 мг%. Коагулограма: фібриноген – 4,6 г/л, протромбін – 57%.

На 21.11.16 р. загальний стан пацієнта залишається вкрай тяжким, в стані постійної медикаментозної седації. Дихання апаратне – ШВЛ, SpO₂ – 96%. З'явилася пастозність верхніх та нижніх кінцівок, набряк мошонки.

В загальному аналізі крові спостерігаються ознаки анемії: еритроцитів – 3,64·10¹²/л та Hb – 118 г/л; залишається підвищений рівень лейкоцитів – 10,6·10⁹/л; ШЗЕ – 40 мм/год, п/я – 33%.

В біохімічному аналізі крові – підвищений рівень залишкового азоту – 51 мг% та сечовини – 13,6 ммоль/л. Коагулограма: фібриноген – 7,71 г/л, протромбін – 77,6%.

Результати УЗД серця: Сог не локується – артефакти (вузьке УЗ вікно), вірогідно за рахунок пневмотораксу або підшкірної емфіземи.

Проведенно переливання свіжозамороженої плазми в кількості 300,0 мл.

Результати бронхоскопії: Двобічний дифузний ендотрахеїт.

Хворий оглянутий урологом і був виставлений діагноз: рефлекторна затримка сечі. Уретрит. Уретральний катетер. Набряк мошонки. Рекомендовано продовжити антибактеріальну та сечогінну терапію та контроль діурезу.

На 22.11.16 р. загальний стан хворого тяжкий, в стані постійної медикаментозної седації. Дихання – ШВЛ, SpO₂ – 93%. Температура тіла підвищилась до 38,0 °С. Через трахеостомічну трубку санується геморагічне харкотиння. Через дренажі з плевральних порожнин виділяється геморагічна рідина справа – 500 мл, зліва – 500 мл. Гемодинаміка стабільна. Тони серця ритмічні, ослаблені. PS – 120 уд/хв. Живіт без особливостей.

В загальному аналізі крові підвищений рівень лейкоцитів 19,6·10⁹/л; ШЗЕ – 35 мм/год, п/я – 22% та зниження Hb – 115 г/л.

В біохімічному аналізі крові – підвищений рівень залишкового азоту – 56 мг% та сечовини – 15,2 ммоль/л. Коагулограма: фібриноген – 10,17 г/л, протромбін – 68,5%.

На 23.11.16 р. загальний стан хворого тяжкий, в стані постійної медикаментозної седації. Дихання – ШВЛ. Через дренажі з плевральних порожнин виділяється геморагічна рідина справа – 500 мл, зліва – 500 мл. Гемодинаміка стабільна. Тони серця ритмічні, ослаблені. Живіт без особливостей.

В загальному аналізі крові: лейкоцитів – $51,0 \cdot 10^9$ /л; ШЗЕ – 41 мм/год, Hb – 104 г/л; КП – 0,93; п/я – 18%; с/я – 52%; е – 6%; л – 16%; м – 2%, присутня токсична зернистість нейтрофілів. В біохімічному аналізі крові: креатинін – 237 мкмоль/л; сечовина – 25,6 ммоль/л; залишковий азот – 87 мг%; загальний білок – 46 г/л. Коагулограма: фібриноген – 7,71 г/л, протромбін – 80,8%.

Пацієнт повторно оглянутий торакальним хірургом о 15:00 год. 23.11.16 р.: у пацієнта рецидивуючий масивний гемопневмоторакс, пацієнту виконано редренування гемопневмотораксу справа, замінено дренажі. При активній аспірації вдалося розправити праву легень, що супроводжувалося покращенням кардіореспіраторних показників. В 16:39 год. при відключенні електровідсмоктувача легень складається, йде масивний вихід повітря. За життєвими показниками хворому проведена екстренна торакотомія. При проведенні проведенні передньо-бокової торакотомії справа зафіксовано зупинку серця. Не зважаючи на проведення реанімаційних заходів в 18:00 год. зафіксовано біологічну смерть.

Посмертний епікриз:

Вкрай тяжка комбінована травма. Вкрай тяжка краніоторакальна травма. ЗЧМТ: струс головного мозку, множинні забійні рани лицевого черепа. ЗТГ: множинні фрагментарні переломи II-III- IV ребер справа; 2 - х сторонній гемопневмоторакс, двостороння контузія легень; контузія серця з розривом перикарда. Травматичний шок III (14.XI.16). Посттравматична двостороння пневмонія. РДС II тип. ДН III. Рецидивуючий некупіруючий правобічний від 23.XI.2016 пневмоторакс. Баротравма легень від 14. XI.16.

Судово-медичний діагноз

Закрита травма грудної клітини. Синець на лівій передньо-боковій поверхні грудної клітини. Обширні крововиливи в м'які тканини грудної клітини в проекції 2-8 ребер, від середньо - ключичної до середньо - пахвинної лінії справа та 2-7 ребер, від середньо - ключичної до задньо - пахвинної лінії зліва. Множинні переломи грудини та ребер по декільком анатомічним лініям. Розрив серцевої сумки по лівій боковій поверхні. Крововилив в епікард лівого шлуночка серця, на рівні передньої коронарної артерії. Обширні крововиливи та розриви верхньої та середньої долі правої легені. Гостра легенево-серцева недостатність. Серозно-геморагічне просочування з застійною пневмонією в нижній долі правої легені. Фібринозний плеврит правої легені. Серозне просочування легень з дрібними вогнищами гострої емфіземи. Серозний епікард. Незначний коронаросклероз. Навколо судинний кардіосклероз. Нерівномірне кровонаповнення з дистрофією та вогнищевою фрагментацією кардіоміоцитів в набухломому міокарді. Венозне повнокрів'я, паренхіматозна дистрофія внутрішніх органів. Стан після надання медичної допомоги та реанімаційних заходів.

Гемопневмоторакс (Haemopneumothorax) – це наявність повітря і крові в плевральній порожнині, що виникає зазвичай в результаті травми і являється ре-

зультатом кровотечі із судин легень, внутрішньогрудних гілок великих судин (аорта), грудної стінки, середостіння, серця або діафрагми [5,6].

На відміну від пневмотораксу, механізм виникнення якого схожий з гемотораксом, при скупченні крові в плевральній порожнині на перший план виходять симптоми дихальної недостатності, а гіповолемічний симптомокомплекс часто ускладнюється розвитком ознак геморагічного шоку і летальним результатом. Клінічна картина при гемотораксі залежить від обсягу крові, що вилілася в плевральну порожнину, наявності або відсутності порушення цілісності легеневої тканини, а також від стану структур середостіння [7,8].

Травматичний гемоторакс практично в 70-80% випадків обумовлений переломами ребер різної локалізації зі зміщенням кісткових відламків. Частота даної патології становить не менше 25% серед усіх випадків торакальної травми. Розрізняють також гемоторакс малий (рівень рідини нижче кута лопатки, її обсяг - до 500мл), середній (рівень рідини до кута лопатки, її обсяг - до 1000 мл) і великий (рідина займає всю або майже всю плевральну порожнину, її обсяг - понад 1000мл). Гемоторакс може бути із зупиненим і з триваючим кровотечею [9,10].

Гемоторакс відноситься до розряду невідкладних нозологічних хвороб, що потребують ранньої діагностики та екстреного медичного втручання. По статистиці діагноз гемопневмоторакс ставиться чоловікам на 67.66% частіше, ніж жінкам. Смертність у чоловіків при гемопневмотораксі складає 0,76%, а у жінок – 1,07%. В групу ризику при захворюванні на гемопневмоторакс потрапляють чоловіки у віці 65-69 років і жінки у віці 80-84 років.

Серед всіх відомих лабораторних та інструментальних методик діагностики гемоторакса найбільш доцільними є: променеві методи візуалізації (рентгеноскопія, ультразвукове сканування плевральних порожнин, комп'ютерна томографія і магнітно-резонансна томографія), бронхоскопія з супутньою біопсією, цитологічний аналіз харкотиння з метою визначення наявності атипичних клітин, діагностичний торакоцентез з проведенням проб Ривилу-Грегуара і Петрова [11,12].

Стандартна рентгенографія дозволяє оцінити лише факт наявності рівня рідини в плевральній порожнині і виявити обсяг накопиченої крові. Так, наявне тотальне затемнення всієї половини грудної клітки свідчить про те, що в плевральній порожнині знаходиться не менше двох літрів крові, а якщо верхня межа затемнення знаходиться на рівні заднього відрізка другого ребра, то об'єм крові становить від одного до двох літрів. Спеціаліст ультразвукової діагностики оцінює наявність навіть мізерної кількості крові.

Після визначення можливої наявності крові в плевральній порожнині доцільно проведення діагностичного плевроцентеза з аспірацією вмісту плевальної порожнини. Дана маніпуляція проводиться з метою встановлення тривалості кровотечі та ознак інфікування плевральних листків. Критерієм інфікованого гемоторакса є позитивна проба Петрова, при якій виявляється зниження прозорості та наявність осаду аспірованої крові. При підозрі на інфікованість плевальної порожнини необхідно виконати не тільки цитологічне, але і бактеріальне дослідження аспірату. Визначальною ознакою триваючої внутрішньо-плевальної кровотечі є пози-

тивна проба Ривилуа-Грегуара, яка передбачає наявність ознак згортання крові [13,14].

Сучасна тактика лікування гемопневмоторакса передбачає швидке видалення крові та газу із порожнини плеври з метою розправлення легені. З цією ціллю дренують плевральну порожнину методом активної аспірації через дренаж за допомогою електротосо.

Показанням до проведення торакотомії є поранення легені, довготривала внутрішньоплевральна кровотеча, неефективність консервативної тактики. Усушення гемо пневмотораксу і розправлення легені в перші 3-5 діб сприяють попередженню розвитку емпієми плеври і відновленню функції легень в повному обсязі.

Лікуванням пацієнта з гемотораксом повинні займатися лікарі різного профілю: хірург, пульмонолог, і реабілітолог. Успіх від застосування тих чи інших лікувальних маніпуляцій при гемотораксі залежать, насамперед, від ранньої діагностики цього грізного для життя пацієнта стану, а також своєчасно наданої першої кваліфікованої допомоги.

Лікування будь-якої форми гемоторакса повинно проводитися якомога раніше, так як кров являє собою одну з найбільш сприятливих поживних середовищ для розмноження хвороботворних мікроорганізмів. Найбільш частіше зустрічається, як збудник інфікованого гемоторакса, є облигатна анаеробна флора [15,16].

Консервативні методи лікування із застосуванням антибактеріальних і протизапальних лікарських засобів застосовуються тільки у випадку малого гемоторакса, не має виражених розладів здоров'я пацієнта. Консервативне лікування повинне проводитися під обов'язковим рентгенологічним контролем. Оптимальними строками розсмоктування малого гемоторакса вважається від двох тижнів до 1 місяця. З метою прискорення процесу розсмоктування кров'яних згустків хворим з ознаками згорнутого гемоторакса доцільно призначати протеолітичні ферменти парентерально (Хімотрипсин 25 мг внутрішньом'язово 1 раз на добу курсом не менше 15 ін'єкцій), а також за допомогою безпосереднього зрошення плевральних порожнин розчинами урокінази, стрептокінази.

Таким чином, для надання кваліфікованої медичної допомоги хворим з політравмою необхідно розробити персоналізований підхід із складанням індивідуальних алгоритмів із залученням мультидисциплінарної команди.

Література:

1. Кавалерский Г. М., Гаркави А. В. 7.1 Классификация политравм. Особенности клинического течения и диагностики // Медицина чрезвычайных ситуаций. Хирургия катастроф. — Москва: Медицинское информационное агентство, 2015. — С. 165. — 376 с.
2. Філь А. Ю., Філь Ю. Я. Сучасна тактика надання допомоги при скелетній травмі постраждалим із політравмою (огляд літератури) // Травма. — 2014. — N 1. — С. 125—128
3. Гур'єв С. О., Танасієнко П. В. Сучасна класифікація інфекційних ускладнень у постраждалих із політравмою // Травма. — 2013. — Т. 14, № 6. — С. 21-23.
4. Pathophysiology of polytrauma — Keel, M. & Trentz O. — Injury, Volume 36, Issue 6, Pages 691—709
5. Ahmad T., Ahmed S.W., Soomro N.H., Sheikh K.A. Thoracoscopic evacuation of retained posttraumatic hemothorax // Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan.- 2013. - Vol. 23 (3). - P. 234-236.
6. de Rezende-Neto J.B., PastoreNeto M., Hirano E.S., Rizoli S., Nascimento B. Jr., Fraga G.P. Management of retained hemothoraces after chest tube thoracostomy for trauma // Rev Col Bras Cir. — 2012 -. Vol. 39 (4). - P. 344-349.
7. DuBose J., Inaba K., Demetriades D., Scalea T.M., et al. Management of post-traumatic retained hemothorax: a prospective, observational, multicenter AAST study // Trauma Acute Care Surg. - 2012. - Vol. 2 (1). P. 11-22.
8. Hsing-LinLin, Wen-Yen Huang, ChyanYang, Shih-MinChou et al. How early should VATS be performed for retained hemothorax in blunt chest trauma? // Injury. - 2014. - Vol. 45 (9). - P. 13591364.
9. Karmy-Jones R., Holevar M., Sullivan R.J., Fleisig A., Jurkovich G.J. Residual hemothorax after chest tube placement correlates with increased risk of empyema following traumatic injury // Can Respir J. - 2008. - Vol. 15 (5). - P. 255-258.
10. Meyer D.M., Jessen M.E., Wait M.A., Estrera A.S. Early evacuation of traumatic retained hemothoraces using thoracoscopy: a prospective, randomized trial // Ann Thorac Surg. - 1997. - Vol. 64(5). - P. 1396-1400.
11. Morales Uribe C.H., Villegas Lanau M.I., Petro Sánchez R.D. Best timing for thoracoscopic evacuation of retained post-traumatic hemothorax // SurgEndosc. - 2008. - Vol. 22 (1). - P. 91-95.
12. Navsaria RH., Vogel R.J., Nicol A.J. Thoracoscopic evacuation of retained posttraumatic hemothorax. Ann ThoracSurg. - 2004. - Vol. 78 (1). - P. 282-285.
13. Nathan T.M., Oliver L.G., Bryan R.C., Jose J.D. et al. Pта Management Guidelines for Management of Hemothorax and Occult Pneumothorax // The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care. - 2011. - Vol. 70 (2). - P. 510-518.
14. Smith J.W., Franklin G.A., Harbrecht B.G., Richardson J.D. Early VATS for blunt chest trauma: a management technique underutilized by acute care surgeons // Trauma. - 2011. - Vol. 71 (1). - P. 105-107.
15. Abakumov, A.M. Travmaticheskiy Svernuvshiysya Gemotoraks (diagnostika i lechenie) Dis. ... Kand. Med.nauk [Traumatic Hemothorax Coagulated Dissertation of the Candidate of Medical Sciences]. - Moscow, 2003. 168 p.
16. Dergunova, S.A. Optimizatsiya Khirurgicheskoy Taktiki Pri Razlichnykh Vidakh Gemotoraksa Dis. ... Kand. Med.nauk [Optimization of Surgical Tactics for Different Kinds of Hemothorax Dissertation of the Candidate of Medical Sciences]. - Samara, 2005. 130 p.

Матеріал надійшов до редакції 26.02.2018

ENGLISH VERSION: FEATURES OF THERAPEUTIC SUPPORT FOR PATIENTS WITH POLYTRAUMA*

Mormol I.A., Borzykh O.A., Kaidashev I.P.

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

Today, the issue of timely diagnosis and treatment of polytrauma remains highly relevant. Polytrauma is a severe pathological process that involves simultaneous onset and development of several pathological conditions and is characterized by underlying disorders of all types of metabolism, changes on the part of central nervous system, cardiovascular and respiratory tract. The given clinical case proves us expediency of developing the personified approach to management of patients with polytrauma, using the individual algorithms.

Key words: polytrauma, hemopneumothorax, treatment tactics

Polytrauma is a set of injuries that are characterized by significant changes in the structure and function of organs and systems. In addition to mechanical damage, the state of the victim may be affected by a number of infectious specific severity of clinical manifestations, which are accompanied by the disorder of vital functions, the complexity of diagnosis and treatment, high percentage of disability and high mortality. Such lesions are often accompanied by traumatic shock, high blood loss, circulatory and respiratory disorders, and sometimes terminal conditions. In case of polytrauma, the course of traumatic disease is particularly severe, and the nature of the dominant damage may change [1,2].

The term "polytrauma" is a collective term that includes the following types of injuries: multiple, joint and combined.

Multiple mechanical traumas include injuries to two or more internal organs in one cavity (injury of the small and large intestines, rupture of the liver and spleen, damage to both kidneys), injuries within two or more anatomically functional formations of the locomotor system (fracture of the thigh, fracture of both heel bones).

Joint trauma is an injury of the internal organs in different cavities (trauma of the lungs and the liver, concussion of the brain and kidney injury), or damage to the internal organs and musculoskeletal system (damage to the chest and fracture of the extremity bones, cranio-cerebral injury, pelvic bone damage etc.).

Combined trauma involves the victim's simultaneous subjection to the action of two or more factors: fracture and burn of the thigh; acute radiation disease and spinal fracture. In other words, mechanical traumas can be part of combination injuries as one of the constituent components [3].

Polytrauma is primarily characterized by damage to the locomotor system. According to some authors, it prevails among young people (53%, mostly men) aged 14-45. The main cause of injury is traffic accidents – 80.6%.

In polytrauma, multiple lesions of the locomotor system affect the lower extremities in 49.4% of cases, the upper extremities – in 33.2%, pelvis – in 14.1%. In addition to these injuries, 75% of patients have concomitant lesions: of the head and brain – in 92.2%, of the chest – in 31.5%, of the abdomen – in 21.3%.

In the treatment of patients with polytrauma, the most important principles are to prevent the patient's death from shock and blood loss and to prevent complications in the early period from multiple organ failure and sepsis [4].

According to WHO, about 16 thousand people daily die as a result of traumas, annually – 300 thousand of able-bodied people, whereas 7-8 million people become

disabled.

Over the past 10 years, mortality from traumas in Ukraine has increased by 38.7%. According to the Ministry of Public Health of Ukraine, every year 31-44 thousand people die of injuries, out of which 20-25% – of joint injuries.

The frequency of polytrauma in recent years is 5.5-35% among all injured patients.

Mortality in polytrauma amounts to 12.2-63.4%, among them: 65.1-70.0% of victims die in the first 24-48 hours (out of which – 35.0% in the first 15 minutes from the moment of injury). [8]

In economically developed countries, traumatism is ranked 3rd among the causes of mortality after cancer and cardiovascular disease.

The polymorphism of injuries does not allow us to regulate to the fullest extent the volume and the procedure for application of instrumental examinations. In general, the diagnostic program includes:

1. general clinical examination;
2. catheterization of the bladder;
3. treatment of wounds with their re-examination;
4. ultrasound study;
5. X-ray of abdominal cavity organs and abdominal cavity;
6. thoraco- and laparocentesis;
7. diagnostic laparoscopy.

The approximate list of the priority diagnostic tests for a patient with an unstable condition is as follows:

1. defining the symptoms of brain dislocation;
2. thoracopuncture, thoracocentesis;
3. laparocentesis, laparoscopy.

There are a large number of scales to assess the severity of the injury: AIS (Abbreviated Index Severity), ISS (Injury Severity Score), CITO, NISS (New Injury Severity Score), ICISS (International Classification Injury Severity Score), OIS (Organ Injury Scaling) and others.

The TRISS (Trauma Injury Severity Score) scale is the most commonly used for assessing the severity of an injury. At present, the features of therapeutic support for patients with polytrauma are important. The clinical case given below illustrates the significance of this issue.

A patient, born in 1974, was hospitalized on 14.11.16 at 18:00 at the emergency room of the City hospital with complaints of pain in the chest, cough, and shortness of breath. From the anamnesis it is known that he sustained a chest injury when diving into water. On objective examination: the patient's general condition is severe. The patient is conscious and balanced. The skin and visible mucous membranes are pale pink, wet to the touch. Independent respiration, Respiratory rate – 22 per 1 min.

* To cite this English version: I.A. Mormol, O.A. Borzykh, I.P. Kaidashev. Features of therapeutic support for patients with polytrauma. // *Problemy ekologiyi ta medytsyny*. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 28–32.

On auscultation: weakened breath and wet rattles in the lungs, more on the right. On percussion: limits of the heart are within the age norm. Heart tones are rhythmic, weakened, dulls. Blood pressure – 100/60 mmHg, pulse – 106 per 1 minute, SpO₂ – 87%. The abdomen is soft and painless.

Clinical blood analysis: erythrocytes – $4.9 \times 10^{12}/l$; leukocytes – $15.2 \times 10^9/l$; erythrocyte sedimentation rate (ESR) – 4 mm/h, hemoglobin concentration (Hb) – 158 g/l; color index (CI) – 0.96; leukocyte formula: stab cell (s/c) – 3%; segmented (s) – 81%; eosinophils – 1%; lymphocytes – 10%; monocytes – 5%.

Biochemical blood analysis: bilirubin: total – 16.5; direct – 3.1; indirect – 13.4 $\mu\text{mol}/l$; creatinine – 80.5 $\mu\text{mol}/l$; urea – 4.9 mmol/l; residual nitrogen – 25 mg%; total protein – 66 g/l. Coagulogram: fibrinogen – 1.7 g/l, prothrombin – 61%.

ECG results: sinus tachycardia, heart rate – 128 per 1 minute, the electrical axis of heart is not deviated. Disrupted intraventricular conduction. Signs of left ventricular myocardial hypertrophy.

The ultrasound data of the abdominal cavity and kidneys: the liver is not enlarged, the placement is typical, the shape is normal, the contours are clear; dimensions: right lobe – 12.6 cm, left lobe – 6.2 cm; parenchyma: normal echogenicity, homogeneous structure. The intrahepatic ducts are not dilated, the walls are unchanged, choledoch duct – 0.4 cm, vessels are not dilated. Gallbladder: the placement is typical, the shape is ovoid, the wall thickness – 0.2 cm, densified, bile sediment by $\frac{1}{2}$ of the gallbladder. The pancreas is not enlarged. Dimensions: head – 2.8 cm, body – 1.3 cm, tail – 2.7 cm. The contours are clear, echogenicity is normal, heterogeneous structure. Wirsung's duct is not dilated. The spleen is not enlarged, the contours are clear, normal echogenicity, the structure is homogeneous. The right kidney is not enlarged, the contours are clear, parenchyma – 1.5 cm, the central complex area is enlarged, 1.9 cm, due to microlites 0.1 cm. The left kidney is not enlarged, the contours are clear, parenchyma – 1.8 cm, the central complex area is enlarged, 2.0 cm, due to microlites 0.1 cm. Free fluid in the abdominal cavity: not found. Conclusion: ultrasound signs of chronic cholecystopancreatitis, uratic diathesis, free fluid in the abdominal cavity was not detected.

Ultrasound cannot be carried out thoroughly for technical reasons (due to malfunction of the device), but it is impossible to exclude pneumothorax of the chest or the presence of subcutaneous emphysema.

The results of chest X-ray: the pulmonary pattern increase. Roots are dilated. Sinuses are free. The heart is enlarged in diameter.

Diagnosis at admission: Severe combined trauma. Severe combined cranio-thoracic trauma. Closed cranio-cerebral injury: brain concussion. Closed chest trauma: fracture of the third rib to the right, bilateral hemopneumothorax. Contusion of the heart and lungs. Barotrauma of the lungs. Bilateral pneumonitis.

The following treatment was prescribed: glucose, amikacin, maxicin, lasolvan, lazix, tugina, potassium preparations, controloc. Consultation of thoracic surgeon, pulmonologist, cardiologist, traumatologist and computer tomography (CT) of the chest organs and bronchoscopy were recommended.

Puncture and drainage of the pleural cavity to the right was conducted.

On 15.11.16, the general condition of the patient is severe. The patient is conscious, accessible for productive contact. Complaints of pain in the chest, suffocation, expressed general weakness. Respiration – mechanical ventilation through the intubation tube. SpO₂ – 98%. Auscultatory in the lungs – harsh respiration, weakened in the lower parts. Through drainage of the pleural cavities, hemorrhagic fluid is discharged to the right – 70 ml, to the left – 100 ml. Hemodynamics is stable. Tones of the heart are rhythmic, weakened. The abdomen – no abnormalities.

Clinical blood count: the level of leukocytes increases to $19.0 \times 10^9/l$ and the level of Hb decreases – 105 g/l. Coagulogram: fibrinogen – 2.87g/l, prothrombin – 101.4%.

Biochemical blood analysis: the level of creatinine is increased to 109 $\mu\text{mol}/l$, the residual nitrogen is up to 52 mg% and the total protein is reduced to 59 g/l. The results of electrolytes blood test: potassium – 4.32 mmol/l; sodium – 147.7 mmol/l; chlorides – 101 mmol/l; calcium – 1.0 mmol/l.

The ultrasound study of the heart: ultrasound signs of reduced contractile capacity of the myocardium, heart contusion.

ECG results: sinus tachycardia, heart rate – 103 beats per minute, the electrical axis is not deviated. Disruption of intraventricular conduction. The signs of left ventricular myocardial hypertrophy.

Bronchofiberscopy. Conclusion: bleeding from the right bronchus.

The patient was examined by the thoracic surgeon. Diagnosis: Severe combined trauma. Severe combined cranio-thoracic trauma. Closed cranio-cerebral injury: brain concussion, facial skull concussion. Closed chest trauma: fracture of the third rib to the right, bilateral hemopneumothorax. Contusion of the heart and lungs. Barotrauma of the lungs. Bilateral pneumonitis. It was recommended to conduct CT of the brain and chest, bronchoscopy, consultation of the cardiologist.

