

Проблеми екології

та медицини

Том 22 N 3-4 2018

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Заснований в 1997 році

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

DYNAMICS IN CHANGES OF FREE-RADIAL OXIDATION PROTEINS, REGENERATOR PROCESSES, MICROBIAL DISTRIBUTION AND NON-SPECIFIC IMMUNITY IN THE HOMOGENATES OF SCAR TISSUES AT DIFFERENT STAGES OF THE POSTOPERATIVE PERIOD

Krinichko L.R., Grigorov S.M. 3

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ В-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ

Лавренко А.В., Кайдашев И.П. 7

ENGLISH VERSION: THE STUDY OF PREVALENCE OF HYPERSENSITIVITY TO B-LACTAM ANTIBIOTICS AMONG THE POPULATION OF UKRAINE

Lavrenko A.V., Kaidashev I.P. 11

SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE IN FEMALE PATIENTS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA AND OBESE WOMEN DOES NOT DIFFER IN THE EXPRESSION OF IKBA

Nedoborenko V.M., Shlykova O.A., Izmailova O.V., Ishcheikin K.E., Kaidashev I.P. 14

СОЦІАЛЬНІ АСПЕКТИ

METHODS OF EFFECTIVE TEACHING BIOINFORMATICS IN MEDICAL ACADEMIC SETTING

Morokhovets H. Yu., Lysanets Yu. V. 18

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

THE DEVELOPMENT OF MEMBRANOUS PATHOLOGY OF HEPATOCYTES THE INFLUENCE OF INTOXICATION

Bagmut I.Yu., Kolisnyk I.L., Titkova A.V., Rezunenکو Yu.K.,* Voiagina O.D. * 22

ПРИРОДНІ ПЕПТИДНІ КОМПЛЕКСИ ТИМУСА ТА НИРОК ПІДСИЛЮЮТЬ АПОПТОЗ ТРАНСФОРМОВАНИХ Т-КЛІТИН, АЛЕ НЕ ВПЛИВАЮТЬ НА ПРОЦЕСИ АПОПТОЗУ В-КЛІТИН

Шликова О. А., Измайлова О. В., Лисанець Ю. В. 25

ENGLISH VERSION: NATURAL PEPTIDE COMPLEXES OF THYMUS AND KIDNEYS REINFORCE APOPTOSIS OF TRANSFORMED T-CELLS, BUT DO NOT AFFECT THE PROCESSES OF APOPTOSIS IN B-CELLS

Shlykova O.A., Izmailova O.V., Lysanets Yu.V..... 30

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ..... 35

INFORMATION FOR AUTHORS..... 36

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Krinichko L.R., Grigorov S.M.

UDC 616.5-003.92-089:612.017:577.112

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2018.22.3-4.01>

DYNAMICS IN CHANGES OF FREE-RADIAL OXIDATION PROTEINS, REGENERATOR PROCESSES, MICROBIAL DISTRIBUTION AND NON-SPECIFIC IMMUNITY IN THE HOMOGENATES OF SCAR TISSUES AT DIFFERENT STAGES OF THE POSTOPERATIVE PERIOD*

Krinichko L.R., Grigorov S.M.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

The problem of excessive scar formation deserves a particular attention, primarily in the open areas of the human body, because the biochemical mechanisms of the regulation of collagenosynthesis processes after planned surgical interventions of the skin are not well-substantiated. The aim of the study was to optimize the prevention of pathological scars after surgical treatment of congenital neck cysts by determination of the dynamics of changes in biochemical parameters occurring in the neck skin at various stages of healing. It was proved that the combined use of PRF-clot at the intraoperative stage of prophylaxis and ceruloplasmin at the post-operative, in contrast to monotherapy with fibrin membranes, obtained from platelets-rich plasma caused a better functional and aesthetic result, which significantly improved the quality of life of patients in the early and late postoperative periods.

Keywords: scar, congenital neck cyst, prophylaxis.