Transfusion of fresh frozen plasma in the amount of 300.0 ml was conducted.

On 16.11.16, the general condition of the patient is extremely severe. The patient is in the state of medicinal sedation, respiration – mechanical ventilation through the intubation tube. From pleural cavities through drainage, hemorrhagic exudate is discharged: to the left – 100 ml, to the right – 190 ml. SaO₂ – 92%. Hemodynamics is stable.

Clinical blood count: the number of leukocytes continues to increase to $16.7 \times 10^9/l$ (due to s/c – 12%) and ESR – 12 mm/h.

Biochemical analysis of blood: urea remains elevated up to 12.0 mmol/l and residual nitrogen – up to 46 mg%, no other significant changes were detected. Coagulogram: fibrinogen – 4.99 g/l, prothrombin – 59.1%.

ECG results: sinus tachycardia, heart rate – 100 beats per 1 min, sinus tachycardia, atrial extrasystole, the electrical axis of the heart is vertical. Compared with the ECG results as of 15.11.16, there is a deterioration of the coronary blood flow over the posterior wall of the left ventricle.

The ultrasound study of the heart: signs of moderate decrease of contractile capacity of the myocardium, hypertrophy of the posterior wall of left ventricle. Hydrothorax in the right sinus of the chest.

The chest X-ray findings: pneumothorax to the right (the lung is reduced by 2/3 of its volume). Subcutaneous

and muscular emphysema. There are profuse drainage infiltrations to the left.

Transfusion of fresh frozen plasma in the amount of 300.0 ml was conducted.

Results of bronchoscopy: bleeding from the right and left bronchi. Bilateral diffuse endotracheitis.

The general condition of the patient remains extremely severe on 17.11.16, the patient is in the state of permanent medicinal sedation. Respiration – mechanical ventilation, SpO₂ – 96%. Auscultatory in the lungs: harsh respiration, a large number of dry and wet rales, sharply weakened respiration to the right. The drainage system operates from both pleural cavities, with 300 ml of hemorrhagic exudate discharged from the right and left lungs.

Clinical blood count: the number of leukocytes increases to $21.2 \times 10^9/l$ and ESR – 17 mm/h, Hb decreases to 100 g/l and Cl – to 0.85.

Biochemical analysis of blood: no significant changes over the day were detected. The level of electrolytes in the blood increases: potassium – 4.55 mmol/l; sodium – 152.5 mmol/l; chlorides – 112.8 mmol/l; calcium – 1.20 mmol/l. Coagulogram: fibrinogen – 7.71 g/l, prothrombin – 90.0%.

Fibergastroscopy results: no data on trauma of the GIT were detected.

ECG results: sinus tachycardia, heart rate – 103 beats per minute. In comparison with the ECG as of 16.11.16, there is a change in the electrical axis of the heart (shift to the left) – the reliable conductivity change over the front branch of the left crus of the His bundle.

Results of chest X-ray: the dynamics is negative, focal infiltration is preserved on all pulmonary fields of both lungs. The heart – nil significant. Subcutaneous emphysema increases.

Transfusion of fresh frozen plasma in the amount of 300.0 ml was conducted. Results of bronchoscopy: bleeding from the segmental bronchi of the right lung. Bilateral diffuse endotracheitis of II degree.

On 18.11.2016, there are no changes in the objective status of the patient. The patient undergoes parenteral nutrition through the extragastric probe. Intubation tube replacement was replaced. Through drainage from each pleural cavity, 400 ml of hemorrhagic fluid is discharged. SpO₂ 98%.

Clinical blood count: leukocytosis persists – $17.3 \times 10^9/l$, increased ESR – 11 mm/hr, decrease in Hb – 112 g/l.

Biochemical analysis of blood: no clinically significant changes in comparison with the previous day. Coagulogram: fibrinogen – 4.99 g/l, prothrombin – 53.6%.

Results of bronchoscopy: bleeding from the segmental bronchi of the lower lobe of the right lung. Bilateral diffuse endotracheitis.

Taking into account the condition of the patient and the long period of mechanical ventilation, on 19.11.16, a tracheostomy was performed, through which a large number of hemorrhagic sputum was sanated. Through drainage from the pleural cavity, the fluid with a hemorrhagic component continues to be discharged: to the right in the amount of 500 ml., to the left – 500 ml. SpO₂ – 95%.

Clinical blood count: erythrocytes – $4.2 \times 10^{12}/l$; leukocytes – $18.6 \times 10^9/l$; ESR – 5 mm/h, Hb – 128 g/l; Cl – 0.95; s/c – 8%; segmented – 70%; eosinophils – 1%; lymphocytes – 15%; monocytes – 6%.

Biochemical analysis of blood: bilirubin: total – 13.5 μmol/l; direct – 3.1 μmol/l; indirect – 10.4 μmol/l;

creatinine – 80.1 μmol/l; urea – 6.3 mmol/l; residual nitrogen – 29 mg%; total protein – 65 g/l; potassium – 4.7 mmol/l; sodium – 143.8 mmol/l; chlorides – 100.7 mmol/l. Coagulogram: fibrinogen – 4.5 g/l, prothrombin – 52%.

On 20.11.16, the general condition of the patient is severe. The patient is in the state of permanent medicinal sedation. Respiration – mechanical ventilation, SpO₂ – 95%. Through drainage from the pleural cavity, the fluid with a hemorrhagic component continues to be discharged: to the right – 500 ml, to the left – 500 ml. Hemodynamics is stable. Tones of the heart are rhythmic, weakened. The abdomen – no abnormalities.

Clinical blood count: leukocytosis is maintained up to $11.7 \times 10^9/l$, increased ESR – 19 mm/hr, Hb – 122 g/l; Cl – 0.91; s/c – 12%; s. – 72%; e. – 1%; l. – 13%; m. – 2%.

Biochemical analysis of blood: elevated level of residual nitrogen is observed – 30 mg%. Coagulogram: fibrinogen – 4.6 g/l, prothrombin – 57%.

On 21.11.16, the general condition of the patient remains extremely severe. The patient is in the state of permanent medicinal sedation. Respiration – mechanical ventilation, SpO₂ – 96%. The pastosity of the upper and lower extremities, swelling of the scrotum are observed.

Clinical blood test: there are signs of anemia: erythrocytes – $3.64 \times 10^{12}/l$ and Hb – 118 g/l; the elevated level of leukocytes persists – $10.6 \times 10^9/l$; ESR – 40 mm/hr, s/c – 33%.

Biochemical analysis of blood: elevated level of residual nitrogen – 51 mg% and urea – 13.6 mmol/l. Coagulogram: fibrinogen – 7.71 g/l, prothrombin – 77.6%.

Hearth ultrasound results: the heart is not located – artefacts (narrow USD window), possibly due to pneumothorax or subcutaneous emphysema.

Transfusion of fresh frozen plasma in the amount of 300.0 ml was conducted.

Results of bronchoscopy: bilateral diffuse endotracheitis.

The patient was examined by the urologist and diagnosed with reflex urinary retention. Urethritis. Urethral catheter. Swelling of the scrotum. It is recommended to continue the antibiotic and diuretic therapy, and control diuresis.

On 22.11.16, the general condition of the patient is severe. The patient is in the state of permanent medicinal sedation. Respiration – mechanical ventilation, SpO₂ – 93%. Body temperature increased to 38.0°C. Through tracheostomy tube, hemorrhagic sputum is sanated. Through the drainage of the pleural cavities, hemorrhagic fluid is discharged to the right – 500 ml, to the left – 500 ml. Hemodynamics is stable. Tones of the heart are rhythmic, weakened. PS – 120 bpm. The abdomen – no abnormalities.

Clinical blood count: elevated levels of leukocytes are $19.6 \times 10^9/l$; ESR – 35 mm/hr, s/c – 22% and reduction of Hb – 115 g/l.

Biochemical analysis of blood: elevated level of residual nitrogen – 56 mg% and urea – 15.2 mmol/l. Coagulogram: fibrinogen – 10.17 g/l, prothrombin – 68.5%.

On 23.11.16, the general condition of the patient is severe. The patient is in the state of permanent medicinal sedation. Respiration – mechanical ventilation. Through the drainage of the pleural cavities, hemorrhagic fluid is discharged to the right – 500 ml, to the left – 500 ml. Hemodynamics is stable. Tones of the heart are rhythmic, weakened. The abdomen – no abnormalities.

Clinical blood count: leukocytes – $51.0 \times 10^9/l$; ESR – 41 mm/h, Hb – 104 g/l; Cl – 0.93; s/c – 18%; s. – 52%; e.

– 6%; l. – 16%; m. – 2%, there is a toxic granularity of neutrophils. Biochemical analysis of blood: creatinine – 237 $\mu\text{mol/l}$; urea – 25.6 mmol/l ; residual nitrogen – 87 $\text{mg}\%$; total protein – 46 g/l . Coagulogram: fibrinogen – 7.71 g/l , prothrombin – 80.8%.

The patient was re-examined by the thoracic surgeon at 15:00 on 23.11.16: the patient had recurring massive hemopneumothorax, the patient underwent the hemopneumothorax draining to the right, replaced drainages. With active aspiration, it was possible to expand the right lung, which was accompanied by improvement of cardio-respiratory indicators. At 16:39, when the electric pump was switched off, the lung collapsed, there was a massive air output. According to vital indicators, the patient underwent emergency thoracotomy. During the anterior-lateral thoracotomy, the heart arrest was recorded. Despite the implementation of resuscitation measures, natural death was registered at 18:00.

Postmortem epicrisis:

Extremely severe combined trauma. Extremely severe craniothoracic trauma.

Closed craniocerebral injury: brain concussion, multiple contused wounds of the facial skull. Closed chest trauma: multiple fragmentary fractures of the II-III-IV ribs to the right; bilateral hemopneumothorax, bilateral contusion of the lungs; contusion of the heart with the rupture of the pericardium. Traumatic shock, III degree (14.11.16). Post-traumatic bilateral pneumonia. RDS, type II. RF III Recurrent resistant right-sided pneumothorax as of 23.11.2016. Barotrauma of the lungs as of 14.11.16.

Forensic diagnosis.

Bruises on the left anterior-lateral surface of the chest. Extensive hemorrhages in the soft tissues of the thorax in the projection of 2-8 ribs, from the midclavicular to the midinguinal lines to the right and 2-7 ribs, from the midclavicular to the posterior inguinal lines to the left. Multiple fractures of the sternum and ribs over several anatomical lines. Rupture of the pericardial sac over the left side surface. Hemorrhage in the left ventricular epicardium of the heart, at the level of the anterior coronary artery. Extensive hemorrhages and ruptures of the upper and middle lobes of the right lung. Acute pulmonary and heart failure. Sero-hemorrhagic impregnation with congestive pneumonia in the lower lobe of the right lung. Fibrinous pleuritis of the right lung. Serous inflammation of the lungs with minute foci of acute emphysema. Serous epicardium. Insignificant coronary sclerosis. Perivascular cardiosclerosis. Uneven blood filling with dystrophy and focal fragmentation of cardiomyocytes in the swollen myocardium. Venous plethora, parenchymatous dystrophy of the internal organs. The condition after provision of medical care and resuscitation measures.

Hemopneumothorax is the presence of air and blood in the pleural cavity, which usually occurs as a result of a trauma and is caused by bleeding from the vessels of the lungs, the intrathoracic branches of the large vessels (aorta), thoracic wall, mediastinum, heart or diaphragm [5,6].

Unlike pneumothorax, whose mechanism of occurrence is similar to hemothorax, with the accumulation of blood in the pleural cavity, the symptoms of respiratory failure move to the foreground, and the hypovolemic symptom complex is often complicated by the development of signs of hemorrhagic shock and fatal outcome. The clinical presentation of hemothorax depends on the

volume of blood that flew to the pleural cavity, the presence or absence of the disrupted integrity of the pulmonary tissue, as well as the state of the mediastinum structures [7,8].

Traumatic hemothorax is virtually in 70-80% of cases due to fractures of ribs of different localization with the displacement of bone fragments. The frequency of this pathology is not less than 25% among all cases of thoracic trauma. There are minor hemothorax (the level of fluid is lower than the angle of the shoulder blade, its volume is up to 500 ml), moderate (the level of fluid up to the angle of the shoulder blade, its volume – up to 1000 ml) and major (the liquid occupies the entire or almost the entire pleural cavity, its volume is more than 1000 ml). Hemothorax may occur in the controlled and continued bleeding [9,10].

Hemothorax belongs to the category of urgent nosological diseases, requiring early diagnosis and emergency medical intervention. According to the statistics, the diagnosis of hemopneumothorax is 67.66% higher for men than for women. Mortality in men with hemopneumothorax is 0.76%, and in women – 1.07%. In the risk group to hemopneumothorax are men aged 65-69 years and women aged 80-84 years.

Among all known laboratory and instrumental methods of hemothorax diagnosis, the most expedient are: radial imaging methods (X-ray, ultrasound scanning of pleural cavities, computed tomography and magnetic resonance imaging), bronchoscopy with concomitant biopsy, cytological sputum analysis to determine the presence of atypical cells, diagnostic thoracocentesis with the Ruvelua-Gregoir and Petrov samples [11,12].

Standard X-ray allows us to evaluate only the presence of fluid levels in the pleural cavity and to detect the amount of accumulated blood. Thus, the total eclipse of the entire half of the chest indicates that there is not less than two liters of blood in the pleural cavity, and if the upper limit of the eclipse is at the level of the posterior segment of the second rib, then the volume of blood is from one to two liters. The ultrasound diagnosis specialist assesses the presence of even minor amount of blood.

After determining the possible presence of blood in the pleural cavity, it is expedient to carry out diagnostic pleurocentesis with aspiration of the contents of the pleural cavity. This manipulation is performed to determine the duration of bleeding and signs of infection of the pleural folia. The criterion for infectious hemothorax is the positive Petrov test, which shows a decrease in transparency and the presence of aspirated blood sediment. In case of suspected infections of the pleural cavity, it is necessary to perform not only cytological but also bacterial examination of aspirates. A definitive sign of ongoing intra-pleural bleeding is the positive Ruvelua-Gregoir test, which suggests the presence of signs of blood coagulation [13,14].

The modern tactics of hemopneumothorax treatment involves the rapid removal of blood and gas from the pleural cavity in order to expand the lungs. For this purpose, the pleural cavity is drained by the method of active aspiration through drainage with the help of an electric pump.

Indications for thoracotomy include the lung injury, prolonged intrapleural bleeding, ineffectiveness of conservative tactics. Elimination of hemopneumothorax and lung expansion in the first 3-5 days contribute to the prevention of emphysema development in the pleura and complete restoration of the lung function.

Treatment of patient with hemothorax should be performed by a multidisciplinary team of doctors: surgeons, pulmonologists and rehabilitation specialists.

The success in using certain therapeutic techniques in hemothorax depends, first of all, on the early diagnosis of this life-threatening condition, as well as the timely provision of qualified medical care.

Treatment of any form of hemothorax should be carried out as soon as possible, since blood is one of the most beneficial nutrient media for the propagation of pathogenic microorganisms. Obligate anaerobic flora is the most commonly found as a pathogen of infectious hemothorax [15,16].

Conservative methods of treatment with the use of antibacterial and anti-inflammatory drugs are used only in the case of minor hemothorax, with no severe disorders in patient's health. Conservative treatment should be performed under obligatory X-ray monitoring. The optimal term for minor hemothorax resorption is from two weeks to one month. In order to accelerate the process of blood clots resorption in patients with signs of reduced hemothorax, it is advisable to prescribe proteolytic enzymes parenterally (Chymotrypsin 25 mg intramuscularly once daily for a course of at least 15 injections), as well as by direct irrigation of the pleural cavity with solutions of urokinase and streptokinase.

Thus, in order to provide qualified medical aid to patients with polytrauma, it is necessary to develop a personalized approach with the compilation of individual algorithms involving a multidisciplinary team.

References

1. Kavalersky G.M., Garkavy A.V. 7.1 Klassyfykatsyya polytravm. Osobennosty klynicheskoho techenyya y dyahnostyky [7.1 Classification of polytrauma. Features of clinical course and diagnostics] // Medytsyna chrezvychnykh sytuatsyy. Khyrurhyia katastrof [Medicine of emergency situations. Surgery of disasters]. – Moscow: Medical information agency, 2015. – 376 p.
2. Fil A.Yu., Fil Yu.Ya. Suchasna taktyka nadannya dopomohy pry skeletnykh travmi postrazhdalym iz politravmoyu (ohlyad literatury) [Modern tactics of assistance in case of skeletal trauma suffered from polytrauma (review of literature)]//Trauma. – 2014. – N 1. – P. 125-128
3. Guriev S., O. Tanasienko, Suchasna klasyfikatsiya infektsiynykh uskladnen' u postrazhdalym iz politravmoyu [Modern classification of infectious complications in patients suffering from polytrauma]//Trauma. – 2013. – T. 14, No. 6. – P. 21-23.
4. Pathophysiology of polytrauma — Keel, M. & Trentz O. — Injury, Volume 36, Issue 6. – P. 691-709
5. Ahmad T., Ahmed S.W., Soomro N.H., Sheikh K.A. Thoracoscopic evacuation of retained posttraumatic hemothorax//Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan. - 2013. - Vol. 23 (3). - P. 234-236.
6. de Rezende-Neto J.B., PastoreNeto M., Hirano E.S., Rizoli S., Nascimento B. Jr., Fraga G.P. Management of retained hemothoraces after chest tube thoracostomy for trauma//Rev Col Bras Cir. - 2012. - Vol. 39 (4). - P. 344-349.
7. DuBose J., Inaba K., Demetriades D., Scalea T.M., et al. Management of post-traumatic retained hemothorax: a prospective, observational, multicenter AAST study//Trauma Acute Care Surg. - 2012. - Vol. 2 (1). - P. 11-22.
8. Hsing-LinLin, Wen-Yen Huang, ChyanYang, Shih-MinChou et al. How early should VATS be performed for retained hemothorax in blunt chest trauma?//Injury. - 2014. Vol. 45 (9). - P. 13591364.
9. Karmy-Jones R., Holevar M., Sullivan R.J., Fleisig A., Jurkovich G.J. Residual hemothorax after chest tube placement correlates with increased risk of empyema following traumatic injury//Can Respir J. - 2008. - Vol. 15 (5) - P. 255-258.
10. Meyer D.M., Jessen M.E., Wait M.A., Estrera A.S. Early evacuation of traumatic retained hemothoraces using thoracoscopy: a prospective, randomized trial//Ann Thorac Surg. - 1997. - Vol. 64(5). - P. 1396-1400.
11. Morales Uribe C.H., Villegas Lanau M.I., Petro Sánchez R.D. Best timing for thoracoscopic evacuation of retained post-traumatic hemothorax//SurgEndosc. - 2008. - Vol. 22 (1). - Pp. 91-95.
12. Navsaria R.H., Vogel R.J., Nicol A.J. Thoracoscopic evacuation of retained posttraumatic hemothorax. Ann ThoracSurg. - 2004. - Vol. 78 (1). - P. 282-285.
13. Nathan T.M., Oliver L.G., Bryan R.C., Jose J.D. et al. Пра^М Management Guidelines for Management of Hemothorax and Occult Pneumothorax//The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care. - 2011. Vol. 70 (2). - P. 510-518.
14. Smith J.W., Franklin G.A., Harbrecht B.G., Richardson J.D. Early VATS for blunt chest trauma: a management technique underutilized by acute care surgeons//Trauma. - 2011. - Vol. 71 (1). - P. 105-107.
15. Abakumov, A.M. Travmaticheskiy Svernuvshiysya Gemotoraks (diagnostika i lechenie) Dis. ... Kand. Med.nauk [Traumatic Hemothorax Coagulated Dissertation of the Candidate of Medical Sciences]. – Moscow, 2003. 168 p
16. Dergunova, S.A. Optimizatsiya Khirurgicheskoy Taktiki Pri Razlichnykh Vidakh Gemotoraksa Dis. ... Kand. Med.nauk [Optimization of Surgical Tactics for Different Kinds of Hemothorax Dissertation of the Candidate of Medical Sciences]. – Samara, 2005. 130 p.

© Ружанська В.О., Сивак В.Г., Лозинська М.С., Жебель В.М.
 УДК: [612.172+577.112]:575.22-055.1

ГАЛЕКТИН-3 ЯК МАРКЕР ФУНКЦІЇ МІОКАРДУ У ЧОЛОВІКІВ 40-60 РОКІВ БЕЗ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ПАТОЛОГІЇ, НОСІЇВ ПОЛІМОРФНИХ ГЕНІВ АТ1Р*

Ружанська В.О., Сивак В.Г., Лозинська М.С., Жебель В.М.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова, м.Вінниця

В роботі вивчалися концентрації галектина-3 і МНП, показателі центральної і системної гемодинамики у носіїв поліморфних генів АТ1Р і структурно-функціональні показателі серця у чоловіків без серцево-судинної патології (n=79) які проживають на території Подільського регіону. Генотипування гена АТ1Р проводилося за допомогою полімеразно-цепної реакції. Рівень галектина-3 і МНП визначали за допомогою методу імуноферментного аналізу. Виявилось, що у практично здорових чоловіків жителів Подільського регіону домінує генотип А1166А. Все ж рівень галектина-3 і МНП в досліджуваній популяції суттєво не відрізняється від носійства конкретного варіанта гена АТ1Р.

Ключевые слова: поліморфізм гена рецептора ангіотензину II типу 1 (АТ1Р), галектин-3, мозговий натрійуретический пептид, артеріальне тиснення.

Вступ

Вікова перебудова структури серця, розширення його камер, зменшення еластичності кардіальних клітин та зниження рухомості серцевих структур, затримка рідини і ремоделювання судин, що підвищує навантаження на лівий шлуночок (ЛШ), нейрогуморальна атака є одними з можливих ланок патогенезу серцевої недостатності особливо на тлі серцево-судинної патології [13]. Для лікарів всього світу пошук ефективного скринінгового інструменту асимптомної дисфункції ЛШ, стратифікації ризику та загального прогнозу, якості життя слугує предметом багатьох наукових аналізів та обговорень. Одним із напрямків таких пошуків є застосування сучасних біомаркерів стану міокарду. До теперішнього часу визначено велику кількість (понад 100) біомаркерів, які мають тісний зв'язок з погіршенням функції міокарду, проте інтерпретація таких аналізів і їх клінічного значення дуже часто є недостатньою. З них в клінічній практиці для діагностики гострої і загострення хронічної серцевої недостатності (ХСН) найбільш широко застосовують системи предствників натрійуретичних пептидів (НУП), а саме мозковий натрійуретичний пептид (МНП). НУП – група циркулюючих в крові гормонів, що регулюють водно-сольовий гомеостаз та артеріальний тиск (АТ). В фізіологічних умовах так і при формуванні серцево-судинної патології НУП відіграють важливу роль в регуляції структурно-функціонального стану серцево-судинної патології. МНП вважають серцевим гормоном, що регулює об'єм рідини в організмі і АТ, зменшує переднавантаження та постнавантаження на серце. Його дія призводить до збільшення швидкості клубочкової фільтрації, натрійурезу, блокаді ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, придушення спонтанної та індукованої ангіотензином II спраги, гальмуванню виділення аргініну і вазопресину, зменшенню вазоконстрикторної дії ендотеліну-1, а також симпатичної іннервації судин. Внаслідок цього відбувається зниження тиску в порожнинах серця, тону судин, загального периферичного опору і АТ [8]. У багатьох дослідженнях показано, що активація синтезу МНП відбувається у пацієнтів з дисфункцією ЛШ, як з

асимптомною, так і з клінічно вираженою дисфункцією міокарду, незалежно від її причини [5]. Встановлено позитивний лінійний зв'язок між рівнем МНП та кінцево-діастолічним тиском у ЛШ [6] і відповідно розвитком діастолічної дисфункції міокарда [18], що дозволяє розглядати МНП, як можливий маркер стану функції серця. Однак, в той же час прогностичне значення даного маркера для стратифікації ризику на сьогодні вважається недостатнім, у зв'язку з чим для визначення більш точного прогнозу у хворих з міокардіальною дисфункцією доцільно як сумісне використання відомих біомаркерів, так і пошук нових.

Одним з таких біомаркерів є галектин-3, який являється представником родини галектинів, є індуктором міграції макрофагів, проліферації фібробластів та синтезу колагену. Галектин-3 може бути одним з можливих показників синдрому серцевої недостатності, адже відображає активність процесу запалення та фіброзу, практично не виявляється у кардіоміоцитах, тоді як фібробласти міокарда експресують його високий рівень [17]. При потрапленні у міокард він через паракринний ефект стимулює швидке збільшення міофібробластів та вивільнення проколагену 1 у позаклітинну матрицю, що призводить до серцевого фіброзу [23]. Експресія галектину-3 має достовірну кореляцію з ФВ ЛШ підвищується у пацієнтів зі зниженою та збереженою фракцією викиду лівого шлуночка незалежно від етіології міокардіальної дисфункції, коли ще немає клінічних проявів [16]. Ці дані можуть свідчити про більш виражений фіброз міокарду у осіб зі зниженою ФВ, що призводить до прогресування діастолічної дисфункції ЛШ [4]. Рівень галектину-3 у хворих на ХСН на тлі артеріальної гіпертензії був у 1,5 разів вищим порівняно з хворими без такої відповідно [14]. У плазмі крові рівень галектину-3 найбільше корелює з високим ризиком кардіоваскулярної смертності та повторної госпіталізації у пацієнтів з ХСН [20]. Галектин-3 був затверджений, як біомаркер з незалежним прогностичним значенням у пацієнтів з гострою та хронічною серцевою недостатністю, а також з його допомогою можна спрогнозувати короткочасну (60-денну) смертність, адже біомаркер МНП краще використовувати для довготривалого прогнозу (4 роки) [26]. З

* Цитування при атестації кадрів: Ружанська В.О., Сивак В.Г., Лозинська М.С., Жебель В.М. Галектин-3 як маркер функції міокарду у чоловіків 40-60 років без серцево-судинної патології, носіїв поліморфних генів АТ1Р. // Проблеми екології та медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 33–37.

2013 року галектин-3 включений до чинної клінічної угоди Американської асоціації серця з профілактики та лікування ХСН, як додатковий маркер стратифікації високого ризику виникнення несприятливих клінічних результатів (смерть і повторна госпіталізація) [27].

Вищезгадані патологічні процеси в міокарді маркером яких є МНП та галектин-3, стимулюються, як відомо, норадреналіном, альдостероном та ангіотензином II [7]. Останній реалізує свій вплив через АТ1Р, отже, поліморфізм цих рецепторів може стати «умовним тригером» регуляції рівня МНП та галектину-3.

Результати багатьох експериментальних та клінічних досліджень дозволяють стверджувати, що у патогенезі дисфункції міокарду одна з основних ланок – активація компонентів ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) та її ефекторного гормону ангіотензину II [12]. Ген АТ1Р картований у 3-й хромосомі (3q21-3q25), він містить 5 екзонів і на сьогодні описано близько 16 структурних поліморфізмів цього гена. Проте, виявилось, що саме поліморфізм-заміна у положенні 1166 аденіну (А) на цитозин (С) пов'язаний з функціональною активністю АТ1Р [21]. Для представників Подільського регіону України показаний зв'язок розвитку ГХ з поліморфізмом АТ1Р серед чоловіків 40-60 років, у ході досліджень встановлено, що для носіїв алелі С ймовірність розвитку вираженої ексцентричної ГЛШ та діастольної дисфункції серця в процесі перебігу ГХ є суттєво вищою, ніж для носіїв лише алелі А [3,9,11]. Вірогідність захворіти на гіпертонічну хворобу при наявності у пацієнта генотипу А1166С підвищується в 1,3 рази [23].

Таким чином, знаходячи можливі асоціативні зміни носійства поліморфних генів АТ1Р та рівнів галектина-3 і МНП у осіб, які не мають серцево-судинної патології можливо в подальшому опиратись на ці маркери в прогнозуванні структурних змін міокарду у хворих з ГХ та ХСН аналогічного віку та статі.

Раніше подібні дослідження в Україні не проводились. В статті представлений перший етап у вигляді результатів обстеження чоловіків 40-60 років без серцево-судинної патології, мешканців Подільського регіону України.

Мета роботи: вивчити рівні біомаркерів галектину-3 і МНП в плазмі крові та відповідний стан структурно-функціональних показників міокарду у чоловіків 40-60 років без ознак серцево-судинної патології, носіїв поліморфних генів АТ1Р.

Матеріали і методи дослідження

При проведенні дослідження було обстежено 79 чоловіків 40-60 років без ознак серцево-судинної патології, що проживають на території Подільського регіону. Середній вік обстежуваних становив $57,06 \pm 0,50$ років. Усі чоловіки знаходились на обстеженні у Вінницькому обласному спеціалізованому клінічному диспансері радіаційного захисту населення МОЗ України і Військово-медичному клінічному центрі Центрального регіону Військово-повітряних сил України, а також спостерігались амбулаторно з грудня 2013 року по липень 2014 року. Усі чоловіки, що увійшли в групу дослідження на момент огляду скарг з боку серцево-судинної системи не пред'являли і не

мали об'єктивних патологічних ознак. Для визначення алелей поліморфної ділянки (А1166С) гена АТ1Р використовувався метод полімеразної ланцюгової реакції. Генотипування гена АТ1Р проводилось спільно з НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава, керівник професор Кайдашев І.П.). Для визначення алелей поліморфної ділянки (А1166С) гена АТ1Р проводилось виділення геномної ДНК із лейкоцитів венозної крові. Концентрація МНП у плазмі крові у обстежуваних визначалась за допомогою імуноферментного методу на стриповому імуноферментному аналізаторі "Humanareader single" (Німеччина) при довжині хвилі 450 нм та диференційним фільтром 630 нм. Для визначення плазмової концентрації МНП використовували стандартний набір фірми "Peninsula laboratories Inc." (США). Концентрацію галектину-3 в плазмі крові обстежуваних визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою апарату «Stat Fact 330» при довжині хвилі 450 нм та диференційним фільтром 630 нм. Для визначення плазмової концентрації галектину-3 використовували стандартний набір реактивів фірми «Bender MedSystems GmbH» (Австрія). Було проведено перевірку розподілу частот поліморфних генів у популяції відповідно до закону рівноваги Харді-Вайнберга за допомогою калькулятора ген експерт для розрахунку ряду статистичних параметрів у дослідженнях «випадок-контроль», що використовують SNP (Государственный Научный Центр Российской Федерации "ГосНИИ генетика", gen-exp.ru). Оцінку параметрів системної та внутрішньосерцевої гемодинаміки проводили за допомогою УЗД серця, яке виконувалось на ехограмі "Sim5000 Plus". Маса міокарда лівого шлуночка (ММЛШ) – розраховувалась за формулою Penn Convention, індекс маси міокарда лівого шлуночка ($г/м^2$) (iММЛШ). Реєстрація ЕКГ проводилась за загальноприйнятою методикою у 12 стандартних відведеннях. Вимірювання артеріального тиску здійснювали згідно рекомендаціям експертів ВООЗ. Математичну обробку виконували на персональному комп'ютері з використанням стандартного статистичного пакету STATISTICA 10,0.

Результати та їх обговорення

В обраній популяції осіб було визначено частоту носійства різних варіантів гена АТ1Р поліморфізмом із заміною аденіна на цитозин в 1166 положенні.

Встановлено, що у осіб чоловічої статі частота генотипу А1166А гена АТ1Р складає 62,03% (n=49), генотипу А1166С - 30,38% (n=24), а генотипу С1166С - 7,59% (n=6) ($p_{aa-cc} \leq 0,05$; $p_{ac-cc} > 0,05$; $p_{ac-aa} \leq 0,05$). При вивченні частотного розподілу алелей гена АТ1Р було встановлено, що серед чоловіків без серцево-судинної патології алель А зустрічається у 75,16% осіб, алель С – у 24,84%. При порівнянні частот алелей гена АТ1Р також виявлені достовірні розбіжності ($p < 0,05$). Таким чином, у чоловіків без серцево-судинної патології переважає генотип А1166А гена АТ1Р (Рис. 1). Подібну частоту зустрічаємості поліморфних генів АТ1Р та алелей відзначали у мешканців Поділля і раніше [1,2,10,11,12].

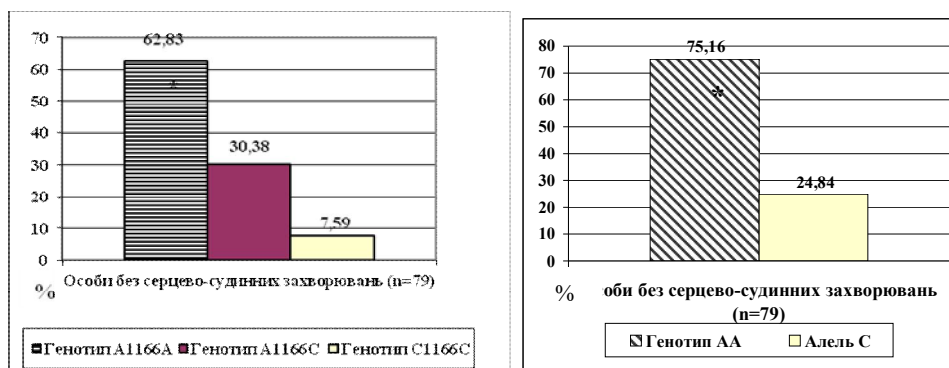


Рис. 1. Розподіл частот генотипів та алелів гена AT1P серед чоловіків без серцево-судинної патології 40-60 років мешканців Подільського регіону, (%).

Примітка: різниця показників достовірна ($p < 0,05$) при порівнянні з: * - генотипом A1166C/алеллю C в межах групи.

Подібний зв'язок виявлений у жителів Москви алель A та генотип AA гена AT1P зустрічається значно частіше у практично здорових людей [15]. У представників французької популяції алель A також достовірно частіше виявлялась серед осіб без серцево-судинної патології [25]. Є дані, що для японської популяції існує асоціація між носійством CC-генотипу та підвищеним індексом маси міокарда ЛШ як при нормальному АТ, так і у гіпертензивних осіб [24]. Кореляція носійства генотипу CC з розвитком АГ знайдена і у китайській популяції [19]. В Україні також проводились дослідження серед мешканців Полтави хворих на гіпертонічну хворобу частота виявлення генотипів AC та CC вдвічі більша, а питома вага носіїв генотипу AA у 4 рази менша ($p < 0,05$) у порівнянні зі здоровими особами. Подібний зв'язок розвитку неускладненої ГХ з поліморфізмом AT1R серед чоловіків зрілого віку, мешканців Вінницької області прослідковувався у дослідженні проведеному співробітниками кафедри внутрішньої медицини медичного факультету №2 ВНМУ імені М.І. Пирогова. Як і у жителів Полтави, у мешканців Вінниччини була доведена достовірно більша частота розповсюдженості генотипів A1166C та C1166C та алелі C у хворих з ГХ. Також встановлена асоціація носійства генотипу A1166C та алелі C у хворих на ГХ із формуванням вираженої ЕГЛШ, систолічної та діастолічної дисфункції міокарда ЛШ та формуванням ХСН [11,12].

Встановлено, що у жінок без серцево-судинної патології переважає генотип A1166A гена AT1P, а успа-

дкування жінками постменопаузного віку мешканок м. Вінниці та Вінницької області, генотипів гена AT1P із наявністю алелі C – A1166C та C1166C, асоціюється з вищою ймовірністю виникнення ХСН II А стадії II-III ФК за NYHA на тлі ГХ [10].

За нашими даними у носіїв генотипу A1166A виявлено достовірно меншу частоту зустрічаємості обтяженої спадковості порівняно з носіями алелі C (20,61% і 83,33% відповідно).

Отже, поліморфізм AT1R є фактором, який може бути використаним для пошуку можливої безсимптомної дисфункції міокарду асоціації патології з активацією РААС. Відповідно, як зазначалось вище, з таким поліморфізмом очікуються зміни в концентрації біомаркерів, які відображають активність систем протидії РААС (МНП) або наслідки її впливу. На структурну морфологію міокарду зокрема на процеси у сполучній тканині, які певною мірою відбиває концентрація галектину-3.

Враховуючи фактори які можуть відбивати активацію РААС було досліджено зміни частоти зустрічаємості різних категорій АТ (в рамках «нормальних величин»).

У носіїв алелі A оптимальний АТ зустрічається у 26,03% (1) осіб, нормальний АТ - 49,32% (2), високий нормальний АТ - 24,65% (3) ($p_{2-1} < 0,05$, $p_{3-1} > 0,05$, $p_{3-2} < 0,05$). У носіїв алелі C оптимальний АТ визначається у 33,33% (1) чоловіків, нормальний АТ - 16,67% (2), високий нормальний АТ - 50% (3) ($p_{2-1} < 0,05$, $p_{3-1} > 0,05$, $p_{3-2} > 0,05$). Отже, у носіїв алелі C високий нормальний АТ виявляється вірогідно частіше, ніж у носіїв алелі A гена AT1P ($p < 0,05$). (Рис. 2).

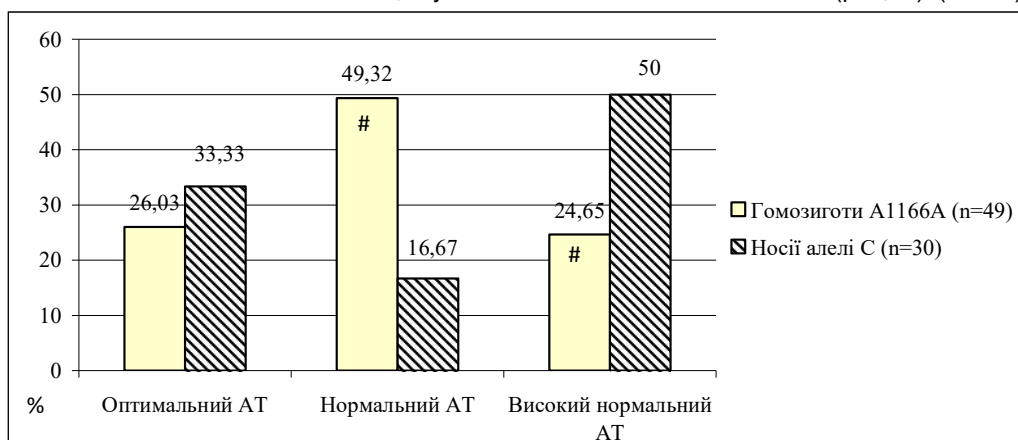


Рис. 2. Частота розподілу окремих категорій нормального АТ у чоловіків без серцево-судинної патології 40-60 років мешканців Подільського регіону, носіїв різних алелів гена AT1P, (%).

Примітки: різниця показників достовірна ($p < 0,05$) при порівнянні з: # - оптимальним АТ в межах групи носіїв алелі C гена AT1P.

В результаті проведеного дослідження було встановлено що при носійстві алелі С реєструється найвищий середній показник систолічного артеріального тиску (САТ).

Цікавим виявився той факт, що рівень галектину-3 у чоловіків без серцево-судинної патології, при різних

категоріях нормального АТ були суттєво відмінними. Зокрема концентрація галектину-3 на відміну від вмісту МНП у осіб з нормальним та високим нормальним АТ була вищою ніж при оптимальному АТ. (Рис.3).

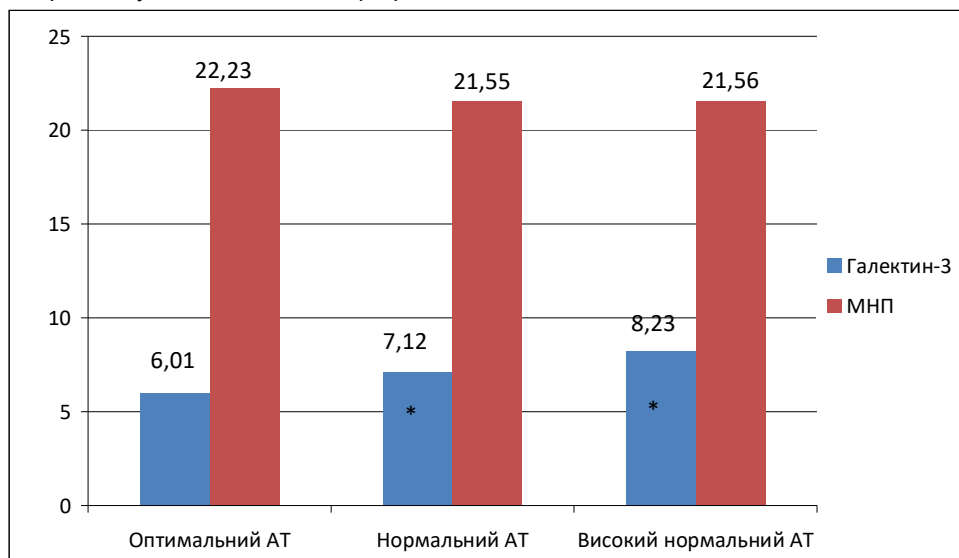


Рис. 3. Рівень галектину-3 та мозкового натрійуретичного пептиду в плазмі крові у чоловіків без серцево-судинної патології, носіїв різних генотипів гена АТ1R при різних категоріях нормального АТ (нг/мл; пг/мл).

Примітка: різниця показників достовірна ($p \leq 0,05$) при порівнянні з:

* - в межах групи при різних категоріях АТ для показників галектину-3.

За даними літератури відома залежність концентрацій МНП в плазмі крові та ожиріння при ХСН було вирішено дослідити рівні плазмової концентрації галектину-3 та МНП у чоловіків без серцево-судинної патології при різному ІМТ. Достовірної різниці в рівнях МНП при наявності або відсутності ожиріння не виявлено ($p > 0,05$), що відповідає результатам досліджень які проведено раніше [1].

На відміну від МНП, рівень галектину-3 при надмірній масі тіла становив – $(7,31 \pm 0,27)$ нг/мл ($n=29$), а при нормальній масі тіла відповідно – $(6,40 \pm 0,36)$ нг/мл ($n=50$) ($p < 0,05$). Таким чином при проведенні досліджень з використанням галектину-3 потрібно враховувати знайдений феномен.

Висновки

1. Серед чоловіків, мешканців Подільського регіону України 40-60 років без серцево-судинної патології переважає генотип А1166А гена АТ1R.

2. Рівень галектину-3 та МНП у дослідженій популяції суттєво не залежав від носійства певного варіанту гена АТ1R.

3. Концентрація галектину-3 у чоловіків без ознак серцево-судинної патології з нормальним та високим нормальним АТ була вищою ніж при оптимальному АТ.

4. Рівень галектину-3 на відміну від МНП в плазмі крові вищий при надмірній масі тіла.

Перспективи подальших розробок

1. Є досить актуальним вивчення фенотипових маркерів, як найбільш простих, доступних і прийнятних в практичній діяльності лікаря критеріїв ризику розвитку ГХ.

2. Зрозуміло виникає питання змін концентрації галектину-3 в сполученні з МНУП при успадкуванні

різних варіантів АТ1R, враховуючи асоціацію останніх з тими ж самими процесами в міокарді від яких може залежати вміст в плазмі крові цього біомаркера.

Література

- Бланар О. Л. Особливості продукції В-натрійуретичного пептиду у осіб з ожирінням. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми терапії: від гіпотез до фактів»: 2005 Тези доповідей, 346.
- Бланар О. Л. Спадковість та структурно-функціональні зміни серця у хворих на гіпертонічну хворобу, ускладнену серцевою недостатністю // Сімейна медицина. – 2009. - № 2. – С. 79-85.
- Гефтер, Ю.О. Стан міокарду у хворих на гіпертонічну хворобу в залежності від варіанту генотипу рецепторів ангіотензину II 1-го типу та наявності судинних ускладнень // Галицький вісник. – 2006. - № 1 (13). – С. 20-24.
- Драпкина, О. М. Применение биологических маркеров в диагностике диастолической сердечной недостаточности // Журнал Сердечная недостаточность. - №12 (6). С. 364–372.
- Коваленко В.М., Камінський О.Г. Академік М.Д.Стражеско і розвиток вітчизняної кардіології та ревматології. - 2001: Київ. МОПІОН.
- Коваленко В.М., Корнацький В.М. Динаміка стану здоров'я народу України та регіональні особливості. 2009, Аналітично-статистичний посібник. Київ. Медінформ.
- Коваленко В.Н., Талаева Т.В. Сердечно-сосудистые заболевания и ренин-ангиотензиновая система.- 2013, Київ. Морион.
- Корнацький В.М., Дорогой А.П., Манойленко Т.С. Серцево-судинна захворюваність в Україні та рекомендації щодо покращання здоров'я в сучасних умовах. – 2012, Київ.
- Лозинський, С.Е. Роль поліморфізму А1166С гена рецепторів до ангіотензину-II першого типу (АТ1R) у виникненні артеріальної гіпертензії та гіпертрофії лівого шлуночка у мешканців Поділля // Общяя медицина. – 2012. -№ 5. – С. 87-101.

10. Сакович О. О. Успадкування поліморфних генотипів гена рецептора ангіотензину II 1-го типу та фактори ризику розвитку гіпертонічної хвороби у жінок, які проживають у Вінницькій області // Запорозький медичний журнал. – 2011. - №4(13). С. 44-47.
11. Старжинська, О.Л. Особливості перебігу гіпертонічної хвороби у чоловіків з різними генотипами рецептора ангіотензину II 1-го типу // Biomedical and Biosocial Anthropology/ - 2005. - №4. – С. 171-177.
12. Старжинська О.Л. (2013). Поліморфізм генів ренін-ангіотензин-альдостеронової системи в кардіології. // Biomedical and biosocial anthropology. – 2013. - № 20. – С. 204-207.
13. Токарь, А.В., Ена Л.М. Артериальная гипертензия в пожилом и старческом возрасте. 1989, Киев. Здоровье.
14. Целуйко, В.Й. Галектин-3 у хворих на хронічну серцеву недостатність // Український кардіологічний журнал. – 2014. - № 3. -С. 77-81.
15. Чистяков Д.А. Поліморфізм гена судинного рецептора ангиотензина II и сердечно-сосудистые заболевания // Терапевтический архив. – 2000. - № 4. – С. 27-30.
16. De Boer R.A. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression // Eur J Heart Fail. -2009. - №11, 811-817.
17. De Filippi, C.R. Galectin-3 in heart failure – linking fibrosis, remodeling, and progression. US // Cardiology. – 2010. - Vol.7. – P. 67-70.
18. Edelmann, F. Galectin-3 in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results from the Aldo-DHF // European Journal of Heart Failure. – 2015. – Vol.17. – P. 214-223.
19. Feng, X. A systematic review and meta-analysis of the association between angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism and myocardial infarction susceptibility // Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System. – 2012. - Vol.23. – P. 1-9.
20. Milting, H. (2008). Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices // J Heart Lung Transplant. – 2008. - Vol.27. – P. 589–596.
21. Poirier, O. (1998). New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde // J. Hypertens. -1998. – Vol.10. – P.- 1443-1447.
22. Roig E.(2000). Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. // Eur Heart J. – 2000 – Vol.21(1). – P. 53-57.
23. Suarez, G. Heart failure and galectin 3. // Annals of Translational Medicine. – 2014. –Vol. 2 (9). – P. 86-92.
24. Takami, S. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. // Am. J. Hypertension. -1998. – Vol. 11. – P. 316-321.
25. Tiret L.,Blanc H., Ruidavets J.B. et al. Gene polymorphisms of the rennin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: PEGASE study. Project d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a Moderee Essentielle // J Hypertens.-1998.- Vol.16. – P. 37-44.
26. E.Wilson Grandin. Galectin-3 and the Development of Heart Failure after Acute Coronary Syndrome: Pilot Experience from PROVE IT-TIMI 22. // Clinical Chemistry. – 2012. – Vol. 58(1). – P. 267-273.
27. Yancy C.W. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. // J. Am. Coll. Cardiol, 2013. – Vol.62(16). – P. 147-239.

Матеріал надійшов до редакції 22.02.2018

ENGLISH VERSION: GALECTIN-3 AS A MARKER OF MYOCARDIAL FUNCTION IN MEN AGED 40-60 YEARS WITHOUT CARDIOVASCULAR PATHOLOGY, CARRIERS OF POLYMORPHIC GENES AT1R*

Ruzhanska V.O., Sivak V.G., Lozinska M.S., Zhebel V.M.

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia

The concentrations of galectin-3 and BNP, central and systemic hemodynamics, structural and functional heart parameters in male carriers of polymorphic AT1R genes without cardiovascular pathology (n = 79) living in Podillya region were studied. Genotyping of the AT1R gene was carried out using a polymerase chain reaction. The level of galectin-3 and BNP was determined by the method of enzyme immunoassay. It was found that the A1166A genotype dominated in practically healthy men of Podillya region. Nevertheless, the level of galectin-3 and BNP in the studied population did not significantly depend on the carriage of a specific variant of the AT1R gene.

Key words: polymorphism of the gene of the angiotensin II receptor type (AT1R), galectin-3, brain natriuretic peptide, arterial pressure.

Introduction

The age structure of the heart, expansion of its chambers, reduction of the elasticity of the cardiac cells and decreased cardiac turnover, fluid retention and vascular remodeling, increasing the load on the left ventricle (LV), neurohumoral attack are some of the possible links to the pathogenesis of the heart failure, especially against the backdrop of cardiovascular disease, vascular pathology [13].

For doctors are around the world to find an effective screening tool for asymptomatic LV dysfunction, stratification of risk and general prognosis, quality of life serves as the subject of many scientific analyzes and discussions. One of the directions of such searches is the use of modern biomarkers for the state of myocardium. To date, a large number (over 100) of biomarkers have been identified as those, which that have a close relationship with the deterioration of the function of the myocardium, but the interpretation of such analyzes and their clinical significance is often insufficient.

Of these, in the clinical practice for the diagnosis of acute and exacerbation of chronic heart failure (CHF), the systems of subjects of natriuretic peptides (NUP), namely, the brain natriuretic peptide (BNP) is widely used. NUP - a group of circulating blood hormones that regulate water-salt homeostasis and blood pressure (BP).

In physiological conditions and in the formation of cardiovascular pathology, NUPs play an important role in the regulation of the structural and functional state of cardiovascular pathology. BNP is considered to be a cardiac hormone that regulates the amount of fluid in the body and BP, reduces preload and post-load on the heart. Its effect leads to an increase in the velocity of glomerular filtration, natriurea, blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system, suppression of spontaneous and induced angiotensin II thirst, inhibition of secretion of arginine and vasopressin, reduction of vasoconstrictive action of endothelin-1, as well as sympathetic innervation of blood vessels.