Проблема надмірного рубцеутворення, в першу чергу, на відкритих ділянках людського тіла потребує особливої уваги, оскільки біохімічні механізми регуляції процесів колагеносинтезу після планових хірургічних розрізів шкіри є недостатньо обґрунтованим. Метою даної роботи була оптимізація профілактики виникнення патологічних рубців після хірургічного лікування вроджених кіст шиї шляхом визначення динаміки зміни біохімічних показників, що відбуваються в шкірі шиї на різних етапах загоєння. Встановлено, що комбіноване застосування PRF-згустку на інтраопераційному етапі профілактики та церулоплазміну на післяопераційному, на відміну від монотерапії фібриновими мембранами, отриманих із збагаченої тромбоцитами плазми крові, приводить до кращого як функціонально так і естетичного результату, що суттєво покращує якість життя пацієнтів у ранньому та пізньому післяопераційному періодах.

Ключові слова: рубець, вроджені кісти шиї, профілактика.

Introduction

Scarring is a pathophysiological process of skin regeneration, which is directed at closing of defect. It is an important and relevant problem of modern medicine. The problem of excessive scar formation deserves a particular attention, primarily in the open areas of the human body [1, 2]. Scarring can be caused by various factors, such as traumatic or burn injuries, surgical interventions, purulent inflammatory diseases etc. The regulation of this process depends on many factors, both iatrogenic and general somatic [3, 4].

According to the analysis of literary sources, the study of biochemical mechanisms of the regulation of collagenosynthesis processes after planned surgical interventions of the skin is not well-substantiated [5, 6].

The aim of the study was to optimize the prevention of pathological scars after surgical treatment of congeni-

tal neck cysts by determination of the dynamics of changes in biochemical parameters occurring in the neck skin at various stages of healing.

Materials and methods

We conducted the biochemical study of the homogenates of the scarred tissues and the intact skin (control group) obtained after surgical excision of scar tissue and skin surpluses during planned surgical interventions at the neck cysts of the embryonic origin.

All patients were divided into 3 clinical groups by the nature of the prophylactic procedure:

Group 1 - 20 patients who received a PRF-clot obtained in a centrifuge in A-PRF test tubes during an operation in 2 layers under the muscle and under the skin.

Group 2 - 20 patients who received a similar intraoperative prophylaxis, but an injection of the drug Biocerulin was performed at the postoperative stage.

* To cite this English version: Bagmut I.Y., Gramatiuk S.M. Pathophysiologic 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, № 3-4. - P. 3-6.

Group 3 (control) - 20 patients, who received a classical technique of intervention without using of prophylactic measures in the postoperative period.

Determination of oxidative modification of blood plasma proteins (OMP) was carried out in conjunction with 2,4-dinitrophenylhydrazine and formation of 2,4-dinitrophenylhydrazones with a typical absorption spectrum. Aldehydogen and ketone derivatives of neutral type were registered at 370 nm (OMP 370), and the base type – at 430 nm (OMP 430) [7]. The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined in a supernatant obtained by the method of S. Chevary and co-authors [8]. Determination of the content of reduced glutathione (SH-groups) was performed in the interaction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (Elman reagent) with SH-groups of the investigated substrate. In this case, thionitrophenyl anion was formed, which was directly proportional to the content of SH-groups [9]. The activity of lysozyme and urease was determined by the bacteriolytic method, which principle was to determine oral dysbiosis for screening of pro- and prebiotics using an enzymatic as-

say [10]. The activity of elastase was determined by the method of Levitsky and co-authors [11]. The evaluation of the intensity of the reparative processes was determined by the amount of RNA and DNA in the homogenate of the skin and scarred tissues according to the A.S. Spirina's method [12].

Statistical analysis of the obtained data was performed using the Statistica 6.0 software package (StatSoft Inc., USA). To verify the statistical significance of the differences in frequency indices, the χ^2 Pearson correction with Yates correction and Fischer's exact criterion were used.