As a result, there is a decrease in pressure in the cavities of the heart, vascular tone, general peripheral resistance and AH [8]. Many studies have shown that activation of BNP synthesis occurs in patients with LV dysfunction, both with asymptomatic and clinically proven myocardial dysfunction, regardless of its cause [5]. A

positive linear correlation between the level of BNP and end-diastolic pressure in the lungs [6] and the development of diastolic dysfunction of the myocardium [18] have been established, which allows BNP to be considered as a possible marker of the state function of the heart. However, at the same time, the prognostic value of this marker for stratification of risk is currently considered insufficient, therefore, in order to determine a more accurate prognosis in patients with myocardial dysfunction, it is advisable to use both the well-known use of known biomarkers and the search for new ones as well.

One such biomarker is galectin-3, representative of the family of gallects, is an inducer of macrophage migration, fibroblast proliferation and collagen synthesis. Galectin-3 may be one of the possible indications of heart failure syndrome, since it reflects the activity of the inflammation and fibrosis, is virtually not detected in cardiomyocytes, whereas myocardial fibroblasts express its high levels [17].

When it enters the myocardium, through the paracrine effect, it stimulates the rapid increase in myofibroblasts and the release of procollagen 1 in the extracellular matrix, which leads to cardiac fibrosis [23]. Expression of galectin-3 has a reliable correlation with ejection fraction LV increases in patients with a reduced and preserved left ventricular ejection fraction, regardless to the etiology of myocardial dysfunction, when there are no clinical manifestations [16]. These data may indicate a more pronounced myocardial fibrosis in people with reduced PV, which leads to progression of diastolic dysfunction of the lungs [4]. The level of galectin-3 in patients with CHF in the background of arterial hypertension was 1.5 times higher compared with patients without this [14]. In plasma, the level of galectin-3 most closely correlated with a high risk of cardiovascular mortality and re-hospitalization in patients with CHF [20]. Galectin-3 has been approved as a biomarker with an independent prognostic value in patients with acute and chronic heart failure, and it can also be used to predict short-term (60-day) mortality, since the MSI biomarker is used better for a long-term prognosis (4 years) [26]. From 2013, galectin-3 is included in the current clinical agreement of the American Heart Association for the prevention and treatment of CHF as an additional marker for stratification of high-risk adverse clinical outcomes (death and re-admission) [27].

The aforementioned pathological processes in the

* To cite this English version: Ruzhanska V.O., Sivak V.G., Lozinska M.S., Zhebel V.M. Galectin-3 as a marker of myocardial function in men aged 40-60 years without cardiovascular pathology, carriers of polymorphic genes AT1R // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2018. - Vol 22, No 1-2. - P. 38-42.

myocardium, the markers of which are BNP and galectin-3, are stimulated, as it is known, by norepinephrine, aldosterone and angiotensin II [7]. The latter implements its influence through AT1R, therefore, the polymorphism of the receptor shop can become a "conditional trigger" for regulating the level of BNP and galectin-3. The results of many experimental and clinical studies suggest that one of the main components in the pathogenesis of myocardial dysfunction is the activation of the components of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and its effector hormone angiotensin II [12]. The AT1R gene is mapped in the 3rd chromosome (3q21-3q25), it contains 5 exons and today about 16 structural polymorphisms of this gene are described. However, it turned out that the polymorphism-substitution in position 1166 of adenine (A) on cytosine (C) was associated with the functional activity of AT1R [21].

For the representatives of the Podillya region in Ukraine, the association of development of AH with AT1R polymorphism among men 40-60 years is shown, during the researches it was determined that for carriers of allele C, the probability of the development of the expressed eccentric LFS and diastolic heart dysfunction during the course of AH is significantly higher than for carriers only allele A [3,9,11]. The probability of getting hypertension in the presence of a patient's genotype A1166C increases 1.3 times [23]. Thus, finding possible associative changes in the carrier of polymorphic AT1R genes and levels of galectin-3 and BNP in patients without cardiovascular disease may be further based on these markers in predicting structural changes in the myocardium in patients with AH and CHF of similar age and sex.

Previously, such studies were not carried out in Ukraine. The article presents the first stage in the results form of the examination men of 40-60 years without cardiovascular disease, inhabitants of the Podillya region in Ukraine.

The aim of the research was to study the level of biomarkers of galectin-3 and BNP in blood plasma and the corresponding state of structural and functional parameters of myocardium in men of 40-60 years without signs of cardiovascular pathology, carriers of AT1R polymorphic genes.

Materials and methods

During the study, 79 men of 40-60 years without signs of cardiovascular disease living in the Podillya region were examined. The average age of the subjects was 57.06 ± 0.50 years. All men were examined at the Vinnytsia Regional Specialized Clinical Dispensary of Radiation Protection of the Population of the Ministry of Health of Ukraine and the Military Medical Clinical Center of the Central Region of the Air Force in Ukraine, and also were observed outpatient from December 2013 to July 2014. All men included in the study group at the time of examination complaint from the cardiovascular system did not present and did not have objective pathological signs. To determine the alleles of the polymorphic site (A1166C) of the AT1R gene, the polymerase chain reaction method was used. The genotyping of the AT1R gene was carried out in cooperation with the Scientific and Research Insti-

tute of Genetic and Immunological Foundations of the Pathology and Pharmacogenetics of the VDNZU "Ukrainian Medical Dentistry Academy" (Poltava, head Professor Kaidashev IP). To determine the alleles of the polymorphic site (A1166C) of the AT1R gene, the genomic DNA was isolated from venous blood leukocytes.

The concentration of MNP in blood plasma in the subjects was determined using the immune enzyme method on the Humareader single-strip enzyme immunoassay analyzer (450 nm wavelength) and 630 nm differential filter. The standard set of Peninsula laboratories Inc. (USA) was used to determine the plasma concentration of BNP.

The concentration of galectin-3 in the blood plasma of the individuals was determined by the method of immunoassay analysis using the apparatus "Stat Fact 330" at a wavelength of 450 nm and a differential filter of 630 nm. A standard set of reagents from Bender MedSystems GmbH (Austria) was used to determine the plasma concentration of gallet-3. The frequency distribution of polymorphic genes in the population was checked in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium law with the help of the gene expert's calculator a number of statistical parameters in the case-control studies using SNP were calculated (the State Science Center of the Russian Federation "GosNII genetics", gen- exp.ru).

The evaluation of the parameters of systemic and intracardiac hemodynamics was performed using ultrasound of the heart, which was conducted on the echogram "Sim5000 Plus". The left ventricular myocardial mass (MMLF) is calculated using the Penn Convention formula, the left ventricular myocardial mass index (g / m^2) (IMMH). ECG registration was carried out according to the generally accepted method in 12 standard leads. Blood pressure measurements were performed according to WHO expert recommendations. The mathematical processing was performed on a personal computer using the standard statistic package STATISTICA 10.0.

Results and Discussion

In the selected population of individuals, the carrier frequency of different variants of the AT1R gene polymorphism was determined with the replacement of adenine with cytosine in 1166 position. It has been established that in male the frequency of the A1166A genotype of the AT1R gene is 62.03% ($n = 49$), the genotype A1166C is 30.38% ($n = 24$), and the genotype C1166C is 7.59% ($n = 6$) ($p_{aa-cc} \leq 0.05$; $p_{ac-cc} > 0.05$; $p_{ac-aa} \leq 0.05$). In the study of the frequency distribution of alleles AT1R gene, it was found that among men without cardiovascular pathology, allele A occurs in 75.16% of the individuals, allele C - at 24.84%. When comparing allelic frequencies of the AT1R gene, significant differences were found ($p < 0.05$).

Thus, in men without cardiovascular disease, the genotype A1166A of the AT1R gene dominates (Figure 1). A similar frequency of occurrence of polymorphic AT1R genes and alleles was noted among the inhabitants of Podillya [1, 2, 10, 11, 12].

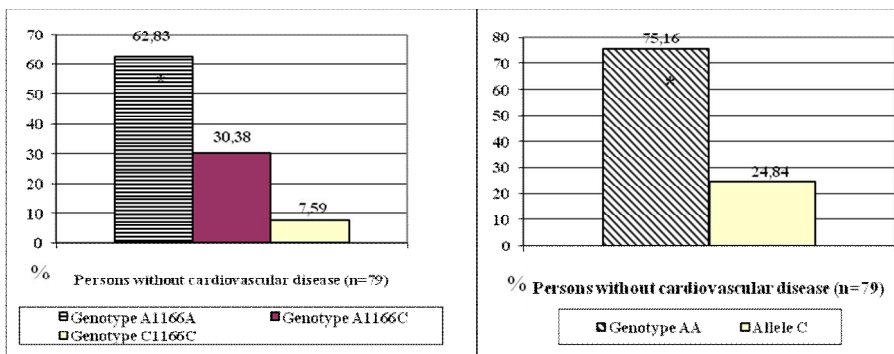


Figure 1. Distribution of the frequencies of the genotypes and alleles of the AT1R gene among men without cardiovascular pathology of 40-60 years old inhabitants of the Podillya region (%).

Note: the difference between the indices is significant ($p \leq 0.05$) when compared with:
 * - the genotype A1166C / allele C within the group.

A similar relationship found in the inhabitants of Moscow allele A and the genotype AA gene AT1R is found much more often in apparently healthy people [15]. Representatives of the French population of allele A were also significantly more likely to be found among people without cardiovascular disease [25]. There is evidence that for the Japanese population, there is an association between the carriage of the CC genotype and the increased mass index of myocardial infarction both in normal blood pressure and in hypertensive individuals [24]. Correlation of carriers of the CC genotype with the development of AH was found in the Chinese population [19].

In Ukraine, also among Poltava residents, hypertensive patients were twice as likely to have genotypes of the AC and CC, as the proportion of AA carriers was 4 times lower ($p \leq 0.05$) compared with healthy individuals. A similar connection of the development of uncomplicated AH with polymorphism AT1R among men of mature age, residents of Vinnytsia region was followed in a study conducted by the staff of the Department of Internal Medicine of the Medical Faculty №2 of the VNMU named after M.I. Pirogov.

As with the inhabitants of Poltava, the residents of Vinnytsia showed a significantly higher prevalence of genotypes A1166C and C1166C and allele C in patients with AH. Also, the association carriage of the genotype A1166C and allele C in patients with GC with the formation of expressed EGLV, systolic and diastolic dysfunctions of the myocardium LV and the formation of CHF [11,12] was established.

It is established that in women without cardiovascular pathology the genotype A1166A of the AT1R gene prevails, and the inheritance of women of postmenopausal

age of inhabitants of Vinnytsia and Vinnytsia region, the genotypes of the AT1R gene with the presence of allele C-A1166C and C1166C, is associated with a higher probability of the occurrence of CHF II A stage II-III FC for NYHA against the background of AH [10].

According to our data, the carriers of the genotype A1166A revealed a significantly lower frequency of encountered heredity compared to carriers of allele C (20.61% and 83.33% respectively). Consequently, AT1R polymorphism is a factor that can be used to search for possible asymptomatic myocardial dysfunction associated with pathogenesis with RAAS activation. Accordingly, to what has been mentioned above, changes in the concentration of biomarkers reflecting the activity of anti-RAAS (BNP) systems or the results of its effects are expected with such polymorphism. It depends on the structural morphology of the myocardium in particular on the processes in the connective tissue, which to a certain extent reflects the concentration of galectin-3. Taking into account the factors that may reflect the activation of RAAS, changes in the frequency of different categories occurrence of blood pressure (within the limits of "normal values") were investigated.

In carriers of allele A, optimal blood pressure is found in 26.03% (1), normal blood pressure is 49.32% (2), high normal blood pressure is 24.65% (3) ($p_{2-1} < 0.05$, $p_{3-1} > 0.05$, $p_{3-2} < 0.05$). In carriers of the allele C optimal blood pressure is determined in 33.33% (1) men, normal blood pressure - 16.67% (2), high normal blood pressure - 50% (3) ($p_{2-1} < 0.05$, $p_{3-1} > 0.05$, $p_{3-2} > 0.05$). Consequently, in carriers of the allele C, high normal blood pressure is more likely to be detected than carriers of the allele A of the AT1R gene ($p < 0.05$). (Figure 2).

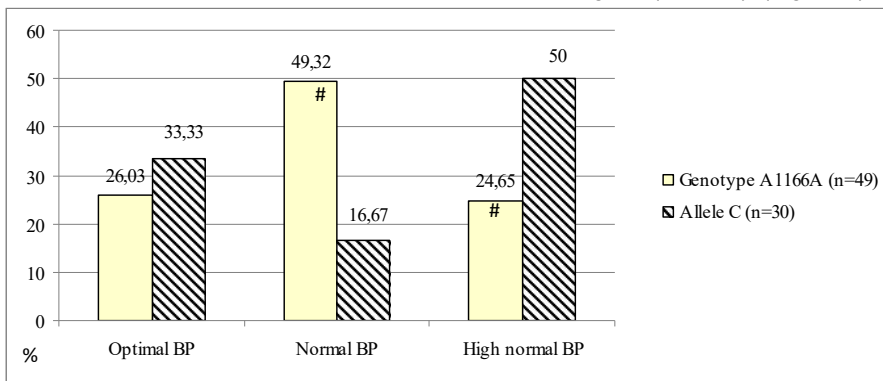


Fig. 2. Frequency of certain categories distribution of normal blood pressure in men without cardiovascular pathology of 40-60 years old inhabitants of the Podillya region, carriers of various alleles of the AT1R gene, (%).

Notes: the difference between the indices is significant ($p < 0.05$) when compared with:
 # - the optimal BP within the group of carriers of the allele C of the AT1R gene.

As a result of the study, it was determined that the highest mean systolic blood pressure (SBP) was recorded with allele C.

Interesting is the fact that the level of galectin-3 in men without cardiovascular disease, with different cate-

gories of normal blood pressure, was significantly different. In particular, the concentration of galectin-3 in contrast to the content of BNP in individuals with normal and high normal blood pressure was higher than with optimal blood pressure (Fig.3).

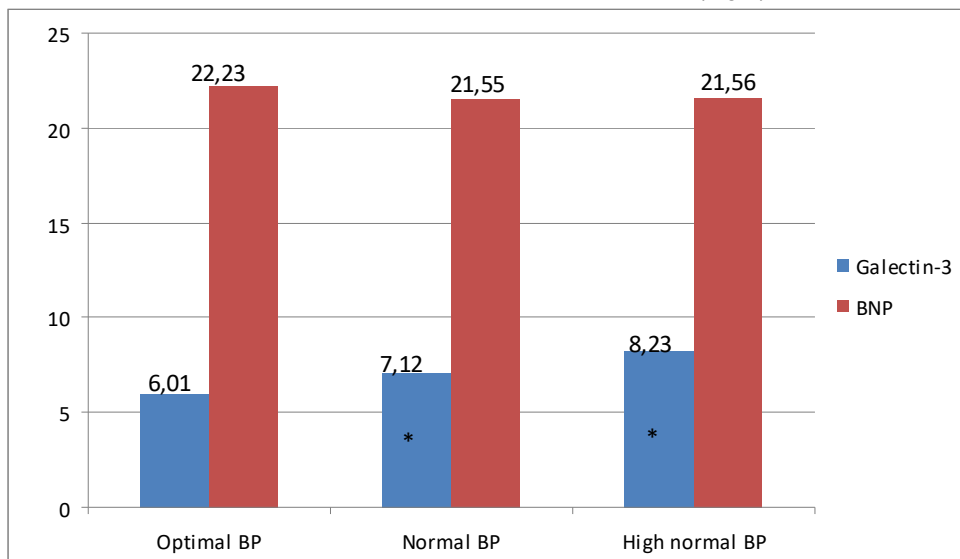


Fig. 3. Level of galectin-3 and cerebral sodiumuretic peptide in blood plasma in men without cardiovascular pathology, carriers of different genotypes of the AT1R gene in different categories of normal blood pressure (ng / ml, pg / ml).

Note: the difference between the indices is reliable ($p < 0.05$) when compared with:

* - within the group for different categories of blood pressure for the indicators of galectin-3.

According to the scientific literature, the known dependence of BNP concentrations in blood plasma and obesity in CHF was resolved to investigate plasma levels of galectin-3 and BNP in men without cardiovascular pathology at different body mass index. There was no significant difference in the levels of BNP in the presence or absence of obesity ($p > 0.05$), which corresponds to the results of previous studies [1].

Unlike BNP, the level of galectin-3 with excess body weight was - (7.31 ± 0.27) ng/ml ($n = 29$), and at normal body weight - (6.40 ± 0.36) ng/ml ($n = 50$) ($p < 0.05$). Thus, in conducting research using the gallet-3, one must take into account the phenomenon which was found.

Conclusions

1. Among the men who inhabit the Podillya region of Ukraine aged 40-60 years without cardiovascular pathology, the genotype A1166A of the AT1R gene prevails.

2. The level of galectin-3 and BNP in the studied population did not significantly depend on the carrier of a particular variant of the AT1R gene.

3. The concentration of galectin-3 in men without signs of cardiovascular disease with normal and high normal blood pressure was higher than with optimal blood pressure.

4. The level of galectin-3 in contrast to BNP in blood plasma is higher with excessive body weight.

Prospects for further studies

1. It is very relevant to study the phenotypic markers, as the most simple, available and acceptable in the doctor's practice criteria for the risk of AH development.

2. Certainly, the question arises about changes in the concentration of galletin-3 in combination with BNUP when inheriting various variants of AT1R, taking into account the association of the latter with the same proc-

esses in the myocardium, which may depend on the content of plasma in the blood of this biomarker.

References

1. Blanar O. L. Spadkovist' ta strukturno-funkcional'ni zmini serzya u chvorich na gipertonichnu chvorobu, usklad-nenu serzevoyu nedostatnisty // Simeyna medizina. – 2009. - № 2. – S. 79-85.
2. Gefter, Yu.O. Stan miokardu u chvorich na gipertonichnu chvorobu v zalezhnosti vid variantu genotipu receptoriiv angiotenzinu II 1-go tipu ta nayavnosti sudinnich usklad-nen' // Galiz'kiy visnik. – 2006. - № 1 (13). – S. 20-24.
3. Drapkina, O. M. Primenenie biologicheskikh markerov v diagnostike diastolicheskoy serdechnoy nedostatochnosti // Zhurnal Serdechnaya nedostatochnost'. - №12 (6). S. 364–372.
4. Kovalenko V.M., Kamins'kiy O.G. Akademik M.D.Stra-zhesko i rozvitok vitchiznyanoi kardiologii ta re-vmatologii. - 2001: Kiiiv. MORION.
5. Kovalenko V.M., Kornaz'kiy V.M. Dinamika stanu zdorov'ya narodu Ukraïni ta regional'ni osoblivosti. 2009, Analitichno-statistichniy posibnik. Kiiiv. Medinform.
6. Kovalenko V.N., Talaeva T.V. Serdechno-sosudistye zabolevaniya i renin-angiotenzinovaya sistema.- 2013, Kiiiv. Morion.
7. Kornaz'kiy V.M., Dorogoy A.P., Manoylenko T.S. Serzevo-sudinna zachvoryuvanist' v Ukraïni ta rekomendazii schodo pokraschannya zdorov'ya v suchasnich umovach. – 2012, Kiiiv.
8. Lozins'kiy, S.E. Rol' polimorfizmu A1166S gena re-zeptoriiv do angiotenzinu-II pershogo tipu (ATR1) u vi-niknenni arterial'noi gipertenzii ta gipertrofii livogo shlunochka u meshkantziv Podillya // Obschaya medizina. – 2012. -№ 5. – S. 87-101.
9. Sakovich O. O. Uspadkuvannya polimorfnich genotipiv gena receptora angiotenzinu II 1-go tipu ta faktori ri-ziku rozvitku gipertonichnoi chvorobi u zhinok, yaki prozhi-vayut' u Vinniz'kiy oblasti // Zaporozhskiy medizins-kiy zhurnal. – 2011. - №4 (13). S. 44-47.
10. Starzhins'ka, O.L. Osoblivosti perebigu gipertonichnoi chvorobi u cholovikiv z riznimi genotipami receptora

- angiotenzinu II 1-go tipu // *Biomedical and Biosocial Anthropology* / - 2005. - №4. - S. 171-177.
11. Starzhins'ka O.L. (2013). Polimorfizm geniv renin-angiotenzin-al'dosteronovoї sistemi v kardiologii. // *Biomedical and biosocial anthropology*. - 2013. - № 20. - S. 204-207.
 12. Tokar', A.V., Ena L.M. Arterial'naya gipertenziya v pozhilom i starcheskom vozdaste. 1989, Kiev. Zdorov'e.
 13. Zeluyko, V.Y. Galektin-3 u chvorich na chronichnu serzevu nedostatnist' // *Ukrains'kiy kardiologichniy zhurnal*. - 2014. - № 3. -S. 77-81.
 14. Chistyakov D.A. Polimorfizm gena sosudistogo rezeptora angiotenzina II i sedечно-sosudistye zabolevaniya // *Terapevticheskiy archiv*. - 2000. - № 4. - S. 27-30
 15. De Boer R.A. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression // *Eur J Heart Fail*. -2009. - №11, 811-817.
 16. De Filippi, C.R. Galectin-3 in heart failure – linking fibrosis, remodeling, and progression. *US // Cardiology*. - 2010. - Vol.7. - P. 67-70.
 17. Edelmann, F. Galectin-3 in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results from the Aldo-DHF // *European Journal of Heart Failure*. - 2015. - Vol.17. - P. 214-223.
 18. Feng, X. A systematic review and meta-analysis of the association between angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism and myocardial infarction susceptibility // *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. - 2012. - Vol.23. - P. 1-9.
 19. Milting, H. (2008). Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices // *J Heart Lung Transplant*. - 2008. - Vol.27. - P. 589-596.
 20. Poirier, O. (1998). New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. *Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde // J. Hypertens*. -1998. - Vol.10. - P.- 1443-1447.
 21. Roig E.(2000). Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. // *Eur Heart J*. - 2000 - Vol.21(1). - P. 53-57.
 22. Suarez, G. Heart failure and galectin 3. // *Annals of Translational Medicine*. - 2014. -Vol. 2 (9). - P. 86-92.
 23. Takami, S. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. // *Am. J. Hypertension*. -1998. - Vol. 11. - P. 316-321.
 24. Tiret L.,Blanc H., Ruidavets J.B. et al. Gene polymorphisms of the rennin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: PEGASE study. *Project d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a Moderee Essentielle // J Hypertens*.-1998.- Vol.16. - P. 37-44.
 25. E.Wilson Grandin. Galectin-3 and the Development of Heart Failure after Acute Coronary Syndrome: Pilot Experience from PROVE IT-TIMI 22. // *Clinical Chemistry*. - 2012. - Vol. 58(1). - P. 267-273.
 26. Yancy C.W. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. // *J. Am. Coll. Cardiol*, 2013. - Vol.62(16). - P. 147-239.

© Мовчан О.В., Титкова А.В.

УДК 616–006.04:617–089

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ НЕСПРОМОЖНОСТІ ШВІВ АНАСТОМОЗІВ У ХВОРИХ НА ОНКОПАТОЛОГІЮ*

Мовчан О.В., Титкова А.В.

Харківська медична академія післядипломної освіти

Кафедра клінічної патофізіології, топографічної анатомії та оперативної хірургії Харків, Україна

Следует признать, что создание оптимальных условий для заживления кишечных швов является основным резервом улучшения результатов при хирургическом вмешательстве на органах желудочно-кишечного тракта. Актуальным вопросом патофизиологии, связанная с онкопатологией остается несостоятельность швов анастомозов и стом. Цель работы - определение патофизиологических механизмов и критериально-значимых показателей несостоятельности швов анастомозов. При изучении данного вопроса проведен анализ непосредственных результатов лечения 74 больных, составивших исследовательскую группу, которым оперативное лечение выполнялось в радикальном объеме. Пациентов были разделены в зависимости от наличия несостоятельности анастомозов на две группы: Ia группа - пациенты которых был прооперирован по поводу рака желудка и в которых было установлено несостоятельность анастомозов - 16 Ииа группа 58 пациента - каким было проведено оперативное вмешательство и в которых не было установлено несостоятельности. Больные каждой группы были распределены по четырем подгруппам в зависимости от наличия нестабильности микросателлитов в локусах BAT-25 BAT-26. Результаты Наличие у больных раком желудка Streptococcus Bovis, может быть ранним маркером развития заболевания. Ведущим метаболическим профилем микробиоценоза при развитии рака желудка, является значительное накопление биогенных аминов. Анализ результатов исследования показывает, что несостоятельность анастомозов у больных раком желудка сопровождается глубокими нарушениями обмена соединительной ткани и подтверждается повышением активности эластазы, колагенолитической активности сыворотки крови и содержания в ней гликозаминогликанов. Показатель активности эластазы и гликозаминогликанов может быть прогностическим критерием для несостоятельности швов при осуществлении лечебных мероприятий.

Ключевые слова: микросателлитная нестабильность, несостоятельность швов анастомоза, микробиоциноз.

Вступ

Актуальним питанням патофізіології, що пов'язана з онкопатологією залишається неспроможність швів анастомозів та стом. Данне ускладнення спостерігається в 2-3,5% випадків при оперативних втручаннях з приводу раку шлунка в 9% при операціях на тонкій і в 5-25% випадків при операціях на товстій кишці [1-4]. Імовірність неспроможності збільшується при формуванні анастомозів в умовах зміненої кишкової стінки, що спостерігається при онкопатології кишково-шлункового тракту. Слід визнати, що створення оптимальних умов для загоєння кишкових швів є основним резервом поліпшення результатів при хірургічному втручанні на органах шлунково-кишкового тракту [5, 6].

Цілісність хірургічних швів залежить від ряду причин як з боку самих органів, так і від позаорганичних змін. Можна виділити три основних групи причин, що впливають на порушення цілісності анастомозів та стом при онкопатології: стан і патоморфологічні процеси, що відбуваються в органах, що підлягають накладанню анастомозів; несприятливі фактори, при яких ці шви накладаються, або несприятливі фактори, що виникають в післяопераційному періоді; технічні особливості накладення швів.

Перша група причин, безумовно, є провідною з точки зору патофізіології, тому що життєздатність стінки органу в першу чергу впливає на спроможність швів кишки і анастомозів. До них відносяться: активне запалення тканин; внутрішнє і загальне порушення кровообігу; підвищення внутрикшечного тиску; гіпотонемія; локальне інфікування.

В експериментальних роботах [7], присвячених

вивченню загоєння анастомозів, була визначена важлива роль колагену при формуванні соусть. Так, в перші дні після хірургічного втручання відбувається масивний лізис колагену в зоні анастомозу, а процеси його синтезу пригнічені. Тому «колагенова рівновага» має вирішальне значення для збереження цілісності та герметичності кишкового шва. Інфікування ж зони шва призводить до істотного посилення процесу лізису колагену і неспроможності.

Ще одним важливим фактором, що знижує міцність шлункових і кишкових соусть, є інфікування самої зони тканин, що анастомозують [5, 8, 9]. Інфікування виникає в результаті контакту шовних каналів і шовного матеріалу (лігатурне інфікування) з просвітом органу і його вмістом, що обумовлює проникнення мікрофлори в товщу зшитих тканин з подальшим розвитком в них запальних і некротичних процесів. У зоні накладеного анастомозу на ранніх термінах, завжди є сприятливі умови для розвитку мікрофлори – наявність ішемії, живильне середовище у вигляді залишків крові, зміна рН, окисно-відновних потенціалів. Тому інфікування зони анастомозу є закономірним процесом і залежить від виду кишкового шва і концентрації мікробів, їх виду та взаємодії в просвіті органу.

Мета роботи – визначення патофізіологічних механізмів та критеріально-значимих показників неспроможності швів анастомозів.

Матеріали та методи дослідження

При вивченні даного питання проведено аналіз безпосередніх результатів лікування 74 хворих, що склали дослідну групу, яким оперативне лікування виконувалося в радикальному обсязі (R0-втручання).

* Цитування при атестації кадрів: Мовчан О.В., Багмут І.Ю., Титкова А.В. Патофізіологічні механізми неспроможності швів анастомозів у хворих на онкопатологію. // Проблеми екології та медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 43–47.

Розподіл хворих в залежності від стадії – Т2-3 N0 M0 – 17,5%, Т2-3 N1-2M0 – 73,2%, Т4 N1-2M0 – 9,3%. У більшості хворих (77%) була аденокарцинома. Плоскоклетинний рак зустрічався в 13,5% випадків. У всіх хворих діагноз раку був верифікований морфологічно до операції.

Пацієнтів було поділено в залежності від наявності неспроможності анастомозів на дві групи: Іа група –

пацієнти яких було прооперовано з приводу раку шлунка та у яких було встановлено неспроможність анастомозів – 16, Іа група 58 пацієнта – яким було проведено оперативне втручання та у яких не було встановлено неспроможності. Хворі кожної групи були розподілені за чотирма підгрупами залежно від наявності нестабільності мікросателітів в локусах ВАТ-25, ВАТ-26 (табл. 1.)

Таблиця 1
Розподіл хворих залежно від стабільності мікросателітів ВАТ-25, ВАТ-26 та стану швів анастомозу.

Група хворих Кількість хворих, n	Мікросателітна нестабільність, n / Клінічний ефект, n, (P±p, %)							
	ВАТ-25 - ВАТ-26 – n=35		ВАТ 25 – ВАТ 26 + n=10		ВАТ 25 + ВАТ 26 – n=20		ВАТ 25 + ВАТ 26 + n=5	
	$\chi^2=5,85^*$		$\chi^2=2,74$		$\chi^2=3,52$		$\chi^2=0,31$	
I-ша n=16	8 (62,86%)	3 (14,29%)	1 (10,00%)	2 (20,00%)	1 (5,00%)	0	1 (20,00%)	0
II-га n=58	8 (8,57%)	14 (14,29%)	17 (60,00%)	6 (10,00%)	0	12 (20,00%)	0	1 (5,80%)

Дослідження проводили на депарафінізованих зрізах товщиною 4-5 мкм, із попереднім демаскуванням антигенів у цитратному буфері (рН 6,0) в мікрохвильовій печі з потужністю 600 Вт протягом 10 хв. Для візуалізації продуктів реакції застосовували систему EnVision (Dako Cytomation, Данія).

Мікросателітну нестабільність оцінювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, використовуючи два квазімономорфних мононуклеотидних маркера ВАТ-25 та ВАТ-26.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартною схемою на програмуемому термоциклері «Терцик-2» виробництва «НПО ДНК-Технологія», Росія.

Використовували наступні праймери для мікросателітної послідовності Ват-26: 5'-TGA CTA CTT' TGG ACT TCA GCC-3';

5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3', та

5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3' і

5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3' для ВАТ-25:

Результат ПЛР оцінювали в 8% поліакриламідному гелі з наступним забарвленням в розчині бромистого етидія з концентрацією 1 мг/мл. В якості маркера молекулярної ваги застосовували ДНК плазміді рис19, що гідролізовані ферментом HpaII.

Критерії гіпотези:- статистично значимих розходжень в ефективності препарату й немає: статистично значимі розходження в ефективності препарату і присутні.

Перевірка гіпотез здійснюється порівнянням значення критерію, що розраховується за формулою, з критичним значенням, обумовленим за таблицею при заданому числі ступенів свободи й рівні значимості $p < 0,05$. Якщо при цьому, то гіпотеза про незалежність результатів лікування від терапії з надійністю 95% відхиляється. У протилежному випадку ця гіпотеза приймається.

В плазмі крові визначається вміст глікозаміногліканів, активність ферменту еластази і колагенолітична активність (КПА) плазми крові, які здатні дати корисну інформацію про стан структурно-метаболических і обмінних процесів в сполучній тканині. Оцінку КПА плазми крові здійснювали по сумарній кількості (при ферментативному гідролізі) вільного і пептидно-

зв'язаного оксипроліну в пробі, що діагностувалась. Для цього знаходили по калібрувальній кривій відповідне оптичний щільності значення кількості оксипроліну при довжині хвилі 570 нм. Величину КПА плазми крові виражали в мікромолях оксипроліну на 1л плазми крові за 1 годину (мкмоль/л·г) [12-15]. Сумарні глікозаміноглікани (кислі мукополісахариди) визначали в сироватці крові з використанням трихлороцтової кислоти і відомої карбазольної реакції, яка забезпечує фіолетово-рожеве забарвлення. Фотометрування досліджуваних зразків проб здійснювали при довжині хвилі 530нм. Вміст ГАГ в сироватці крові виражали через гексуранові кислоти в мікромолях/л. (мкмоль/л) [16].

Еластаза в сироватці крові досліджувалась імуноферментним методом за допомогою моноклональних антитіл і набору реактивів (Human PMN Elastase Elisa RD 191021100) по інструкції фірми «Biovendor», що додавалась, Німеччина.

Для з'ясування ступеня дисбіозу кишечника загальноприйнятним бактеріологічним методом визначали у фекаліях біфідобактерії, бактероїди, лактобацили, ешеріхії, протеї, синегнійну паличку, стафілококи, ентерококи, клостридії, дріжджові гриби, пептострептококи [11-12]. Метаболіти мікробіоценозу кишечника (оцтова, пропіонова, масляна, молочна, щавелево-оцтова, α -кетоглутарова кислота, фенілпропіонова кислота, п-крезол, скатол, індол) вивчали методом імуноферментного аналізу з використанням імуноферментних наборів виробництва компанії «Labor Diagnostika Nord» (Німеччина), забезпечує високу специфічність екстракції, що є необхідною умовою специфічності самого аналізу.

Статистичні гіпотези про наявність або відсутність значимих розходжень результатів лікування препаратом для різних варіантів біологічного статусу пацієнтів перевірялися з використанням чотирьохклетинного – критерію [11].

Результати та їх обговорення

На нашу думку важливим патофізіологічним фактором неспроможності анастомозів, що знижує міцність

шлункових і кишкових соустій, є інфікування самої зони тканин, що анастомозують. У зв'язку з цим, метою даного підрозділу роботи було вивчення мікробіологічного профілю кишечника у хворих на рак шлунка і його про-

гностичне значення в діагностиці, терапії і профілактиці онкологічної захворюваності населення.

Результати вивчення мікробіоценозу кишечника у хворих на рак шлунка, наведених у таблиці 2.

Таблиця 2
Стан мікробіоценозу кишечника у хворих на рак шлунка в залежності від стану анастомозу.

Види мікроорганізмів КУО на 1г фекалій (Lg)	Дослідна група (n= 74)		Група порівняння умовно-здорових (n=30)
	I-а група – неспроможність швів (n= 16)	II-га група (n= 58)	
Bifidobacterium	3,06±0,31 *	4,27±0,45 *	9,85±0,54
Bacteroides	1,80±0,25 *	3,25±0,50 *	10,22±0,64
Lactobacillus	2,58±0,18 *	4,08±0,20 *	6,95±0,50
Escherichia: лактозонегативні гемолітичні	12,00±0,65	10,04±0,65	9,25±0,61
	9,15±0,38 *	7,63±0,40 *	6,45±0,35
	3,72±0,24 *	2,83±0,27 *	1,15±0,12
Enterobacteriaceae	2,15±0,22 *	2,95±0,21 *	4,27±0,25
Pseudomonas aeruginosa	3,75±0,28 *	1,20±0,17 *	0
Enterococcus: гемолітичні	8,05±0,41 *	6,95±0,54 *	5,67±0,33
	2,80±0,33 *	1,65±0,28 *	0
Staphylococcus: коагулазопозитивні	8,25±0,94 *	6,55±0,53 *	2,54±0,31
	3,55±0,34 *	1,74±0,29 *	0
Streptococcus bovis	4,07±0,20 *	2,22±0,18 *	0
Peptostreptococcus	7,28±0,52 *	6,45±0,37 *	4,37±0,29
Clostridium	8,36±0,78 *	5,12±0,60 *	3,26±0,38
Candida albicans	3,66±0,23 *	2,05±0,21 *	0
Helicobacter pylori	1,97±0,23 *	1,25±0,23 *	0

Примітка: Lg – десятичний логарифм від КУО/г

Було встановлено достовірне ($p \leq 0,05$) зниження лакто- та біфідобактерій, бактероїдів і цитратсинтезуючих ентеробактерій (таблиця. 2), відповідно на 6,3%, 19,8%, 65,1% і 53,7%, що утворюють нормальну мікрофлору кишково-шлункового тракту у всіх пацієнтів хворих на рак шлунка.

Така динаміка процесу спотрігається на тлі підвищення загальної кількості escherichia coli на 29,3%, переважною більшість яких склали гемолітичні форми. З неферментуючих мікроорганізмів спостерігалось збільшення кокової флори – Staphylococcus на 185,2%, Peptostreptococcus на 41,4%, Enterococcus на 30,5%; Clostridium на 113,3% і Candida albicans на 273,6%.

У хворих на рак шлунка серед умовно-патогенних мікроорганізмів провідну роль відіграють гриби роду Candida albicans, гемолітичні Enterococcus, Pseudomonas aeruginosa, коагулазопозитивні Staphylococcus (табл.2).

При порівнянні показників мікробіоценозу у пацієнтів на рак шлунка, яким було проведено оперативне втручання, встановлено достовірну різницю між групами. Так у пацієнтів, I-ї групи встановлено достовірне зниження ($p \leq 0,05$) зниження лакто- та біфідобактерій, бактероїдів і цитратсинтезуючих ентеробактерій, та підвищення гемолітичні Enterococcus, Pseudomonas aeruginosa.

На особливу увагу заслуговує той факт, що у хворих на рак шлунка достовірно ($p \leq 0,05$) збільшено виявлення Helicobacter pylori на 92,6%. Також визначення у 82,5% пацієнтів на рак шлунка Streptococcus bovis, може бути ранньою ознакою розвитку канцерогенезу та неспроможності анастомозів. Отримані нами данні узгоджуються з дослідженнями, у тому числі клінічними, багатьох вчених, які були спрямовані на виявлення мікроорганізмів, залучених у розвиток раку кишково-шлункового тракту, у результаті чого, вдалося виділити ряд бактерій, потенційно причетних до розвитку захворювання: Streptococcus bovis, Helicobacter pylori та інших.

Визначення метаболічних показників мікробіоценозу у хворих на рак шлунка виявило достовірне ($p \leq 0,05$) зниження вмісту карбонових кислот: оцтової, пропіонової, масляної і молочної кислоти відповідно на 72,3%, 57,8%, 64,1% і 75,6%, що узгоджується із зниженням кількості анаеробної кишкової мікрофлори (лакто- та біфідобактерії, бактероїди). Встановлено достовірне ($p \leq 0,05$) зниження рівнів α -кетоглутарової і щавлево-оцтової кислоти на 49,8% і 60,6%, що підтверджує слабку біохімічну активність аеробних та анаеробних бактерій, особливо по відношенню перетравлення вуглеводів (табл. 3).

Таблиця 3
Показники метаболічної активності мікробіоценозу у хворих на рак шлунка

Метаболічні показники (мг/л)	Група спостереження, M±m		
	Дослідна група (n= 74)		Група умовно-здорових пацієнтів, (n=30)
	I-а група – неспроможність швів (n= 16)	II-га група (n= 58)	
Карбонові кислоти:			
- оцтова	345,62±15,38*	557,65±18,20*	1425,10±19,35
-пропіонова	69,65±5,35*	80,14±8,25*	200,85±15,71
-масляна	54,27±4,52*	60,33±3,54*	151,34±7,23
-молочна	86,33±7,14*	108,11±5,75*	390,45±11,82
Дікарбонові кислоти:			
-α-кетоглютарова	68,34±4,92*	80,14±4,23*	145,20±7,92
-щавелевооцтова	8,33±6,15	10,42±5,65	20,05±1,98
Ароматичні сполуки:			
- п-крезол	5,44±0,16*	3,13±0,12*	1,12±0,05
-індол	6,07±0,13*	4,27±0,15*	1,34±0,04
- скатол	6,53±0,14*	3,60±0,13*	1,29±0,03
-фенілпропіонова кислота	4,96±0,37*	2,85±0,29*	1,15±0,012
Аміни:			
-метиламін	2,53±0,22*	1,28±0,19*	0,32±0,014
- гістамін	2,66±0,18*	1,17±0,10*	0,28±0,018
-серотонін	8,24±0,57*	4,03±0,36*	1,62±0,15

Примітка: * різниця вірогідна $P < 0,05$

Профіль метаболітів кишкового вмісту, характеризувався збільшенням більш ніж у 3,2 рази загальної кількості індолу, скатолу, п-крезолу, і фенілпропіонової кислоти у пацієнтів I-ї групи. Загальна кількість ароматичних речовин підвищувалася на 278%, п-крезолу на 315%, індолу на 365% і фенілпропіонової кислоти на 254%. Таку динаміку процесу слід враховувати при виборі тактики оперативного втручання, особливо при формуванні тонко-тонкокишкового резервуару або анастомозу, тому що дані зміни можуть призвести до розвитку загальної інтоксикації та виникнення ускладнень, таких як неспроможність швів.

Програма досліджень передбачала вивчення стану сполучної тканини у хворих на рак шлунка для визначення патофізіологічних механізмів формування неспроможності анастомозів враховуючи, що вона відіграє вирішальне значення для збереження цілісності та герметичності кишкового шва.

Вивчення показників сполучної тканини, виявило достовірно вищу активність еластази у хворих I-ї групи на рак шлунка не залежно від мікросателітної нестабільності ($94,1 \pm 14,4$ пг/мл) рівні, що перевищують, умовно-здорової групи спостереження, відповідно у 4,0 рази. Однак при порівнянні рівнів еластази за гру-

пами встановлено, що у I-ї групі цей показник був збільшений в 2,8 рази в порівнянні з контрольною групою та мав достовірну різницю при порівнянні з пацієнтами другої групи в яких не спостерігались явища неспроможності анастомозів (табл.4).

Разом з тим, слід зазначити, що ГАГ великою мірою були підвищені в плазмі крові хворих I-ї групи хворих на рак шлунка ($72,9 \pm 4,0$ мкмоль/л), що у 2,2 рази перевищувало, відповідно значення групи умовно-здорових пацієнтів. У пацієнтів II-ї групи з онкозахворюванням шлунка, рівні ГАГ підвищувались не так значно, хоча і були достовірно різними в порівнянні з умовно-здоровою групою.

Колагенолітична активність плазми крові мала схожу динаміку і не залежала від рівнів кріоглобулінів та мікросателітної нестабільності. Вона мала прямий сильний корелятивний зв'язок з показниками активності еластази. Значення КЛА у пацієнтів з раком шлунка становив ($68,5 \pm 3,4$ мкмоль оксипроліну/л/г), рівні КЛА в плазмі крові перевищували дані умовно-здорових пацієнтів більш ніж у 5 разів, що забезпечує цьому показнику важливе діагностичне і прогностичне значення.

Таблиця 4
Динаміка біохімічних показників стану сполучної тканини у хворих на рак шлунка в залежності від стану швів анастомозів.

Група спостереження	Показники, M±m		
	Еластаза (пг/мл)	ГАГ (мкмоль/л)	КЛА(мкмоль оксипроліна/л·г)
I-а група – наявність неспроможність швів (n= 16)	94,1±14,4 *	72,9±4,0 *	68,5±3,4*
II-га група – з відсутністю ознак неспроможності швів (n= 58)	71,6±4,8*	42,9±2,2*	49,7±3,2*
Умовно-здорові (n=30)	27,3±1,8	35,84±1,2	чол. – 7,3±0,56* жін. – 7,6±0,43*

Примітка: * вірогідність достовірна $P < 0,05$

Висновки

Враховуючи вищезазначене, можна зробити висновок що у хворих на рак шлунка спостерігається дисбактеріоз кишечника, який характеризується пригніченням захисної і активацією умовно-патогенної мікрофлори на фоні порушення процесів травлення вуг-

леводів, жирів, білків і накопичення токсичних продуктів обміну, що є важливим патогенетичним фактором активації, індукції, проліферації і метаболізму пухлинної тканини. Наявність у хворих на рак шлунка *Streptococcus Bovis*, може бути раннім маркером розвитку захворювання. Провідним метаболічним профі-

лем мікробіоценозу при розвитку раку шлунка, є значне накопичення біогенних амінів, що в свою чергу може мати прогностичне значення для діагностики, та визначенню патогенетичної терапії у хворих раку шлунка. Результати дослідження мікробіоценозу кишечника у хворих на рак шлунка свідчать про порушення міжвидових співвідношень мікрофлори, що заселяють кишечник у нормі. Зниження рівня лакто- та біфідобактерій і бактероїдів, які у процесі життєдіяльності утворюють молочну, оцтову, мурашину, янтарну кислоти, може являтися однією з найважливіших причин зміни трофічної, захисної, метаболічної і імунологічної функції кишково-шлункового тракту, у зв'язку із зміною в кишечнику рН-середовища.

Аналіз результатів дослідження свідчить, що неспроможність анастомозів у хворих на рак шлунка супроводжується глибокими порушеннями обміну сполучної тканини і підтверджується підвищенням активності еластази, колагенолітичної активності сироватки крові і вмісту в ній глікозаміногліканів. Показник активності еластази та глікозаміногліканів може бути прогностичним критерієм для неспроможності швів при здійсненні лікувальних заходів. Високий кореляційний зв'язок між динамікою активності еластази і колагенолітичною активністю плазми крові при різних по наявності мікросателітної нестабільності ступеню вираженості кріоглобулінемії, дозволяють використовувати їх як моніторингові критерії ефективності патогенетичної терапії.

Література

1. Бердов Б.А. Комбинированное лечение рака желудка с предоперационным и интраоперационным облучением / Б.А. Бердов., В.Ю. Скоропад., К.В. Пахоменко [и др.] // *Практ. онкология.* – 2001.- № 33. – С. 35-44.
2. Давыдов М.И. Современная стратегия хирургического лечения рака желудка / М.И. Давыдов, М.Д. Тер-Ованесов // *Современ. Онкол.* – 2010. – № 3 1. – С. 4-10.
3. Духанина Е.А. Сравнительный анализ выделения метастатического маркера S100A4 иммунными и опухолевыми клетками / Е.А. Духанина, Т.И. Лукьянова, Е.А. Романова [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2008. – Т. 145, №1. – С. 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. Юрченко А.А. Клиническое значение некоторых тканевых маркеров метастазирования при раке желудка: Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.м.н. – М. – 2007.
6. Гаврилов В.Б., Лобко Н.Ф., Конев С.В. Определение тирозин- и триптофансодержащих пептидов в плазме крови по поглощению в УФ-области спектра // *Клин. лаб. диаг.* – 2004. – № 3. – С. 12-16.
7. Bressan A., Marini L., Michelotto M. Risk factors including the presence of inflammation at the resection margins for colorectal anastomotic stenosis following surgery for diverticular disease. // *Colorectal Dis.* 2018 Apr 28. doi: 10.1111/codi.14240. [Epub ahead of print].
8. Desantis M., Bernard J.L., Casanova V. Morbidity, mortality, and oncological outcomes of 401 consecutive cytoreductive procedures with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). // *Langenbecks Arch Surg.* – 2015. – T.400. P. 37–48.
9. Bartlett E.K., Meise C., Roses R.E. Morbidity and mortality of cytoreduction with intraperitoneal chemotherapy: outcomes from the ACS NSQIP database. // *Ann Surg Oncol.* – 2014. – T.21. – P.1494–500.
10. Levine E.A., Stewart J.H., Shen P., Russell G.B. Intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancy: experience with 1000 patients. // *J Am Coll Surg.* – 2014. – T.218. – P.573–585.
11. Collins, M.J., Li, X., Lv, W., Yang, C., Protack, C.D., Muto, A. et al. Therapeutic strategies to combat neointimal hyperplasia in vascular grafts. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012. - № 10. – P. 635–647.
12. Jain, M., Singh, A., Singh, V., and Barthwal, M.K. Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation after rat carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* -2015 - № 35. - P 1445–1455
13. Sato A., Kawamoto S., Watanabe M. A novel biodegradable external mesh stent improved long-term patency of vein grafts by inhibiting intimal-medial hyperplasia in an experimental canine model. // *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* – 2016. – Т. 64. – P. 1–9.
14. Whitbeck M.G. and Applegate, R.J. Second generation drug-eluting stents: a review of the everolimus-eluting stents: a review of the everolimus-eluting platform.// *Clin Med Insights Cardiol.* – 2013. – Т. 7. – P. 115–126.
15. Ghilagavathi, G. and Viju, S. Silk as a suture material. in: A. Basu (Ed.) *Advances in silk science and technology.* // Woodhead Cambridge. – 2015. – P. 220–232.
16. Seedial S.M., Ghosh S., Saunders R.S. Local drug delivery to prevent restenosis. // *J Vasc Surg.* – 2013. – Т. 57. – P. 1403–1414.

Матеріал надійшов до редакції 06.03.2018

ENGLISH VERSION: PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF DEHISCENCE OF ANASTOMOSE SUTURES IN PATIENTS WITH ONCOPATHOLOGY*

Movchan O.V., Titkova A.V.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Department of Clinical Pathophysiology, Topographic Anatomy and Surgical Surgery Kharkov, Ukraine

It should be recognized that the creation of optimal conditions for healing of intestinal sutures is the main reserve for improving the results of surgical intervention on the organs of the gastrointestinal tract. The urgent issues of pathophysiology associated with oncopathology remain the inability of seams of anastomosis and stomata. The purpose of the work is to determine the pathophysiological mechanisms and criterion-significant indicators of inability to sew anastomosis. In the study of this issue, an analysis of the immediate results of treatment of 74 patients, which was a test group, which operative treatment was performed in a radical volume. Patients were divided into two groups according to the anastomosis failure: Group Ia - patients who had been operated on for gastric cancer and who had anastomosis failure - 16 patients, II group 58 patients - who had been surgically inoperative and had not been diagnosed insolvency. The patients of each group were divided into four subgroups, depending on the presence of instability of microsatellites in the locuses of the VAT-25, VAT-26. The presence of Streptococcus Bovis stomach cancer patients may be an early marker of disease progression. The leading metabolic profile of microbiocenosis in the development of stomach cancer is the significant accumulation of biogenic amines. The analysis of the results of the study shows that the failure of anastomosis in patients with gastric cancer is accompanied by profound disorders of the metabolism of connective tissue and is confirmed by increased activity of elastase, collagenolytic activity of blood serum and its content of glycosaminoglycans. The activity of elastase and glycosaminoglycans may be a prognostic criterion for insufficiency of seams in the course of treatment.

Key words: microsatellite instability, inability of seams of anastomosis, microbiocenosis.

Introduction

The urgent issues of pathophysiology associated with oncopathology remain the dehiscence of sutures of anastomoses. This complication is observed in 2-3.5% of cases with surgical interventions for gastric cancer in 9% with operations on thin and in 5-25% of cases with operations on the colon [1-4]. The probability of failure increases with the formation of anastomoses in conditions of the altered intestinal wall, which is observed in oncopathology of the intestinal-gastrointestinal tract. It should be recognized that the creation of optimal conditions for healing of intestinal sutures is the main reserve for improving the results of surgical intervention on the organs of the gastrointestinal tract [5, 6].