Results and discussion

The destruction of proteins is a more reliable marker of oxidative tissue damage than peroxide oxidation of lipids, because the products of oxidative modification of proteins (OMP) are more stable than lipids peroxides, which are rapidly metabolized by peroxidases and low molecular weight of antioxidants.

Table 1. Indices of free radical oxidation of proteins in the skin homogenate at using of PRF-clot

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1
OMP 370, mmol/g protein	4.09±0.08	2.81±0.07*	2.90±0.04	2.09±0.07*	1.97±0.10	1.72±0.07	1.51±0.05	1.49±0.08
				$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.002$		$p_3 < 0.05$
OMP 430, mmol/g protein	1.85±0.05	1.45±0.03*	1.40±0.08	0.98±0.08*	0.84±0.07	0.72±0.06	0.61±0.05	0.62±0.06
				$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.02$		

The processes of uncontrolled modification of proteins were developed under conditions of oxidative stress and excessive generation of active forms of oxygen (AFO). They had caused protein fragmentation, their denaturation, as well as the formation of primary amino acid radicals, which had entered the secondary interaction

with adjacent amino acid residues. All this factors had created a rather complicated picture of the damaging action of AFO on the protein macromolecule. All this had led to the loss of biological activity of proteins and metabolic disorders, in particular, regenerative processes.

Table 2. Indices of free radical oxidation of proteins in the skin homogenate at using of PRF-clot and Bioceruline

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2
OMP 370, mmol/g protein	4.09±0.08	2.32±0.06*	2.90±0.04	1.78±0.06*	1.97±0.10	1.54±0.02*	1.51±0.05	1.40±0.06
				$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.002$		$p_3 < 0.05$
OMP 430, mmol/g protein	1.85±0.05	1.18±0.05*	1.40±0.08	0.74±0.05*	0.84±0.07	0.60±0.04*	0.61±0.05	0.56±0.04
				$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.05$		

It was proved that in patients of group 1 the content of 2,4-dinitrophenylhydrazones (that was determined at 370 nm) was significantly reduced by 45.5% after 3 months of observation, after 6 months - by 38.7% and 9 months later - by 14.5%, relative to the data of the control group. The content of 2,4-dinitrophenylhydrazones that was determined at 370 nm was practically not different in patients of the first and third groups, after 12 months of observation. It was evidenced by the literature data. The content of 2,4-dinitrophenylhydrazones that was determined at 370 nm in the skin homogenate of patients with different types of intra- and postoperative prophylaxis of

pathological skin scarring after the surgical treatment of embryonic neck cysts relative to the intact group of patients; the highest rates were found in patients in the control group (after 3 months of observation it was the significant prevalence of 2.8 times, after 6 months - 2 times and after 9 months - 33.0%). The lowest OMP rates were observed in patients of the 2nd group. So, this indicator exceeded the indicator of intact group after 3 months of observation by 60.0%, after 6 months - by 20.0% and after 9 months - by 6.5%.

It has been established that the content of RNA in the first and second experimental groups was significantly

higher, respectively, in 3 (37.3% and 73.0%) and 6 months (11.4% and 20.8%), as compared to the control group of patients ($p_1 < 0.01$). The introduction of PRF-clot during surgical treatment of embryonic neck cysts was

characterized by the highest values of DNA content after 3 months, whereas after 6 months the level of the researched indicator decreased by 17.20%.

Table 3.
Indices of regenerator process in the skin homogenate at using of PRF-clot

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1
RNA, mkg/mg	22.15±0.57	30.41±0.26*	26.41±0.57	29.41±0.38*	28.30±0.36	28.45±0.27	27.46±0.35	27.99±0.25
DNA, mkg/mg	17.09±0.27	24.25±0.24*	19.95±0.42	20.08±0.54	20.02±0.27	20.94±0.28	20.47±0.40	21.94±0.45
				$p_1 < 0.01$				

Table 4.
Indices of regenerator process in the skin homogenate at using of PRF-clot and Bioceruline