The integrity of surgical sutures depends on a number of reasons, both from the organs themselves and from non-organic changes. It is possible to distinguish between three main groups of causes that affect the integrity of anastomosis and stomata in oncopathology: the state and pathomorphological processes that occur in the organs subject to anastomosis; the adverse factors upon which these sutures are superimposed or the adverse factors that arise in the postoperative period; technical features of suture joints.

The first group of causes is, of course, the leading in terms of pathophysiology, because the vitality of the organ's wall primarily affects the ability of seagrass and anastomoses. These include: active tissue inflammation; intravenous and general circulation disruption; increased intracranial pressure; hypoproteinemia; local infection.

In experimental studies [7], devoted to the study of healing of anastomosis, an important role of collagen in the formation of a community was determined. Thus, in the first days after surgical intervention there is a massive collagen lysis in the anastomosis zone, and the processes of its synthesis are suppressed. Therefore, "collagen equilibrium" is crucial for maintaining the integrity and tightness of the intestinal suture. Infection of the suture zone leads to a significant increase in collagen lysis and dehiscence.

Another important factor that reduces the strength of the gastric and intestinal soybeans is the infection of the tissue itself that is anastomosis [5, 8, 9]. Infection occurs as a result of the contact of the suture channels and suture material (ligature infection) with the lumen of the body and its contents, which causes the penetration of the microflora into the thickness of the sewn tissue with the subsequent development of inflammatory and necrotic processes in them.

In the area of anastomosis in the early stages, there are always favorable conditions for the development of the microflora – the presence of ischemia, nutrient medium in the form of blood balances, changes in pH, oxidation-reducing potentials. Therefore, the infection of the anastomosis zone is a natural process and depends on the type of intestinal sutures and concentration of microbes, their type and interaction in the organ's lumen.

The **purpose** of the work is to determine the pathophysiological mechanisms and criterion-significant indicators of anastomosis sutures dehiscence.

Materials and methods

In the study of this issue, an analysis of the immediate results of treatment of 74 patients, which was a test group, which operative treatment was performed in a radical volume. Distribution of patients depending on the stage – T2-3 N0 M0 – 17.5%, T2-3 N1-2M0 – 73.2%, T4 N1-2M0 – 9.3%. Most patients (77%) had adenocarcinoma. Squamous cell carcinoma has been found in 13.5% of cases. In all patients, the diagnosis of cancer was morphologically verified before surgery.

Patients were divided into two groups according to the anastomosis failure: Group Ia – patients who had been operated on for gastric cancer and who had anastomosis failure – 16 patients, II group 58 patients – who had been surgically inoperative and had not been diagnosed with dehiscence. The patients of each group were divided into four subgroups, depending on the presence of instability of microsatellites in the locuses of the VAT-25, VAT-26 (Table 1).

* To cite this English version: Movchan O.V., Bagmut I.Yu., Titkova A.V. Pathophysiological mechanisms of dehiscence OF anastomose SUTURES in patients with oncopathology // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 48–52.

Table 1
Distribution of patients depending on the stability of microsatellites VAT-25, VAT-26 and the state of anastomosis sutures.

Group patients n	Stability of microsatellites, n							
	VAT-25 – VAT-26 – n=35		VAT 25 – VAT 26 + n=10		VAT 25 + VAT 26 – n=20		VAT 25 + VAT 26 + n=5	
	$\chi^2=5.85^*$		$\chi^2=2.74$		$\chi^2=3.52$		$\chi^2=0.31$	
I-group n=16	8 (62.86%)	3 (14.29%)	1 (10.00%)	2 (20.00%)	1 (5.00%)	0 0	1 (20.00%)	0 0
II-group n=58	8 (8.57%)	14 (14.29%)	17 (60.00%)	6 (10.00%)	0 0	12 (20.00%)	0 0	1 (5.80%)

The studies were carried out on dewaxed sections with a thickness of 4-5 microns, with the previous anti-damask 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 quasimorphomic monocellular markers, VAT-25 and VAT-26.

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 Wat-26 microsatellite sequence were used: 5'-TGA CTA CTT 'TGG ACT TCA GCC-3';

5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3', and

5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3' and

5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3' for VAT-25:

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

Criteria for the hypothesis: – there are no statistically significant differences in the effectiveness of the drug and there are: statistically significant differences in the effectiveness of the drug and present.

Examination of hypotheses is carried out by comparing the value of the criterion calculated by the formula with the critical value determined by the table for a given number of degrees of freedom and equal significance $p < 0.05$. If at that, then the hypothesis about the independence of treatment outcome from therapy with a 95% reliability is rejected. Otherwise, this hypothesis is accepted.

The blood plasma determines the content of glycosaminoglycans, the activity of the enzyme elastase, and the collagenolytic activity (CLA) of the plasma, which can provide useful information on the state of structural and metabolic and metabolic processes in the connective tissue. Blood plasma CT scan was performed on the total amount (in enzymatic hydrolysis) of free and peptide-bound oxyproline in a diagnosed sample. To do this, they found, according to the calibration curve, the optical density of the value of the amount of oxyproline at a wavelength of 570 nm. The blood plasma levels were expressed in micromoles of oxyproline by 1 liter of blood plasma for 1 hour ($\mu\text{mol/l g}$) [12-15].

Total glycosaminoglycans (sugar mucopolysaccharides) were determined in blood serum using trichloroacetic acid and a known carbazole reaction, which provides violet-pink coloration. The photometric measurements of the samples under investigation were carried out at a wavelength of 530 nm. The content of GAG in serum was expressed through hexuronic acids in micromoles / liter. ($\mu\text{mol/L}$) [16].

Blood elastase was tested by immunoassay using monoclonal antibodies and a set of reagents (Human PMN Elastase Elisa RD 191021100) according to the instructions of the company Biovendor, added by Germany.

In order to find out the degree of intestinal dysbiosis, common bacteriological methods were determined in feces of bifidobacteria, bacteroids, lactobacilli, escherichia, proteins, sinus spider, staphylococci, enterococci, clostridia, yeast mushrooms, and peptostreptococci [11-12]. Metabolites of intestinal microbiocenosis (acetic, propionic, oily, lactic, oxalic-acetic, β -ketoglutaric acid, phenylpropionic acid, n-cresol, skatole, indole) were studied by gas-liquid chromatography on a chromatograph "Color 1000". Determination of metabolites in the extract of feces was studied by the method of immuno-enzymatic analysis using the immune enzyme kits of the company "Labor Diagnostika Nord" (Germany), provides a high specificity of extraction, which is a necessary condition for the specificity of the analysis itself.

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 [14].

Results and discussion

We believe that an important pathophysiological factor in the failure of anastomoses, reducing the strength of the gastric and intestinal anastomosis is infection of the tissue zones that anastomoses. In this regard, the purpose of this subsection study was to investigate microbiological profile intestine in patients with gastric cancer and its prognostic value in the diagnosis, treatment and prevention of cancer morbidity.

Results of the study of intestinal microbiocenosis in patients with gastric cancer, shown in Table 2.

The state of microbiocenosis in the intestine in patients with stomach cancer.

Types of microorganisms KUO for 1 g feces (Lg)	Patients group (n= 74)		Group health patients (n=30)
	I – group (n= 16)	II- group (n= 58)	
Bifidobacterium	3.06±0.31 *	4.27±0.45 *	9.85±0.54
Bacteroides	1.80±0.25 *	3.25±0.50 *	10.22±0.64
Lactobacillus	2.58±0.18 *	4.08±0.20 *	6.95±0.50
Escherichia:	12.00±0.65	10.04±0.65	9.25±0.61
Lacto-positive	9.15±0.38 *	7.63±0.40 *	6.45±0.35
hemolitical	3.72±0.24 *	2.83±0.27 *	1.15±0.12
Enterobacteriaceae	2.15±0.22 *	2.95±0.21 *	4.27±0.25
Pseudomonas aeruginosa	3.75±0.28 *	1.20±0.17 *	0
Enterococcus:	8.05±0.41 *	6.95±0.54 *	5.67±0.33
hemolitical	2.80±0.33 *	1.65±0.28 *	0
Staphylococcus:	8.25±0.94 *	6.55±0.53 *	2.54±0.31
Coagulo-positive	3.55±0.34 *	1.74±0.29 *	0
Streptococcus bovis	4.07±0.20 *	2.22±0.18 *	0
Peptostreptococcus	7.28±0.52 *	6.45±0.37 *	4.37±0.29
Clostridium	8.36±0.78 *	5.12±0.60 *	3.26±0.38
Candida albicans	3.66±0.23 *	2.05±0.21 *	0
Helicobacter pylori	1.97±0.23 *	1.25±0.23 *	0

Note: Lg is the decimal graph of the KUO / g

It was found that there was a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the reduction of lactobacter bifidobacteria, bacteroids and citrate synthesizing enterobacteria (Table 2), respectively, by 6.3%, 19.8%, 65.1% and 53.7%, which form normal micro-flora of the intestinal-gastrointestinal tract in all patients with cancer of the stomach.

This dynamics of the process is trodden against the background of an increase in the total number of escherichia coli by 29.3%, the overwhelming majority of which were hemolytic forms. Of non-fermenting microorganisms, an increase in coca flora was observed – Staphylococcus at 185.2%, Peptostreptococcus by 41.4%, Enterococcus by 30.5%; Clostridium by 113.3% and Candida albicans by 273.6%.

In patients with gastric cancer among the conditionally pathogenic microorganisms the leading role is played by fungi of the genus Candida albicans, hemolytic Enterococcus, Pseudomonas aeruginosa, coagulase-positive Staphylococcus (Table 2).

When comparing microbiocenosis in gastric cancer patients undergoing surgical intervention, a significant difference was found between the groups. Thus, in patients of Group II, a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the reduction of lactobacter bifidobacteria, bacteroids and citrate synthesizing enterobacteria, and an increase in hemolytic Enterococcus, Pseudomonas aeruginosa.

Particular attention should be paid to the fact that in patients with gastric cancer, the detection of Helicobacter pylori (92.6%) is significantly ($p \leq 0.05$). Also, the determination of 82.5% of Streptococcus bovis stomach cancer patients may be an early indication of carcinogenesis and anastomosis failure. The data we receive are consistent with studies, including clinical ones, by many scientists who have been aimed at the detection of microorganisms involved in the development of gastrointestinal cancer, which resulted in the identification of a number of bacteria potentially involved in the development of the disease: Streptococcus bovis, Helicobacter pylori and others.

Determination of metabolic indicators of microbiocenosis in patients with gastric cancer revealed a significant ($p \leq 0.05$) decrease in the content of carboxylic acids: acetic, propionic, oily and lactic acid, respectively, at 72.3%, 57.8%, 64.1% and 75, 6%, which is consistent with the decrease in the amount of anaerobic intestinal microflora (lactobacter bifidobacteria, bacteroids). A reliable ($p \leq 0.05$) decrease in the levels of β -ketoglutaric and oxalic acetic acid was found to be 49.8% and 60.6%, which confirms the weak biochemical activity of aerobic and anaerobic bacteria, especially in relation to digestion of carbohydrates (Table 3).

Table 3
Indicators of metabolic activity of microbiocenosis in patients with stomach cancer

Indicators of metabolic activity (mg/L)	Group patients, M±m		
	Research group (n= 74)		Group health patients (n=30)
	I- group (n= 16)	II-group (n= 58)	
Carbonil acid:			
- acetic	345.62±15.38*	557.65±18.20*	1425.10±19.35
-propionic	69.65±5.35*	80.14±8.25*	200.85±15.71
-olio	54.27±4.52*	60.33±3.54*	151.34±7.23
-dairy	86.33±7.14*	108.11±5.75*	390.45±11.82
Carboxylic acids:			
-e-ketoglutarate	68.34±4.92*	80.14±4.23*	145.20±7.92
-shaft-acetic	8.33±6.15	10.42±5.65	20.05±1.98
Aromatis:			
- n-crezol	5.44±0.16*	3.13±0.12*	1.12±0.05
-indol	6.07±0.13*	4.27±0.15*	1.34±0.04
- scatol	6.53±0.14*	3.60±0.13*	1.29±0.03
-phenylpropionic acid	4.96±0.37*	2.85±0.29*	1.15±0.012
Amins:			
-metilamin	2.53±0.22*	1.28±0.19*	0.32±0.014
- histamine	2.66±0.18*	1.17±0.10*	0.28±0.018
-serotonin	8.24±0.57*	4.03±0.36*	1.62±0.15

Note: * the difference is likely to be $P < 0.05$

The profile of intestinal metabolites was characterized by an increase of more than 3.2 times in the total amount of indole, skatole, n-cresol, and phenylpropionic acid in patients of the 1st group. The total amount of aromatics increased by 278%, n-cresol by 315%, indole by 365%, and phenylpropionic acid by 254%. This process dynamics should be taken into account when choosing a surgical intervention tactic, especially in the formation of a thin-intestinal reservoir or anastomosis, as these changes may lead to the development of general intoxication and the occurrence of complications such as dehiscence of sutures.

The research program included studying the state of connective tissue in patients with gastric cancer in order to determine the pathophysiological mechanisms for the formation of the anastomosis failure, given that it plays a crucial role in maintaining the integrity and tightness of the intestinal sutures.

The study of the parameters of connective tissue showed a significantly higher activity of elastase in patients of the 1st group on stomach cancer, regardless of microsatellite instability (94.1±14.4 pg/ml), exceeding the conditionally healthy observation group, respectively, in 4

times. However, when comparing the levels of elastase in the groups, it was found that in the 1st group this figure was increased by 2.8 times as compared with the control group and had a significant difference when compared with patients in the second group, in which there were no phenomena of anastomosis failure (Table 4).

At the same time, it should be noted that GAG was greatly increased in blood plasma in the I group of patients with stomach cancer (72.9±4.0 micromol/L), which was by 2.2 times higher, respectively, the value of the group conditionally-healthy patients. In patients of the 2nd group with gastric cancer, GAG levels did not increase significantly, although they were significantly different as compared to the conditionally healthy group.

The collagenolytic activity of the blood plasma had a similar dynamics and did not depend on the levels of cryoglobulins and microsatellite instability. It had a direct strong correlation with the indicators of elastase activity. The value of CLA in patients with gastric cancer was 68.5±3.4 μmoles oxyproline //g, blood glucose levels in excess of conditionally healthy patients by more than 5 times, which provided an important diagnostic and prognostic value for this indicator.

Table 4
Dynamics of biochemical parameters of the state of connective tissue in patients with gastric cancer, depending on the condition of anastomosis sutures.

Research group	Indicators, M±m		
	Elastase (pg / ml)	GAG (micromol/L)	CLA(μmoles oxyproline //g)
I group – the presence of dehiscence of sutures (n= 16)	94.1±14.4 *	72.9±4.0 *	68.5±3.4*
II-g group – with the absence of signs of dehiscence of sutures (n= 58)	71.6±4.8*	42.9±2.2*	49.7±3.2*
Group of healthy patients (n=30)	27.3±1.8	35.84±1.2	men. – 7.3±0.56* fem. – 7.6±0.43*

Note: * probability is reliable $P < 0.05$

Conclusions

Taking into account the aforementioned, it can be concluded that gastric cancer patients have intestinal dysbiosis characterized by inhibition of protective and ac-

tivation of opportunistic microflora against the background of digestion disorders of carbohydrates, fats, proteins and accumulation of toxic exchange products, which are an important pathogenetic factor of activation, induction, proliferation and metaplasia of the tumor tis-

sue. The presence of *Streptococcus bovis* stomach cancer patients may be an early marker of disease progression.

The leading metabolic profile of microbiocenosis in the development of stomach cancer is the significant accumulation of biogenic amines, which in turn may have a prognostic value for diagnosis, and the determination of pathogenetic therapy in patients with gastric cancer. The results of the study of intestinal microbiocenosis in patients with gastric cancer testify to the violation of interspecific ratios of the microflora that populate the intestine in normal conditions. Reducing the level of lactobifid bacteria and bacteroids, which in the process of life form a milk, acetic, anthraquinone, succinic acid, may be one of the most important causes of changes in the trophic, protective, metabolic and immunological function of the gastrointestinal tract, due to the change in intestine of pH medium.

The analysis of the results of the study shows that the failure of anastomosis in patients with gastric cancer is accompanied by profound disorders of the metabolism of connective tissue and is confirmed by increased activity of elastase, collagenolytic activity of blood serum and its content of glycosaminoglycans. The activity of elastase and glycosaminoglycans may be a prognostic criterion for dehiscence of sutures in the course of treatment.

Reference

1. Berdov B.A. Combined treatment of stomach cancer with preoperative and intraoperative irradiation. Berdov., V.Yu. Skoropad., K.V. Pakhomenko [et al.] // *Prakt. oncology.* – 2001. – No. 33. – P. 35–44.
2. Davydov M.I. Modern strategy of surgical treatment of stomach cancer / M.I. Davydov, M.D. Ter-Ovanesov // *Modern. Oncol.* – 2010. – 3 1. – P. 4–10.
3. Dukhanina E.A. Comparative analysis of the isolation of the metastatic marker S100A4 by immune and tumor cells / E.A. Dukhanin, T.I. Lukyanova, E.A. Romanova [and others] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2008. – T.145, No. 1. – P.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. Clinical significance of some tissue markers of metastasis in stomach cancer: the dissertation Author's abstract on scientific degree competition kmn – M. – 2007.
6. Gavrillov V.B., Lobko N.F., Konev S.V. Determination of tyrosine and tryptophan-containing peptides in blood plasma by absorption in the UV region of the spectrum, *Klin. lab. diag.* – 2004. – No. 3. – P. 12-16.
7. Bressan A., Marini L., Michelotto M. Risk factors including the presence of inflammation at the resection margins for colorectal anastomotic stenosis following surgery for diverticular disease. // *Colorectal Dis.* 2018 Apr 28. doi: 10.1111/codi.14240. [Epub ahead of print].
8. Desantis M., Bernard J.L., Casanova V. Morbidity, mortality, and oncological outcomes of 401 consecutive cytoreductive procedures with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). // *Langenbecks Arch Surg.* – 2015. – T.400. – P. 37–48.
9. Bartlett E.K., Meise C., Roses R.E. Morbidity and mortality of cytoreduction with intraperitoneal chemotherapy: outcomes from the ACS NSQIP database. // *Ann Surg Oncol.* – 2014. – T.21. – P.1494–500.
10. Levine E.A., Stewart J.H., Shen P., Russell G.B. Intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancy: experience with 1000 patients. // *J Am Coll Surg.* – 2014. – T.218. – P.573–585.
11. Collins, M.J., Li, X., Lv, W., Yang, C., Protack, C.D., Muto, A. et al. Therapeutic strategies to combat neointimal hyperplasia in vascular grafts. // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* – 2012. - №10. – P. 635–647.
12. Jain, M., Singh, A., Singh, V., and Barthwal, M.K. Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation after rat carotid injury // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2015. -№ 35. – P. 1445–1455
13. Sato A., Kawamoto S., Watanabe M. A novel biodegradable external mesh stent improved long-term patency of vein grafts by inhibiting intimal-medial hyperplasia in an experimental canine model. // *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* – 2016. – T. 64. – P. 1–9.
14. Whitbeck M.G. and Applegate, R.J. Second generation drug-eluting stents: a review of the everolimus-eluting stents: a review of the everolimus-eluting platform.// *Clin Med Insights Cardiol.* – 2013. – T. 7. – P. 115–126.
15. Ghilagavathi, G. and Vijju, S. Silk as a suture material. in: A. Basu (Ed.) *Advances in silk science and technology.* // Woodhead Cambridge. – 2015. – P. 220–232.
16. Seedial S.M., Ghosh S., Saunders R.S. Local drug delivery to prevent restenosis. // *J Vasc Surg.* – 2013. – T. 57. – P. 1403–1414.

© Bagmut I.Yu., Galmiz O.O., Gramatiuk S.M.

UDK 6166441–006–008.6

THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN PATIENTS WITH THYROID CANCER*

Bagmut I.Yu., Galmiz O.O., Gramatiuk S.M.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Ukraine

In the present paper, the content of the average molecular peptides, lipid peroxidation products, oxidative modifications of proteins in the serum of patients with thyroid cancer has been studied and their prognostic value has been substantiated in optimizing of pathogenic therapy. The study involved 94 patients who were divided into 3 groups depending on the cell structure of the tumor. The results of the study revealed the increase in serum levels of malonic dialdehyde, dienes, 2,4-dinitrophenylaldo-hydrazones and 2,4-dinitrophenylketohydrugs, low molecular weight molecules and leukocyte intoxication index. It is established that the leading pathogenic mechanism of formation and decompensation of endotoxemia in thyroid cancer patients is the accumulation of the ratio of plasma and erythrocyte fraction of substances of low and average molecular weight of plasma and red blood cells, especially their large-molecular, catabolic fraction, with violation of renal excretion of endotoxins.

Key words: average molecular peptides, lipid peroxidation products, oxidative modification of proteins, intoxication.

В роботі вивчено вміст в сироватці крові хворих на рак щитоподібної залози середньомолекулярних пептидів, продуктів перекисного окислення ліпідів, окислювальна модифікації білків і обґрунтовано їх прогностичне значення при оптимізації патогенетичної терапії. В дослідженні приймали участь 94 пацієнти, які були поділені на 3 групи в залежності від клітинної будови пухлини. Результати дослідження виявили збільшення в сироватці крові вмісту малонового діальдегіду, дієнів, 2,4-динітрофенілальдо-гідразонів і 2,4-динітрофенілкетогідразнів, молекул середньої маси і лейкоцитарного індексу інтоксикації. Встановлено, що провідним патогенетичним механізмом формування і декомпенсації ендотоксикозу у хворих на рак щитоподібної залози, є накопичення відношення плазмової і еритроцитарної фракції речовин низької та середньої молекулярної маси плазми і еритроцитів, особливо їх велико-молекулярної, катаболічної фракції, з порушенням ниркової екскреції ендотоксинів.

Ключові слова: середньомолекулярні пептиди, продукти перекисного окислення ліпідів, окислювальна модифікація білків, інтоксикація.

Thyroid cancer is about 1.5% of all malignant diseases. According to WHO, the incidence of thyroid cancer in the last 20 years has doubled, mainly due to young and middle-aged people. During the last decade after the accident at the Chernobyl Nuclear Power Plant, a significant increase in the number of patients with thyroid cancer in Ukraine has been noted. With these patients there are doctors of different specialties – general surgeons, endocrinologists, surgeons, oncologists, radiologists [1-3].

Types of thyroid cancer are a special group of malignant neoplasms that develop from the follicular and parafollicular cells of this organ. Each type of thyroid cancer requires a doctor of great knowledge in the field of endocrinology, medical radiology and pathologistology. Functional activity of the thyroid gland is structurally divided between independent cell groups. These are follicular or A-cells that produce thyroxine – a hormone, mainly acting as a regulator of the process of oxidation in cells; B-cells that accumulate biogenic monoamine – serotonin; parafollicular, or C-cells that synthesize calcitonin. C-cells of the thyroid gland, which are neuroectodermal in nature, along with cells of carotid cells, adrenaline and noradrenaline derivatives of the adrenal glands, cells of the anterior lobe of the pituitary gland and other cells that produce polypeptide hormones and are capable of active accumulation of precursors of monoamines and their decarboxylation, refer to the APUD-system (Amineprecursorand decarboxylation) [4-7].

The consequence of such a functional variety of thyroid cancer is the difference in the degree and clinical

manifestation of endogenous intoxication. Also, in our opinion, the pathophysiological mechanisms of development of endogenous intoxication in these patients are different.

The toxic substances entering the body and endotoxins that are formed and accumulated, with many diseases and pathological conditions, sharply put the need to clean the "endoecological space" of the organism from the exo – and endotoxins [1-3, 5]. An important role in which the new direction in medicine plays is the ecology of the internal environment of the organism, the leading importance of which is the substantiation of the system of measures on endoecological rehabilitation of patients. Studies show that the formation of endogenous intoxication is associated with an increase in the concentration of medium weight molecules (MWM) and correlates with the stage of the disease, which can serve as an indicator of toxification of the organism. Molecules of medium mass can affect the vital functions of all systems and organs of an organism. They are structurally similar to regulatory peptides that can combine and block cell receptors, thereby changing the metabolism and their functions [4, 6-8].

Taking into account the foregoing, we have studied the content of the mediumsized peptides in the serum of thyroid cancer (TC) patients, the products of lipid peroxidation, the oxidative modifications of proteins, and their prognostic value has been substantiated in optimizing pathogenic therapy. In this connection, the study program envisaged the study leukocyte indexes of

* To cite this English version: Bagmut I.Yu., Galmiz O.O., Gramatiuk S.M., Titkova A.V. The pathophysiological mechanisms of endogenous intoxication in patients with thyroid cancer.// Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 53–56.

intoxication, in serum, lipid peroxidation products – diene conjugates and malonic dialdehyde; oxidative modification of proteins – 2,4-dinitrophenylaldo-hydrazones (2,4-DNPAH) and 2,4-dinitrophenylketohydruks (2,4-DNPKH), medium molecules.

The aim of the research was to study pathogenetic mechanisms of development of endogenous intoxication in patients with thyroid cancer.

This work is a fragment of «Cellular-molecular mechanisms of inflammation associated with chronic diseases», the state registration number 015U001186, "Pathochemical mechanisms of action of radioiodine on the organism and principles of their early diagnosis and correction", state registration number 0117U000589 KhMAPO.

Materials and methods

The study was attended by 94 patients who were diagnosed with thyroid cancer. We used the classification of the tumor cell structure used to assess the aggressiveness and rate of growth [8, 9].