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2
RNA, mkg/mg	22.15±0.57	38.31±0.66*	26.41±0.57	31.90±0.53*	28.30±0.36	29.86±0.38	27.46±0.35	30.04±0.49*
				$p_1 < 0.01$		$p_2 < 0.05$		
DNA, mkg/mg	17.09±0.27	29.92±0.39*	19.95±0.42	26.31±0.32*	20.02±0.27	22.07±0.40*	20.47±0.40	20.62±0.64
				$p_1 < 0.01$		$p_2 < 0.05$		$p_3 < 0.05$

During analysis of changes in the activity of SOD after the surgical treatment of the neck cysts of the embryonic origin relative to the indicators of the intact group of patients, it was noted that the highest rates were found in

patients in the control group (after 3 months of observation, the reliable prevalence was 85.9%, after 6 months - by 35.4% and 9 months later - by 10.2%).

Table 5.
Indices of system of antioxidant protection in the skin homogenate at using PRF-clot

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1
SOD, CU.	119.43±4.86	104.60±3.54*	86.96±2.69	80.54±2.41	70.82±2.28	62.97±2.13*	62.97±2.13	59.10±1.42
				$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.001$		
SH-groups, mmol/kg	59.01±2.08	52.83± 2.02*	51.92±2.53	49.97± 2.02	49.98±2.25	47.35± 2.16	49.41±1.93	46.75±1.95

The lowest rates were observed in patients of group 2: after 3 months it was increased by 40.2%, after 6 months - by 12.8% and after 9 months - was not significantly different.

It was determined that the catalase activity after 3 months of observation was prevalence of this indicator by 39.4% ($p < 0.001$), after 6 months - by 12.3% ($p < 0.05$).

Table 6.
Indices of system of antioxidant protection in the skin homogenate at using of PRF-clot and Bioceruline

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2
SOD, CU.	119.43±4.86	90.07±2.57*	86.96±2.69	72.45±2.05*	70.82±2.28	60.43±1.52*	62.97±2.13	60.41±2.02
				$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.001$		
SH-groups, mmol/kg	59.01±2.08	49.48±1.76*	51.92±2.53	46.20±2.39	49.98±2.25	45.99±2.08	49.41±1.93	45.30±2.09

The dynamics of changes in the content of SH-groups was less pronounced in terms of the dynamics of enzymatic changes in the antioxidant defense system. In the control group, the prevalence of this indicator was 25.0% ($p < 0.01$) after 3 months of observation; in patients of the first and second groups, this indicator was not significantly different. The activity of elastase after 3 months of observation was fixed significantly lower by 30.9%, after 6 months - by 28.6%, and 9 months later - by 12.1%, relative to data of the third group. The activity of elastase

was not practically different in patients of the second and third groups, after 12 months of observation.

During the study of the dynamics of changes of indices of inflammation, microbial contamination and non-specific immunity, it was noted that the content of lysozyme varied during the observation period. Thus, in patients of group 1 after 6 months of observation this parameter was observed by 21.9% ($p < 0.001$) higher, relative to the data of the previous observation period, after 9 months - by 14.2% ($p < 0.01$), after 12 months - by 4.5%.

Table 7.

Indices of system of inflammation, microbial contamination and non-specific immunity in the skin homogenate at using of PRF-clot

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1	Control group	Group 1
Elastase, mccat/kg	15.94±0.54	13.58±3.54*	12.19±0.41	10.95±0.30*	9.56±0.36	9.42±0.20	8.89±0.24	8.46±0.30
				p ₁ <0.001		p ₂ <0.001		p ₃ <0.02
Urease, mccat/kg	0.32±0.02	0.22±0.02*	0.17±0.02	0.13±0.01	0.08±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02	0.05±0.01
				p ₁ <0.001		p ₂ <0.001		
lysozyme, U/kg	47.81±1.32	60.54± 1.90*	60.53±2.08	73.81± 2.35*	80.09±3.08	84.32± 2.45	90.22±2.60	88.11±2.85
				p ₁ <0.001		p ₂ <0.01		

It was found that the activity of the enzyme urease at patient of group 1 after 3 months of observation was significantly decreased by 31.2% relative to the control group, while in the 2nd group - significantly lower by

56.2%, after 6 months - by 52.9 %, and in 9 months - by 50.0%, relative to data of the third group. It had indicated the effectiveness of the proposed method of scar prophylaxis.

Table 8.

Indices of system of inflammation, microbial contamination and non-specific immunity in the skin homogenate at using of PRF-clot and Bioceruline

Indices	3 month		6 month		9 month		12 month	
	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2	Control group	Group 2
Elastase, mccat/kg	15.94±0.54	11.01±0.28	12.19±0.41	8.70±0.26*	9.56±0.36	8.40±0.22*	8.89±0.24	8.24±0.24
				p ₁ <0.001				
Urease, mccat/kg	0.32±0.02	0.14±0.01*	0.17±0.02	0.08±0.02*	0.08±0.01	0.04±0.01	0.07±0.02	0.04±0.01
				p ₁ <0.02				
lysozyme, U/kg	47.81±1.32	68.57± 2.05*	60.53±2.08	81.64± 2.66*	80.09±3.08	87.08± 2.72	90.22±2.60	91.69±3.08
				p ₁ <0.001				

Conclusions

The analysis of the obtained data suggested that the combined use of PRF-clot at the intraoperative stage of prophylaxis and ceruloplasmin at the post-operative one, in contrast to monotherapy with fibrin membranes, obtained from platelets-rich plasma had a better functional and aesthetic result, which significantly improved the quality of life of patients in the early and late postoperative periods.

References

1. Avetikov D.S. Kliniko-morfologichne obgruntuvannya kompleksnoho likuvannya patolohichnykh rubtsiv, shcho lokalizovani v dilyankakh holovy ta shyyi : monografiya / D.S. Avetikov, S.O. Stavtys'kyy. – Poltava, 2013. – 94 s.
2. Sovremennyy podkhod k khirurgicheskoyu lecheniyu i posleoperatsionnoy reabilitatsii patsiyentov s zhabernymi kistami shei / S.N. Grigorov, L.R. Krinichko, S.A. Stavitskiy, Ye.P. Lokes // Parinskiye chteniya 2016. Obespecheniye demograficheskoy bezopasnosti pri reshenii aktual'nykh voprosov khirurgicheskoy stomatologii i chelyustno-litsevoy khirurgii : sbornik trudov natsional'nogo kongressa s mezhdunarodnym uchastiyem. – Minsk, 2016. – S. 327–329.
3. Huang C. The link between hypertension and pathological scarring: does hypertension cause or promote keloid and hypertrophic scar pathogenesis? / C. Huang, R. Ogawa // Wound Repair Regen. – 2014. – Vol. 22. – P. 462–466.
4. Ogawa R. Endothelial dysfunction may play a key role in keloid and hypertrophic scar pathogenesis - Keloids and hypertrophic scars may be vascular disorders / R. Ogawa,