According to this classification the patients were divided into 3 groups: the first group included 41 patients with papillary adenocarcinoma; II group – 32 patients with follicular adenocarcinoma; the III group consisted of 21 patients, diagnosed with low-differentiated thyroid cancer. The control group consisted of 27 patients without pathology of thyroid gland and without a history of oncological disease. The thyroid gland cancer diagnosis was verified according to histological analysis.

In order to evaluate the state of endogenous intoxication, the content of medium weight molecules (MWM) in blood plasma was determined by the screening method for Gabrielyan N. N. [14] at two wavelengths-254nm (registration of a catabolic pool) and 282nm (registration of anabolic pool). Malonion dialdehyde (MDA) and diene conjugates were determined by the generally accepted method Andreeva L.I. [15].

The calculation of the index of endogenous intoxication syndrome (ISEI) equal to the ratio of plasma and erythrocyte fraction of substances of low and average molecular weight (RLAMW) to urine RLAMW, calculated by the formula [16]:

$ISEI = RLAMW_{pl.} \times RLAMW_{er.} / RLAMW_{urine}$, (standart – 5.32±0.48).

The level of substances of low and average molecular weight in plasma, urine and erythrocytes was determined according to the method Obolensky S.V. et al. [17]. The principle of the method is based on the determination of the absorption spectrum of the protein-free supernatant in the ultraviolet region (238-302 nm). Normally, the content of RLAMW in plasma is 6.82-10.4. c.u., in urine and in erythrocytes – 30 c.u. that is, the catabolic pool of

RLAMW plasma and urine was calculated by the formula [18]:

$(E238 + e242 + \dots + E258) \times 4$, in the norm no more than 4-5 c.u. (10-15% of RLAMWpl.)

To evaluate the intensity of spontaneous oxidative modification of blood serum proteins, a method modified by Dubinina et al. [7], based on the reaction of the interaction of carbonyl derivatives of proteins and shiffes with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form 2,4-dinitrophenylhydrazones. For the analysis, blood serum of patients with thyroid gland cancer was taken, in the amount of 0.05 ml. Deposition of serum proteins was carried out with a 20% solution of TCO. To denatured protein, an equal volume (1 ml) of a 0.1M solution of 2,4-DNFH, made on a 2M solution of HCl, was added. The test sample instead of 2,4-DNFH contained an equal volume of 2M HCl solution. The incubation of the samples was carried out for 1 hour at room temperature.

For deposition of proteins, the samples were centrifuged at 3000 x g for 15-20 min. The precipitate was washed 3 times with a mixture of ethanol-ethyl acetate (1: 1) to extract lipids that did not react with the carbonyl groups of the oxidized proteins 2,4-DNFH. The resulting precipitate was dried. The dried precipitate was dissolved in 2.5 ml of a 8 M solution of urea in a boiling water bath for 5 minutes until complete dissolution. The formed 2,4-dinitrophenyl hydrazone was recorded on a spectrophotometer SF-26 at the following wavelengths: 356, 370, and 430 nm. The number of 2,4-dinitrophenylhydrazones was calculated using a molar extinction coefficient equal to $21 \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [12].

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

Results and discussion

Taking into account mentioned above, we studied the content of thyroid gland cancer patients in the blood serum, mediomolecular peptides, lipid peroxidation products, oxidation modifications of proteins, and their prognostic value in the formation of endogenous intoxication. In this regard, the study program included the study of leukocyte index of intoxication, serum, products of lipid peroxidation – diene conjugates and malonic dialdehyde; oxidative modification of proteins – 2,4-dinitrophenylaldo-hydrazones (2,4-DNPAH) and 2,4-dinitrophenylketohydruks (2,4-DNPKH), medium molecules.

The results of the study revealed the increase in the blood serum of patients with TC in the MDA, dienes, 2,4-DNPAH, 2,4-DNPKH, MWM and leukocyte index of intoxication with different histological characteristics of the thyroid gland cancer type (Table 1).

Table 1
Indicators of endogenous intoxication in patients with thyroid cancer

Indexes	Observation group, M±m			
	papillary adenocarcinoma (n=41)	follicular adenocarcinoma (n=32)	low-differentiation cancer (n=21)	Control group (n=27)
MDA (мкмоль/л)	3.8±1.5*	3.7±1.4*	4.4±1.3*	2.1±0.18
Diens (мм/л)	27.2±4.4*	19.8±4.3*	22.6±4.5*	9.2±0.67
2,4-DNPAH (single wholesale density/1g protein, λ-370nm)	58.4±5.7*	56.7±4.9*	60.3±4.2*	27.3±1.87
2,4-DNPKH (single wholesale density/1g protein, λ-380nm)	65.3±8.7*	66.8±7.5*	64.2±6.6*	23.8±2.19
MWM (c.u.)	0.58±0.19*	0.53±0.25*	0.66±0.22*	0.22±0.03

Note: * probability is reliable P<0.05

Depending on the functional state, malonic dialdehyde in the highest degree increased in patients of the I-group by 76.4%. The dietary conjugates were significantly ($p < 0.05$) higher in patients with thyroid cancer when compared with control group 83.5%. Products of oxidative modification of proteins 2,4-DNPAH and 2,4-DNPKH, in all cases increased by more than 90%. Particularly high levels were observed in 2,4-DNPKH in patients of the 2nd group. Their concentration in serum exceeded the value of the comparison group, respectively, by 98.0%. The leukocyte index of

intoxication in all groups increased by more than 2.5 times.

Indicators of leukocyte index of intoxication (LII), nuclear index of intoxication (NII). The presence of intoxication associated with infectious or autoimmune process, was evaluated by the index of ratio of leukocytes and ESR (ILESRS), and the relationship between the humoral and cellular parts of the immune system – by the value of the leukocyte index (LI). As a marker of reactivity of the body during inflammation, the blood leukocyte shift index (IBLS) was used (Figure 1).

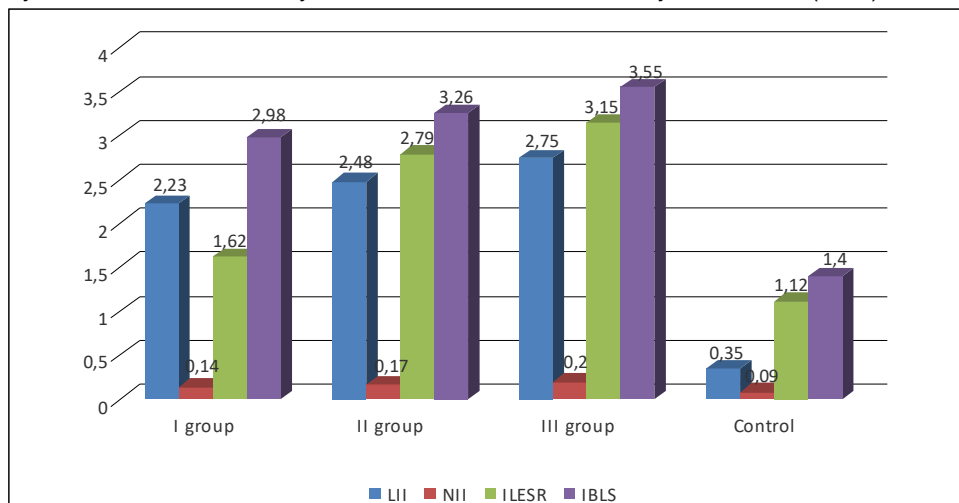


Fig. 1. The value of estimated indicators of intoxication in patients with thyroid cancer

Molecules of moderate mass increased in patients with papillary adenocarcinoma, follicular adenocarcinoma and low-differentiated cancer, respectively, by 58.3%, 80% and 94.1%. However, it should be noted that the average values of the studied parameters in all cases, had a large error, indicating a significant toxification of the body in conditions of thyroid cancer. The next stage of the study was an assessment of the influence of

carcinogenesis on the course of endogenous intoxication. It was established that the leading pathogenetic mechanism of formation and decompensation of endotoxemia in cancer patients is accumulation of RLAMW of plasma and erythrocytes, especially of their large molecular, catabolic fraction, with violation of renal excretion of endotoxins (Table 2).

Table 2
Indicators of endotoxemia in patients with thyroid cancer

Indexes	Patients with thyroid cancer			
	papillary adenocarcinoma (n=41)	follicular adenocarcinoma (n=32)	low-differentiation cancer (n=21)	Control group (n=27)
RLAMW venous plasma, c.u.	28.02±0.15*	31.03±0.24 *	34.49±0.25*	26.55±0.21
RLAMW 238–258 nm venous plasma, c.u.	18.16±0.5*	19.8±4.3*	20.19±0.36*	17.86±0.42
RLAMW venous er., c.u.	31.47±0.21*	33.48±0.2*	42.26±1.2*	31.24±0.25
RLAMW urine, c.u.	80.17±1.19*	58.71±1.2*	64.2±6.6*	36.84±1.46

Note: * probability is reliable $P < 0.05$

The most pronounced changes in endogenous intoxication were found in patients with follicular adenocarcinoma of RLAMW venous plasma, in the group of patients with papillary adenocarcinoma, the most informative indicators of RLAMW venous erythrocytes and RLAMW steel 238-258 nm in plasma. Significant differences in urine RLAMW were observed in patients with low-differentiated cancer, which has an important prognostic value.

Conclusions

Thus, the results of the study indicate that at TC, there is an auto-intoxication of the body, the severity of which is closely related to the functional state. The

leading pathogenetic chains of mechanisms for the formation of metabolic syndrome in patients with thyroid cancer can be activation of free radical processes, lipid peroxidation, oxidation modification of proteins, nucleic acids, and others. macromolecules, damage to the structural and functional state of cell membranes and intracellular organelles, inhibition of bioenergetics against the background of separation of breathing and oxidative phosphorylation. In patients with stage III of the TC there is a tendency to increase the calculated indicators of intoxication, but it can be assumed that in these patients, endogenous intoxication is in a subcompensated state.

The index of ISEI can be a prognostically significant indicator in the diagnosis of metabolic syndrome,

determining the severity of the disease, the effectiveness of pathogenetic therapy, as well as the choice of direction and volume of surgical intervention.

References

1. Ahn D. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer / Ahn D., Heo S.J., Park J.H. // J. ActaOncol. – 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. ClinEndocrinolMetabol. – 2012. – Vol.97. – P. 934–943.
4. Worden F. Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer // TherAdv 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. Malev A.L. "The role of oxidative modification of proteins in the diagnosis of endogenous and exogenous mental disorders." Dis. cand. med. sciences. Kharkov – 2009.
7. Oxidative modification of human serum proteins, the method of its determination / E.E. Dubinina, S.O. Burmistrova, D.A. Khodov, I.G. Porotov // Vopr. medical chemistry. – 1995. – T. 41, №. 4. – P. 24–26.
8. Dubinina E.E. Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). // Physiological and clinical-biochemical aspects. – 2006. – St. Petersburg: Publishing house "Medical Press". – P. 276–282.
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.10-15.
12. Slow L.M., Jones R., Randolph G. and others. (2003) History of thyroid and parotid gland surgery. Clin endocrinol. and Endocrine Surgery, 3 (4): 62-69.
13. Thyroid surgery (2008) / Ed.: S.Y. Rybakova, VO Shidlovsky, IV Komisarenko, MP Pavlovsky Ukrmedkniga, Ternopil. – 423 pp.
14. Gabrielyan N.I., Lipatova V.I. Opyt ispol'zovaniya pokazatelya srednich molekul v krovi dlya diagnostiki nefrologicheskikh zabolevaniy u detey // Lab. delo. - 1984. - № 3. - S. 138-140.
15. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kishkun A.A. Modification of the method for determining lipid peroxides in the test with thiobarbituric acid // Laboratornoe delo. – 1988. - №11. – P. 41–43.
16. Grigor'ev E. V. Diagnosticheskaya i pro-gnosticheskaya znachimost' biochimicheskikh markerov ostrogo povrezhdeniya legkich / E. V.Grigor'ev, Yu. A.Churlyayev, D. L. Shu-kevich, L. E. Shukevich, A. S. Razumov // Obschaya reanimatologiya. – 2006. - T.2 , № 4. – S. 48 – 53
17. Belyakov N. A.. Aktivaziya komponentov kallikrein kininovoy sistemy krovi v kriticheskikh sostoyaniyach i ich sorbziya na aktivirovannykh gulyach / N. A. Belyakov, C. B. Obolenskiy, L. K. Shershneva i [dr.] // Vestnik Chirurgii. – 2001. - № 9. - C. 120 - 122.
18. Zitogeneticheskie metody. Kuznezova T.V. pod redakziyey Karpischenko A.I. //Medizinskie laboratornye tehnologii. - SPb:Intermedika. - 2002. - T.2. – C. 123-148.

Матеріал надійшов до редакції 20.02.2018

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

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

UDK 616-018+576.3

THE STRUCTURAL AND METABOLIC DISORDERS OF CELLS' MEMBRANES IN EXPERIMENT*

Kolisnyk I.L., Titkova A.V., Rezenenko Yu.K.,* Boiagina O.D.*

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education (Ukraine)

*Kharkiv National Medical University (Ukraine)

The effect of small subtoxic doses of sodium fluoride on the activity of hepatocytes' microsoms on 30 Wistar rats' populations was studied in subacute experiments. The results indicate the disorder of mitochondrial respiratory activity of rats' hepatocytes during prolonged fluoride intoxication. Identified changes can be explained by the initiation of sodium fluoride free radical reactions and lipid peroxidation, whose products are the factors damaging membranes, including mitochondrial, where localized respiratory chain. Increased activity of the mitochondrial NADH-coenzymeQ-oxidoreductase action in the case of sodium fluoride at a dose 1/100 LD₅₀ can probably be seen as a defensive response

Key words: the mitochondria's respiratory activity, rats.

На 30 щурах популяції Вістар досліджено в підгострому досліді дію малих субтоксичних доз фториду натрію на активність мікросом гепатоцитів. Одержані результати свідчать про порушення дихальної активності мітохондрій гепатоцитів щурів при тривалій фторидній інтоксикації. Виявлені зміни можна пояснити ініціюванням фторидом натрію вільнорадикальних реакцій та ПОЛ, продукти яких є факторами пошкодження мембран, у тому числі й мітохондріальних, де локалізований дихальний ланцюг. Підвищення активності мітохондріальної НАДН-коензимQ-оксидоредуктази у випадку дії фториду натрію у дозі 1/100 LD₅₀ ймовірно, можна розглядати як захисну реакцію.

Ключові слова: дихальна активність мітохондрій, щури.

The study was conducted at the Department of Clinical Pathophysiology, Topographical Anatomy and Operative Surgery at Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education according to the issue "Radiotoxins' pathochemical mechanisms on the body and methods of early diagnostics and correction" 0117U000589.

Introduction

Fluoride is involved in many biochemical processes as enzyme activator and inhibitor. It belongs to the elements of the first class of danger – especially hazardous chemicals. Long-term excessive intake of fluoride compounds in the composition of the body can cause pathological state – fluorosis. In addition, high concentrations of fluoride stimulate lipid peroxidation and inhibit antioxidant defense system. The process of free radical oxidation is an important component of nonspecific metabolic component of adaptation to the effects of stress factors, including chemical origin. Evidence of this position is confirmed by the nature radicals generative systems, especially electron transport chain of mitochondria and endoplasmic reticulum. In adaptive adjustment of the oxygen metabolism due to stress, for example, biotransformation of xenobiotics is usually accompanied by certain shifts in the mode of formation of free radical intermediates [1].

The aim of the research is to study the mitochondrial respiratory activity of hepatocytes during the chronic fluoride intoxication.

Materials and methods

The studies were conducted on mature Wistar rats weighing 180-220 line g, which were held in the hospital vivarium. Rats were subjected to oral probe using aqueous solutions of sodium fluoride (FS) once daily for 60 days at doses of 1/10, 1/100 and 1/1000 LD₅₀, which was respectively 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 of the control group injected with the appropriate amounts of drinking water. Research conducted indicators 10, 20, 30, 50 and 60 days after the start of the experiment. Each group had 10 animals. Slaughter was performed by decapitation guillotine knife, pre-anesthetic thiopental sodium 50 mg/kg.

Rats' liver subcellular fractions were isolated by differential centrifugation. To separate the microsomal fraction was centrifuged supernatant hour at 18.000 g, the resulting precipitate was washed with suspended selection (protein in the microsomal suspension was 15-20 mg/ml).

* To cite this English version: Kolisnyk I.L., Bagmut I.Yu., Titkova A.V., Rezenenko Yu.K., Boiagina O.D. The structural and metabolic disorders of cells' membranes in experiment // Problemy ekologiy ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 57-59.

Hepatocytes' mitochondrial respiratory activity was assessed by polarographic [2]. Functional status I and II of the respiratory chain complexes were determined in the presence of specific substrates and inhibitors of the parameters:

1) state V4 – high content in the incubation medium substrates of complex I – 5 mM glutamate, 5 mM malate or substrate complex II – succinate in the absence of ADP;

2) state V3 – similar conditions as in the case of V4, but in the presence of 200 μ M ADP (the factor that limits the rate of reaction is exactly the respiratory chain);

3) state Vd – similar conditions as in the case of V4, but in the presence of oxidation and phosphorylation uncoupler 30 mM 2,4-dinitrophenol.

Mitochondria were isolated by differential centrifugation [3]: hepatic tissue homogenized in an environment with 250 mM sucrose, 3 mM Tris-HCl buffer, 0.5 mM EDTA (pH 7.3), homogenates were centrifuged at 700 g, the resulting supernatant centrifuged among 250 mM sucrose, 3 mM tris-HCl buffer (pH 7.3) at 7.000 g.

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

Results and discussion

A sensitive indicator of respiratory activity of cells are mitochondria, which can vary by the action of chemical agents [4-8]. Mitochondria are considered as energy system cell functional activity and determined by the work conjugated enzymes (e.g., NADH-coenzymeQ-oxidoreductase and succinate-coenzymeQ-oxidoreductase) respiratory chain, providing in the process of formation of oxidative phosphorylation macroergies.

Respiratory activity of rats' hepatocytes during prolonged fluoride toxicity was evaluated using specific substrates and inhibitors of NADH-coenzymeQ-oxidoreductase and succinate-coenzymeQ-oxidoreductase (as I and II of the respiratory chain complexes inner mitochondrial membrane of hepatocytes).

On the 30th day oral administration of FS to experimental animals in a dose of 1/10 LD₅₀ determined significantly ($p < 0.001$) when compared to control speed boost mitochondrial respiration of hepatocytes in the standings V3 and V4 on substrates of NADH-coenzymeQ-oxidoreductase 46 and 26% in accordance. FS action at this time of observation was accompanied by a statistically significant ($r \leq 0.002$) decrease in respiratory activity of mitochondria in V3 and V4 states on the substrate succinate-coenzymeQ-oxidoreductase respectively 16 and 36%. If 2,4-dinitrophenol was present, the significant ($P < 0.001$) dynamics of change relative to the control group of animals were recorded only on condition Vd succinate – a decline of 25%. On the 60th day of FS effect at a dose of 1/10 LD₅₀ characterized decrease ($p < 0.001$) respiratory activity of mitochondria in hepatocytes states V3 and V4, as the substrates of NADH-coenzymeQ-oxidoreductase (respectively 39 and 25%), and so the substrate succinate-coenzymeQ-oxidoreductase (respectively 38 and 53%). For the state to Vd succinate remained in the term fluoride intoxication in rats downward trend, which was more pronounced (average 45%).

On the 30th day of action FS 1/100 LD₅₀ dose was determined statistically significant ($p < 0.001$) relative to control speed boost oxygen consumption by mitochondria

in rats' hepatocytes states V3 and V4, as the substrates of NADH-coenzymeQ-oxidoreductase (by 29 and 36%), and so on substrates succinate-coenzymeQ-oxidoreductase (respectively 27 and 32%). For state Vd substrates for both enzymes almost virtually no changes were found in this time of observation. On the 60th day of action FS 1/100 LD₅₀ dose showed significantly ($r \leq 0.001$) when compared to control increase (average 23-24%), respiratory activity of mitochondria in V3 and V4 states on substrates of NADH-coenzymeQ-oxidoreductase against the background of reduction (average 18-33%) on the substrate succinate-coenzymeQ-oxidoreductase. Adding 2,4-dinitrophenol resulted in a statistically significant ($p < 0.001$) reduction 23% rate of mitochondrial respiration in rats in the presence of substrate succinate-coenzymeQ-oxidoreductase. Mitochondrial respiration in rats' hepatocytes Vd able to glutamate and malate when exposed in FS 1/100 LD₅₀ dose virtually unchanged and equal to the value of control.

The results indicate disorders of mitochondrial respiratory activity of rats' hepatocytes during prolonged fluoride intoxication. On the 30th day of FS action in a dose of 1/10 LD₅₀ is expressed by decreased activity of succinate-coenzymeQ-oxidoreductase, and on the 60th day decline as NADH-coenzymeQ-oxidoreductase well and NADH-coenzymeQ-oxidoreductase. If FS action in a dose 1/100 LD₅₀ abuse mitochondrial respiratory activity occurring on the 60th day, as evidenced by decreased activity of succinate-coenzymeQ-oxidoreductase. Identified changes can be explained by FS initiation of free radical reactions and lipid peroxidation, products which are factors damaging membranes, including mitochondrial, where localized respiratory chain. The observed increased activity of mitochondrial NADH-coenzymeQ-oxidoreductase action in the case of FS in a dose 1/100 LD₅₀, can probably be seen as a defensive response. But, according to the literature, for the actions of mitochondrial respiratory chain enzyme may be one-electron reduction of oxygen to form the toxic superoxide anion radical [5]. Under physiological conditions this reaction occurs at a very low level through the work of mitochondrial antioxidant system. Perhaps with fluoride toxicity in rats' hepatocytes disrupted electron transport at complex I of the mitochondrial respiratory chain, which may result in the formation of a significant amount of superoxide anion radicals.

Conclusion

Analysis of the results indicates the disorder in separation of oxidation and phosphorylation of substrates to mitochondrial complex II of the respiratory chain on the 60th day of the FS action in a dose of 1/10 and in a dose 1/100 LD₅₀, the result of which can be energetic disbalance.

References

1. Bondarev O.I. Specificity of morphological changes in organs and tissues to the effect of various production factors (experimental study). Bondarev, M.S. Bugaeva, N.N. Mikhailova // Influence of the environment and the production environment on human health. Ways to solve the problem. Materials XLVII scientific and practical conference with international participation "Hygiene, organization of public health and occupational pathology" and a seminar "Actual problems of modern occupational pathology" / ed. V.V. Zakharenkova – Kemerovo: Primrose, 2012. – C. 42-44.
2. Guide to Study Biology polarographic oxidation method / GM Frank (responsible. ed.) [et al.]. – Moscow: Nauka, 1973. – 221 p.

3. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver / K. Begrich, J. Massart, M. A. Robin [et al.] // J. Hepatol. – 2011. – Vol. 54. – P. 773-794.
4. Mitochondria as a target of environmental toxicants / J. N. Meyer, M. C. Leung, J. P. Rooney [et al.] // Toxicol. Sci. – 2013. – Vol. 134 (1). – P. 1-17.
5. Skulachev V.P. The phenomenon of programmed death. Mitochondria, cells and organs: the role of reactive oxygen species: Sorovsky Educational Journal. – 2001. – Vol. 7. – P. 4-10.
6. Klimenko MO, Kucheryavchenko M.O, Bagmut I.Yu, Zhukov VI, Long subtoxic influence on the metabolic activity of monooxygenase system hepatocytes in subacute experiment: Problems of continuing medical education and research. – 2014. – 4 [16]. – P. 57-60.
7. Bagmut I.Yu, Klimenko N.A, Zhukov V.I., The Effect on oligoephirs content on gonadotropic sexual hormones in blood of white rats. High society school 2013: materials of IX international scientific conference – Bulgaria, Sofia, "ByalGRAD-BG" OOD. – 2013. – V. 37. – P. 7-10.
8. 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.

Матеріал надійшов до редакції 02.03.2018

СОЦІАЛЬНІ АСПЕКТИ

© Мороховець Г. Ю., Саєнко М. С., Лисанець Ю. В., Сілкова О. В.
UDC 378.2+13+378.147

ВИКОРИСТАННЯ СИСТЕМИ КОМП'ЮТЕРНОЇ МАТЕМАТИКИ MAPLE У НАВЧАННІ МЕДИЧНОЇ І БІОЛОГІЧНОЇ ФІЗИКИ*

Мороховець Г. Ю., Саєнко М. С., Лисанець Ю. В., Сілкова О. В.

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

Комп'ютеризація навчання стає невід'ємною складовою освітнього процесу. Розвиток техніки, мобільних технологій зумовлює необхідність вдосконалення та оновлення навчальних курсів. Використання програмного забезпечення у навчальному процесі набуває широкого розповсюдження, що вимагає від сучасного студента вільного володіння математичним апаратом, знання основ програмування та вміння працювати на рівні впевненого користувача із різноманітними програмними засобами, додатками. Особливо актуальною є необхідність застосування комп'ютерних технологій під час вивчення тем, винесених на самостійне вивчення. Впровадження інформаційних технологій дозволить збагатити зміст і урізноманітнити способи оволодіння новими темами, стимулювати студентів до самонавчання та саморозвитку. Статтю присвячено застосуванню пакету прикладної математики Maple під час навчального процесу студентів вищих медичних закладів.

Ключові слова: самостійна робота, медична і біологічна фізика, студенти-медики, Maple.