5. S. Akaishi // Med Hypotheses. – 2016. – Vol. 96. – P. 51-60.
5. A novel regulatory function for mir-29a in keloid fibrogenesis / G.Y. Zhang, L.C. Wu, T. Liao [et al.] // Clin Exp Dermatol – 2016. – Vol. 41. – P. 341-345.
6. Animal models of skin regeneration / B. Gawronska-Kozak, A. Grabowska, M. Kopcewicz, A. Kur // Reproductive Biology. – 2014. – Vol. 14. – P. 61–67.
7. Meshchysheh I. F. Metod vyznachennya oksylyuval'noyi modifikatsiyi bilkiv plazmy krovi / I. F. Meshchysheh // Bukovyns'kyy medychnyy visnyk. – 1998. – T. 2, № 1. – S. 156–158.
8. Chevare S. Rol' superoksidreduktazy v oksilitel'nykh protsessakh kletki i metod opredeleniya yeye v biologicheskoy materiyale / S. Chevare, I. Chaba, Y. Sekey // Lab. delo. – 1985. – № 11. – S. 678–681.
9. Moffat J. A. Investigations into the role of sulfhydryl groups in the mechanism of action of the nitrates / J. A. Moffat, P. W. Armstrong, G. S. Marks // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 1982. – Vol. 60, № 10. – P. 1261-1266.
10. Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skringiny pro-i prebiotikov: metod. rekomendatsii / A.P. Levitskiy, O.A. Makarenko, I.A. Selivanskaya [i dr.] – K.: GFTS MZU, 2007. – 22 s.
11. Levitskiy A.P. Metody opredeleniya aktivnosti elastazy i yeye ingibitorov: metod. rekomendatsii / A.P. Levitskiy, A.V. Stefanov – K. : GFTS, 2002. – 15 s.
12. Kamyshehnikov V.S. Spravochnik po kliniko-biokhimiicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike / V.S. Kamyshehnikov. – M. : MEDpress-inform. – 2004. – 911 s.

Матеріал надійшов до редакції 03.10.2018

© Лавренко А.В., Кайдашев И.П.
УДК:616-056.3:615.33]-036.22(477)

DOI <https://doi.org/10.31718/med.2018.22.3-4.02>

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ В-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ*

Лавренко А.В., Кайдашев И.П.

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

Данная работа является фрагментом НИР Украинской медицинской стоматологической академии «Изучение распространенности гиперчувствительности к β-лактамам среди населения Украины», номер госрегистрации 0116U004377.

Алергічні реакції до β-лактамних антибіотиків є найбільш частою причиною побічних медикаментозних реакцій, опосередкованих специфічними імунологічними механізмами. Метою даної роботи було визначення поширеності гіперчутливості до β-лактамних антибіотиків серед населення шляхом дослідження анамнестичних даних і проведення алергологічного обстеження для підвищення безпеки антибіотикотерапії і поліпшення фармакоекономічного профілю лікування.

Ключові слова: β-лактами, гіперчутливість, шкірні проби, медикаментозна алергія.

Медикаментозная аллергия – это патологическая реакция на лекарственные препараты, в основе которой лежат иммунологические механизмы [1, 2].

В настоящее время спектр применяемых β-лактамных антибиотиков изменился и бензилпенициллин больше не является самым распространенным представителем этой группы, его место заняли другие препараты. В Испании, Франции и США чаще назначаемым антибиотиком является ампициллин, чаще стали назначать цефалоспорины и эти препараты составляют главную причину аллергии [3].

Большинство пациентов с отягощенным аллергическим анамнезом на пенициллин или бета-лактамы антибиотики (БЛА), в 90% имеют ложный диагноз по поводу алергологической реакции на пенициллин в связи с тем, что смешение симптомов, связанных с болезнью пациента, завуалировано под аллергию [4].

Распространенность сообщаемой аллергии на пенициллин оценивается от 9 до 12%, а распространенность у госпитализированных пациентов может достигать до 15% [5-7]. Частота аллергических реакций на пенициллины варьирует от 0,7 до 10%, при этом частота анафилактических реакций составляет 0,015-0,004% [7].

В Украине на сегодняшний день отсутствует специальная система регистрации именно медикаментозной аллергии (МА), соответственно, отсутствует точная информация о количестве реакций гиперчувствительности к лекарственным средствам (ЛС), а также типов реакций и их последствий. Кроме того, отсутствуют данные об эффективности их лечения как на госпитальном, так и на амбулаторном этапе. Следует отметить, что в Украине также осуществляется и безрецептурный отпуск ЛС. При этом в последнее время привлекает внимание рост числа МА и в развитых странах мира.

Целью исследования явилось определение распространенности гиперчувствительности к β-лактамам антибиотикам среди населения путем исследования анамнестических данных и проведение

аллергологического обследования для повышения безопасности антибиотикотерапии и улучшения фармакоэкономического профиля лечения.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных в работе целей и задач в клиническое исследование были включены 81 женщина и 119 мужчин, которым проводили прик-тесты и внутрикожные пробы для определения распространенности гиперчувствительности к β-лактамам антибиотикам. Обследование проводилось на базе городской клинической больницы № 1 в период с 2016 по 2017 гг.

Перед началом исследования получено письменное согласие от пациентов на участие в научном исследовании и проведения манипуляций. Получено решение комиссии по биоэтике 1ГКБ (выписка из протокола № 17 от 04.02.2016 г.)

Для проведения прик-тестов использовали растворы со следующими концентрациями: бензилпенициллин натриевая соль 0,5 мг/мл, цефтриаксон 5 мг/мл, амоксициллин клавулонат 20 мг/мл. Второй этап диагностики проводили с помощью диагностических препаратов бензилпенициллоил поли- L – лизин (ППЛ), смесь малых детерминант пенициллина (СМД), клавулановой кислоты («DIATER», Испания).

Методика проведения прик-теста: на кожу внутренней поверхности предплечья наносится капля раствора гистамина (положительный контроль), вниз от нее – капля воды для инъекций (отрицательный контроль), еще ниже – раствор исследуемого аллергена (бензилпенициллин натриевая соль, цефтриаксон, амоксициллин клавулонат). После этого через капли проводится укол кожи специальным ланцетом. Результат реакции оценивают с помощью стандартных критериев. Положительной реакцией считают образование волдыря более 3 мм в диаметре с окружающей эритемой через 20 минут после проведения пробы (Romano A. Et al., 2005). Тестирование лекарственных препаратов требует оценки результатов прик-тестов и через 24 часа после проведения пробы.

* Цитирование при аттестации кадров: Лавренко А.В., Кайдашев И.П. Изучение распространенности гиперчувствительности β-лактамам антибиотикам среди населения Украины. // Проблемы экологии і медицини. – 2018. – Т. 22, № 1-2. – С. 7–10.

Методика проведения внутрикожной пробы: чтобы выполнить эту пробу, в кожу внутренней поверхности предплечья вводят раствор антибиотика внутрикожно. Результаты пробы оценивают через 20 минут. Положительной считается реакция, если диаметр образовавшегося элемента превышает 2 диаметра инъекционной папулы либо превышает на 3 мм диаметр инъекционной папулы. При оценке реакции через 24 часа и позже реакция считается положительной в случае развития инфильтрированного эритематозного элемента [3].

Результаты реакции фиксировали с помощью контура на прозрачную липкую ленту.

Результаты и их обсуждение

В процессе исследования обследованы 200 пациентов, проходивших лечение в стационаре терапевтического профиля. Возраст пациентов составил $56,2 \pm 3,6$ лет. Длительность основного заболевания $8,49 \pm 5,68$. Диагнозы больных формулировали согласно МКБ-10.

Структура основной заболеваемости включает: заболевания дыхательной системы – 6%, заболевания сердечно-сосудистой системы – 75,5%, заболевания желудочно-кишечного тракта – 10,5%, заболевания мочеполовой системы – 2%, заболевания опорно-двигательного аппарата – 3%, заболевания системы крови – 6% (рис. 1).



Рисунок 1. Структура основной заболеваемости пациентов обследованных на гиперчувствительность к β-лактамам.

Структура сопутствующих заболеваний включает: заболевания дыхательной системы – 3%, заболевания сердечно-сосудистой системы – 12,5%, заболевания желудочно-кишечного тракта – 35,5%, заболевания мочеполовой системы – 16,0%, заболевания эн-

докринной системы – 10,5%, заболевания опорно-двигательного аппарата – 1,5%, заболевания системы крови – 2,5% (рис. 2).