Проблема використання сучасних комп'ютерних технологій (КТ) у навчальному процесі нині є актуальною. Питання щодо використання сучасних інформаційно-комунікаційних технологій (ІКТ) у навчальному процесі ґрунтовно розглядаються в роботах В. Михалевича і Я. Крупського [6, 7], М. Жалдака [15], В. Клочко [8], О. Співаковського [9], Ю. Триуса [10] та ін. Дослідниками також описуються питання використання електронних підручників, мультимедійних презентацій [13], мультимедійних зображень, клінічних випадків та ін. [13, 12]. Особливу увагу дослідників привертає питання використання ІКТ у викладанні математичних дисциплін. Виявлено, що найчастіше предметом досліджень вчених стають програмні продукти MathLab, Maple, Mathematica, STATISTICA [5].

Мета статті безпосередньо полягає в аналізі та висвітленні основних переваг та проблем, які виникають при використанні системи комп'ютерної математики Maple у навчальному процесі студентів-медиків.

Програма дисципліни «Медична і біологічна фізика» передбачає самостійне вивчення тем змістового модуля «Основи вищої математики та біологічної фізики» у обсязі 38 годин студентами медичного та стоматологічного факультетів. Підсумковий контроль знань студентів часто виявляє незадовільні результати за темами, винесеними на самостійне опрацювання. Якість виконаних самостійних завдань, зазвичай, не оцінюється вище задовільного рівня [2].

Використання у навчанні студентів-медиків медичної і біологічної фізиці програмного забезпечення, зо-

крема систем комп'ютерної математики є надзвичайно важливим, оскільки їх вивчення і використання буде сприяти:

- поглибленню знань студентів з вищої математики, інформатики;
- розширенню вмінь розв'язування завдань вищої математики різноманітного характеру;
- формуванню навичок застосування сучасних математичних пакетів у процесі вивчення медико-біологічних дисциплін і в майбутній професійній діяльності.

Вивчення медичної і біологічної фізики у вищих медичних навчальних закладах має мати прикладний характер, що дасть змогу студентам зрозуміти необхідність вивчення дисципліни, як фундаменту більшості спеціальних дисциплін. Використання пакету Maple для вирішення прикладних завдань з вищої математики забезпечує підвищення рівня мотивації як до вивчення дисципліни, так і до використання на належному рівні спеціального програмного забезпечення та швидкого розв'язання задач. Найефективнішим, на нашу думку, є використання версії Maple 11, оскільки вона дає можливість розв'язування різноманітних задач математичного аналізу (обчислення границь, диференціювання й інтегрування функцій); розв'язування диференціальних рівнянь і рівнянь в частинних похідних. Необхідність переходу від ручного введення даних та проведення розрахунків до роботи у середовищі системи комп'ютерної математики визначає безпосередньо викладач. Основною задачею да-

* Цитування при атестації кадрів: Мороховець Г. Ю., Саєнко М. С., Лисанець Ю. В., Сілкова О. В. Використання системи комп'ютерної математики Maple у навчанні медичної і біологічної фізики. // Проблеми екології і медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 60–62.

ного переходу є автоматизація рутинних операцій [11].

Розглянемо приклад:

знайти y' , якщо $y = \sqrt[5]{\sin x} \operatorname{tg}^2 x \sqrt[4]{\cos x}$. (1)

$$\ln y = \ln(\sqrt[5]{\sin x} \operatorname{tg}^2 x \sqrt[4]{\cos x}) \Rightarrow \ln y = \frac{1}{5} \ln \sin x + 2 \ln \operatorname{tg} x + \frac{1}{4} \ln \cos x \Rightarrow$$

$$\ln y = \frac{1}{5} \ln \sin x + 2 \ln \sin x - 2 \ln \cos x \Rightarrow \ln y = \frac{11}{5} \ln \sin x - \frac{7}{4} \ln \cos x \quad (2)$$

Провівши диференціювання обох частин рівності, отримаємо:

$$(\ln y)' = \left(\frac{11}{5} \ln \sin x - \frac{7}{4} \ln \cos x \right) \Rightarrow \frac{1}{y} y' = \frac{11}{5} \frac{1}{\sin x} (\cos x) - \frac{7}{4} \frac{1}{\cos x} (-\sin x) \Rightarrow$$

$$y' = \sqrt[5]{\sin x} \operatorname{tg}^2 x \sqrt[4]{\cos x} \left(\frac{11}{5} \cot x + \frac{7}{4} \operatorname{tg} x \right) \quad (3)$$

Громіздкі математичні розрахунки у наведеному прикладі можна значно спростити, використовуючи вбудовані команди меню у послідовності: Tools → Tutors → Differential Equations. Результат розрахунків негайно виводиться на екран, при цьому існує можливість виведення проміжних результатів, що забезпечить розуміння суті проведених математичних операцій студентами.

Використання системи Maple іноді може обмежуватися проведенням лише проміжних розрахунків, коли повна автоматизація процесу не є допустимою. Так, команда «simplify» дозволяє спростити складний вираз, «normal» - зводить вираз до спільного знаменника та виконує скорочення дробу, «solve» - виводить результат введеного рівняння.

Наведемо приклад. Розв'язати рівняння:

$$x^4 - 13x^2 + 36 = 0. \quad (4)$$

Для розв'язання рівняння необхідно провести за-

міну змінної, поклавши, $x^2 = t$. (5)

Дістаємо $t^2 - 13t + 36 = 0$. (6)

$$\begin{cases} t_1 + t_2 = -13 \\ t_1 * t_2 = 36 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} t = 4 \\ t = 9 \end{cases} \quad (7)$$

Повернувшись до заміни, отримаємо результат:

$$\begin{cases} x^2 = 4 \\ x^2 = 9 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} x = \pm 2 \\ x = \pm 3 \end{cases} \quad (8)$$

Результат розрахунків у системі Maple наведено нижче.

```
> solve({x^4 - 13 * x^2 + 36 = 0}, {x});
{x = -2}, {x = 2}, {x = -3}, {x = 3}. (9)
```

Для алгебраїчних перетворень система Maple також оснащена набором функцій, зокрема: «expand» – розкрити дужки, «factor» – розкласти на множники, «collect» – звести подібні члени.

Корисною, на наш погляд, під час практичних занять і, особливо, під час виконання самостійної роботи є функція «subs» - перевірка правильності розв'язків рівнянь. Потужним інструментом системи вважаємо команду «plot», що дозволяє будувати графіки функцій однієї змінної. Також система оснащена набором команд для побудови тривимірних зображень та

так як функція являє собою добуток кількох множників, то перед диференціюванням необхідно провести логарифмування:

анімацій. Дані функції, у більшій мірі, стають корисними викладачеві при підготовці до практичних занять. За допомогою пакета викладач має змогу не тільки показати можливість швидкого розв'язання задачі, а й графічно проілюструвати її розв'язок.

Зауважимо, що система комп'ютерної математики не може замінити присутність та вплив викладача на занятті і, насамперед, передбачає грамотне використання інструментарію на етапі, коли студент на належному рівні оволодів вміннями та навичками розв'язування задач відповідного розділу вищої математики. Правильне використання цього пакета в навчальному процесі забезпечує підвищення рівня фундаментальності медико-біологічних дисциплін, і освіти у цілому.

Перевагами системи є швидкість процесу розрахунків, самостійність виконання завдань студентами, оволодіння навичками користування комп'ютерними технологіями, сучасним програмним забезпеченням. Із недоліків, слід виділити, неможливість проведення контролю за діями студента з боку викладача при розв'язанні, перевірка лише кінцевої відповіді без детального опису помилок. Використання програми Maple дає змогу студентам самостійно вивчати певні теми, а сам процес навчання стає простішим та цікавішим, позбавленим психологічних бар'єрів.

Висновки

Стрімкий розвиток комп'ютерних технологій, використання їх у навчальному процесі змінює підходи до викладання та вимагає від студента вільного володіння сучасним програмним забезпеченням. У середовищі вищого медичного навчального закладу комп'ютерні технології мають широке використання, що не обмежується предметом вивчення медичної інформатики. Програмне забезпечення, у тому числі, системи комп'ютерної математики можуть ефективно використовуватися при вивченні медичної і біологічної фізики на першому курсі. Доцільним є використання пакету Maple для розв'язування завдань із вищої математики змістового модуля «Основи вищої математики та біологічної фізики», як при підготовці до практичних занять, так і при самостійній роботі над темами. Метою використання Maple є спрощення громіздких розрахунків, унаочнення розв'язків завдань, подолання психологічного бар'єру у вивченні складних тем, що за змістом значно відрізняються від шкільного курсу математики та фізики.

За допомогою стандартних команд системи комп'ютерної математики Maple можна отримати кінцеву відповідь при розв'язанні широкого кола математичних задач. Система Maple оснащена потужним алгебраїчним інструментарієм, що може застосовуватися для розв'язання конкретного завдання і його окремих частин.

Важливим компонентом системи під час вивчення медичної і біологічної фізики є вбудований комплекс команд із побудови дво-, тривимірних графіків функцій та анімацій. Необхідність використання програми також зумовлена зростанням частки тем, винесених на самостійне опрацювання.

Використання програмних засобів у вивченні дисципліни має бути грамотним, тобто використовуватися на етапі, коли студент достатньо оволодів методами розв'язування завдань.

Література

1. Ленкова О.О., Мороховець Г.Ю., Міщенко С.В. Формування інформаційно-комунікаційних компетенцій майбутніх лікарів на засадах використання комп'ютерних технологій у навчальному процесі // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2015. №3-1 (51).
2. Крупський Я. Проблеми ефективної роботи студентів під час використання навчальних Maple тренажерів з покрокового розв'язання типових задач вищої математики / Я. Крупський, В. Михалевич // Збірник наукових праць Уманського державного педагогічного університету. 2011. Ч. 3. С. 130-135. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/znpu2011_3_19.
3. Lysanets Yuliia; Morokhovets, Halyna; Bieliaieva, Olena. Stylistic features of case reports as a genre of medical discourse. Journal of medical case reports, 2017, 11.1: 83.
4. Саєнко М.С., Мороховець Г.Ю. Використання інформаційно-комунікаційних технологій у майбутній професійній діяльності в процесі вивчення медичної інформатики // Імідж сучасного педагога. – 2018. – № 3 (180). – С. 18-21.
5. Казнадій С.П., Мурашківська В.П., Руновська Л.А. використання комп'ютерних технологій в навчальному процесі. Педагогічні науки: теорія, історія, інноваційні технології. – 2016. – № 2 (56).
6. Михалевич В. М Підвищення ефективності самостійної навчально-пізнавальної діяльності студентів за допомогою Maple-технологій (перевіряючий комплекс) / Михалевич В.М., Крупський Я. В. // Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М. П. Драгоманова. Серія 5 Педагогічні науки: реалії та перспективи. – 2010. – Випуск 22. – С. 285-290.
7. Михалевич В.М. Використання систем комп'ютерної математики у процесі навчання студентів ВНЗ : монографія / В. М. Михалевич, О. І. Тютюнник. — Вінниця : ВНТУ, 2016. — 279 с.
8. Клочко В.І. Застосування новітніх інформаційних технологій при вивченні вищої математики у технічному вузі : навч.-метод. посіб. / В. І. Клочко. — Вінниця : ВДТУ, 1997. — 300 с.
9. Співаковський О.В. Теорія і практика використання інформаційних технологій у процесі підготовки студентів математичних спеціальностей : монографія / Співаковський О. В. — Херсон : Айлант, 2003. — 228 с.
10. Триус Ю.В. Комп'ютерно-орієнтовані методичні системи навчання математики : монографія / Юрій Васильович Триус. — Черкаси : Брама-Україна, 2005. — 400 с. 22.
11. Подошвелев Ю. Г. Об'єктивність використання систем комп'ютерної математики в навчальному процесі / Ю. Г. Подошвелев // Імідж сучасного педагога. – 2003. – № 1. С. 38–41.
12. Подошвелев Ю.Г. Диференціальні та інтегральні рівняння : навчальний посібник для студентів фізико-математичного факультету / Ю. Г. Подошвелев. – Полтава : РІО – 2008. – 276 с.
13. 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. – T. LXX. – № 1. – P. 101-104.
14. Lysanets Yu. Stylistic Features of Case Reports as a Genre of Medical Discourse [Electronic resource] / Yu. Lysanets, H. Morokhovets, O. Bieliaieva // Journal of Medical Case Reports. – 2017. – Vol.11. – №83. – Access mode : <https://imedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13256-017-1247-x>.
15. Zhaldak M.I. Vplyv novoyi informatsiynoyi tekhnolohiyi na zmist osvity/ M.I. Zhaldak, N.V. Morze, A.H. Oliynyk, V.S. Rams'kyi // Suchasna informatsiyna tekhnolohiya v navchal'nomu protsesi: zb. nauk. prats'. – K.: Znannya, 1991. – P. 33–38.

Матеріал надійшов до редакції 05.03.2018

ENGLISH VERSION: THE USE OF MAPLE MATHEMATICAL SOFTWARE IN TEACHING MEDICAL AND BIOLOGICAL PHYSICS*

Morokhovets H. Yu., Saienko M. S., Lysanets Yu. V., Silkova O. V.

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

Computerization of training becomes an integral part of the educational process. The development of technologies, mobile devices necessitates the improvement and updating of training courses. The use of software in the learning process is widespread, which requires from a modern student to master the mathematical apparatus, to have knowledge of the basics of programming and the ability to work at the level of a confident user with a variety of software tools and applications. Particularly relevant is the need for the use of computer technologies during the study of topics for self-directed study. The introduction of information technologies will enrich the content and diversify the ways of mastering new topics, stimulating students for self-education and self-development. The article is devoted to application of the software package of applied mathematics Maple during the educational process of students of higher medical establishments.

Key words: self-directed work, medical and biological physics, medical students, Maple.

The problem of using modern computer technology (CT) in the educational process is quite relevant nowadays. Questions concerning the use of modern information and communication technologies (ICTs) in the educational process have been thoroughly considered in the studies of V. Mykhalevych and Y. Krupskiy [6, 7], M. Zhaldak [15], V. Klochko [8], O. Spivakovskiy [9], Yu. Trius [10] and others. Researchers also describe the use of electronic textbooks, multimedia presentations [13], multimedia images, clinical cases, etc. [14, 13]. Particular attention of researchers is attracted to the question of using ICT in teaching the mathematical subjects. It was found that the most frequently studied subjects are the software products MathLab, Maple, Mathematica, STATISTICA [5].

The aim of the article is to analyze and highlight the main advantages and problems arising from the use of Maple system of computer mathematics in the educational process of medical students.

The curriculum of the subject "Medical and Biological Physics" involves the self-directed study of the content module "Fundamentals of Higher Mathematics and Biological Physics" (38 hours) by students of medical and dental faculties. The final control of students' knowledge often reveals unsatisfactory results in terms of topics, covered by self-directed study. The academic performance of completed self-directed tasks, as a rule, is not assessed above the satisfactory level [2].

The use of software in teaching medical and biological physics for medical students, in particular the computer-based mathematics software, is extremely important, as their study and use will facilitate the following processes:

- deepening the students' knowledge in higher mathematics, computer science;
- expanding the skills of solving tasks in higher mathematics of a diverse nature;
- formation of skills in using modern mathematical packages in the process of studying medical and biological subjects, as well as for future professional activities.

The study of medical and biological physics in higher medical schools should be applied in a way that will enable students to understand the need to study the subject as a foundation for most of special disciplines. Using the Maple package for solving applied problems in higher mathematics provides an increase in the level of motivation both for studying the discipline, and for the use of special software at the appropriate level and rapid problem solving. The most effective, in our opinion, is the use of the version of Maple 11, since it enables the solving of various tasks of mathematical analysis (boundary calculation, differentiation and integration of functions); solving differential equations and equations in partial derivatives. The need for the transition from manual data entry for calculation to work in the environment of computer mathematics system is determined directly by the teacher. The main task of this transition is the automation of routine operations [11].

Let us consider the following example:

$$\text{Find } y', \text{ if } y = \sqrt[5]{\sin x} \cdot \text{tg}^2 x \cdot \sqrt[4]{\cos x} \quad (1);$$

Since the function is a product of several factors, then before the differentiation it is necessary to carry out the logarithmation:

$$\begin{aligned} \ln y &= \ln(\sqrt[5]{\sin x} \cdot \text{tg}^2 x \cdot \sqrt[4]{\cos x}) \Rightarrow \ln y = \frac{1}{5} \ln \sin x + 2 \ln \text{tg} x + \frac{1}{4} \ln \cos x \Rightarrow \\ \ln y &= \frac{1}{5} \ln \sin x + 2 \ln \sin x - 2 \ln \cos x \Rightarrow \ln y = \frac{11}{5} \ln \sin x - \frac{7}{4} \ln \cos x \end{aligned} \quad (2)$$

After differentiating both parts of equality, we obtain:

$$\begin{aligned} (\ln y)' &= \left(\frac{11}{5} \ln \sin x - \frac{7}{4} \ln \cos x \right) \Rightarrow \frac{1}{y} y' = \frac{11}{5} \frac{1}{\sin x} (\cos x) - \frac{7}{4} \frac{1}{\cos x} (-\sin x) \Rightarrow \\ y' &= \\ \sqrt[5]{\sin x} \cdot \text{tg}^2 x \cdot \sqrt[4]{\cos x} &\left(\frac{11}{5} \cot x + \frac{7}{4} \text{tg} x \right) \end{aligned} \quad (3)$$

Lengthy mathematical calculations in the example

given above can be greatly simplified using the built-in

* To cite this English version: Morokhovets H. Yu., Saienko M. S., Lysanets Yu. V., Silkova O. V. The use of maple mathematical software in teaching medical and biological physics // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 1-2. - P. 63–65.

menu commands in the sequence: Tools → Tutors → Differential Equations. The result of calculations is immediately displayed on the screen, while there is a possibility of intermediate results, which will provide an understanding of the essence of the mathematical operations performed by students.

Using the Maple system can sometimes be limited to intermediate calculations, when full automation of the process is not permissible. Hence, the command “simplify” allows you to streamline the complex expression, “normal” – reduces the expression to a common denominator and performs reduction of a fraction, “solve” – outputs the result of the entered equation.

Here is an example. Solve the equation:

$$x^4 - 13x^2 + 36 = 0. \quad (4)$$

To solve the equation, you need to replace the variable by putting $x^2 = t$.

$$\text{We get } t^2 - 13t + 36 = 0 \quad (6)$$

$$\begin{cases} t_1 + t_2 = -13 \\ t_1 * t_2 = 36 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} t = 4 \\ t = 9 \end{cases} \quad (7)$$

Returning to the substitution, we get the result:

$$\begin{cases} x^2 = 4 \\ x^2 = 9 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} x = \pm 2 \\ x = \pm 3 \end{cases} \quad (8)$$

The result of calculations in the Maple system is shown below.

```
> solve (x^4 - 13 * x^2 + 36 = 0), {x};
{x = -2}, {x = 2}, {x = -3}, {x = 3}. (9)
```

For algebraic transformations, the Maple system is also equipped with a set of functions, in particular: “expand” – to open brackets, “factor” – to expand into multipliers, “collect” – to build similar members.

In our opinion, the function “subs” (checking of correctness of solutions of equations) is particularly useful during practical classes and, especially, during the performance of self-directed work. A powerful system tool is the “plot” command, which allows you to build graphs of functions of one variable. In addition, the system is equipped with a set of commands for building three-dimensional images and animations. These functions largely become useful to the teacher in preparation for practical classes. With the help of the package, the teacher can not only show the possibility of a quick solution to the problem, but also graphically illustrate its solution.

It should be noted that the system of computer mathematics cannot replace the presence and influence of the teacher in the classroom, and, first of all, involves the competent use of tools at the stage when the student mastered the skills and abilities for solving the tasks of the corresponding section of higher mathematics at an appropriate level. The proper use of this package in the educational process ensures an increase in the level of mutual convergence of medical and biological subjects, and education in general.

The advantages of the system are the speed of the calculation process, the self-directed performance of the tasks by students, the acquisition of skills in using computers and modern software. The disadvantages should also be highlighted: namely, the impossibility of controlling the actions of students by the teacher when solving

the task; checking only the final answer without a detailed description of the errors. Using the Maple program allows students to study certain topics independently, and the learning process becomes easier and more interesting, deprived of psychological barriers.

Conclusions

The rapid development of computer technologies, their use in the educational process changes the approaches to teaching and requires from students mastering the modern software. In the setting of a higher medical institution, computer technologies are widely used, which is not limited to studying medical informatics. Software, including systems of computer mathematics, can be effectively used in the study of medical and biological physics during the first year of study. It is advisable to use the Maple package for solving problems of higher mathematics of the content module “Fundamentals of Higher Mathematics and Biological Physics”, both in preparation for practical classes and in self-directed work on topics. The purpose of using Maple is to simplify the lengthy calculations, to clarify the solution of tasks, to overcome the psychological barrier in studying the complex topics, which significantly differ from the school course of mathematics and physics in terms of content.

Using the standard commands of the Maple system of computer mathematics, one can obtain the final answer when solving a wide range of mathematical problems. The Maple system is equipped with a powerful algebraic toolkit, which can be used to solve a particular task and its individual parts.

An important component of the system during the study of medical and biological physics is a built-in complex of commands for constructing two-, three-dimensional graphs of functions and animations. The need to use the program is also due to an increase in the proportion of topics covered by the self-directed study.

The use of software in the study of the subject must be competent, that is, used at the stage when the student has sufficiently mastered the methods of solving the tasks.

References

1. Lienkova O.O., Morokhovets H.Yu., Mischenko S.V. Formation of information and communication competences of future physicians on the basis of the use of computer technologies in the educational process // Current problems of modern medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Stomatological Academy. – 2015. – No. 3-1 (51).
2. Krupskiy Ya. Problems of effective work of students in the use of educational Maple simulators from the step-by-step solution of typical tasks of higher mathematics / Ya. Krupsky, V. Mykhalevych // Collection of scientific works of Uman State Pedagogical University. 2011. Part 3. P. 130-135. Access mode: http://nbuv.gov.ua/UJRN/znpu2011_3_19.
3. Lysanets Yu., Morokhovets H., Bieliaieva O. Stylistic features of case reports as a genre of medical discourse // Journal of medical case reports. – 2017. – 11.1: 83.
4. Saienko M.S., Morokhovets G.Yu. The use of information and communication technologies in future professional activities in the process of studying medical informatics // Image of modern teacher. – 2018. – No. 3 (180). – P. 18-21.
5. Kaznadiy S.P., Murashkovsky V.P., Runovskaya L.A. The use of computer technologies in the educational process // Pedagogical sciences: theory, history, innovative technologies. – 2016. – No. 2 (56).
6. Mykhalevych V. M. Improving the efficiency of self-directed educational and cognitive activity of students with the help of Maple technologies (verification complex) / V.M. Mykhalevych, Ya.V. Krupskiy // Scientific journal of the Na-

- tional Pedagogical University named after MP Draho-
manov. Series 5 Pedagogical sciences: realities and per-
spectives. – 2010. – Issue 22. – S. 285-290.
7. Mykhalevych V.M. The use of systems of computer
mathematics in the process of training students of higher
educational institutions: monograph / V. M. Mykhalevych,
O. I. Tiutiunnyk. – Vinnitsa: VNTU, 2016. – 279 p.
 8. Klochko V.I. Application of the latest information technolo-
gies in the study of higher mathematics at a technical col-
lege: Teaching manual / V. I. Klochko. – Vinnitsa: VGTU,
1997. – 300 p.
 9. Spivakovsky O. V. Theory and practice of using informa-
tion technologies in the process of training students of
mathematical specialties: Monograph / O. V. Spivakovsky
– Kherson: Aylant, 2003. – 228 p.
 10. Trius Yu. V. Computer-oriented methodical systems of
teaching mathematics: monograph / Yu. V. Trius. – Cher-
kasy: Brama-Ukraine, 2005. – 400 p. 22
 11. Podoshelev Yu.G. Objectivity in the use of systems of
computer mathematics in the educational process / Yu G.
Podoshvulev // Image of a modern teacher. – 2003. – No.
1. P. 38-41.
 12. Podoshelev Yu. G. Differential and Integral Equations: A
Manual for Students of the Faculty of Physics and Mathe-
matics / Yu. G. Podoshvelev. – Poltava: RIO – 2008. –
276 p.
 13. Morokhovets H. Yu. Developing the Professional Compe-
tence of Future Doctors in the Instructional Setting of
Higher Medical Educational Institutions / H. Yu. Morok-
hovets, Yu. V. Lysanets // Wiadomości Lekarskie. – 2017.
– T. LXX. – No. 1 – P. 101-104.
 14. Lysanets Yu. Stylistic Features of Case Reports as a
Genre of Medical Discourse [Electronic resource] / Yu. Ly-
sanets, H. Morokhovets, O. Bieliaieva // Journal of Medical
Case Reports. – 2017. – Vol. 11. – No. 83. – Access
mode:
[https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.
1186/s13256-017-1247-x](https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13256-017-1247-x). 15
 15. Zhaldak M.I. Vplyv novoyi informatsiyanoi tekhnolohiyi na
zmist osvity/ M.I. Zhaldak, N.V. Morze, A.H. Oliynyk, V.S.
Rams'kyy // Suchasna informatsiyana tekhnolohiya v
navchal'nomu protsesi: zb. nauk. prats'. – K.: Znannya,
1991. – P. 33–38.

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ

З метою дотримання міжнародних правил оформлення, авторам рекомендується ознайомитися з "Єдиними Вимогами до Рукописів для Біомедичних Журналів" на 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 (рисунок, 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. Рисунок 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 відвідуватися 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.

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.