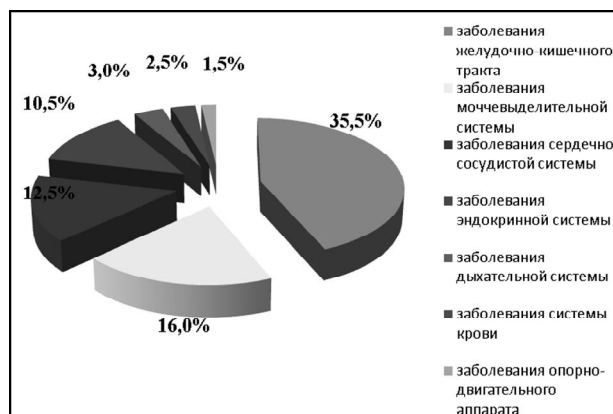


Рисунок 2. Структура сопутствующих заболеваний пациентов обследованных на гиперчувствительность к β-лактамам.

После проведения проб и сбора анамнеза был проведен анализ, выяснено, что из 200 больных положительный прик-тест был у 21 пациента. В таблице 1 представлены пациенты с детально собранным анамнезом и проведенными пробами. У 9 пациентов анамнез не отягощен, но при постановке прик-тестов было 2 пациента, у которых пробы на гистамин, воду, бензилпенициллин натриевую соль, цефтриаксон и амоксициллин клавулонат были положительными и поэтому внутрикожные пробы не проводились. У 7 пациентов на внутрикожные пробы отмечалась положительная проба: только на амоксициллин клавулонат – у 1 пациента, на бензилпенициллин натриевую соль и цефтриаксон – у 2 пациентов, только на бензилпенициллин натриевую соль – у 1 пациента, на бензилпенициллин натриевую соль, цефтриаксон и амоксициллин клавулонат – у 3 пациентов. У остальных 12 пациентов, из приведенной таблицы, был отягощенный аллергологический анамнез, при том, что практически все аллергики были разные. Анализируя данных пациентов отмечается 8 человек с отягощенным анамнезом, у которых были отрицательные прик-тесты и внутрикожные тесты. У 1 пациента отмечалась положительная проба на бензилпенициллин натриевую соль, цефтриаксон и амоксициллин клавулонат, у 2 пациентов – на цефтриаксон и у 1 пациента – на бензилпенициллин натриевую соль и цефтриаксон.

Результаты внутрикожных проб у пациентов обследованных на гиперчувствительность к β-лактамам

Таблица 1

Пациенты	Бензилпенициллин натриевая соль	Цефтриаксон	Амоксициллин клавулонат	Аллергологический анамнез
Пациент Н., 29 л.	–	–	+	–
Пациент Н., 65 л.	+	+	+	злаки, мед, пыль, пух, амброзия, глутаргин (аргинин глутамат), новокаин (прокаин гидрохлорид)
Пациент Л., 71 г.	+	+	–	–
Пациент П., 71 г.	+	+	–	–
Пациент С., 63 г.	–	–	–	ягоды шелковицы, витамин В12 (метилкобаламин), бисептол (сульфаметоксазол, триметоприм), тетрациклина гидрохлорид, диакардин ретард (дилтиазем гидрохлорид)
Пациент В., 61 г.	–	–	–	йод

Пациенты	Бензилпенициллин натриевая соль	Цефтриаксон	Амоксициллин клавулонат	Аллергологический анамнез
Пациент Х., 66 л.	–	–	–	амброзия
Пациент Т., 39 л.	–	–	–	витамины группы В12 (метилкобаламин), новокаин (прокаин гидрохлорид), трава шалфея
Пациент А., 44 г.	–	+	–	амброзия
Пациент С., 53 г.	+	+	–	бензилпенициллин натриевая соль, тетрациклина гидрохлорид
Пациент К., 34 г.	–	–	–	азитромицин
Пациент Г., 33 г.	–	–	–	ретарпен (бензатин бензилпенициллин)
Пациент Ч., 41 г.	–	–	–	положительный прик тест, в/к тест не проводили
Пациент Ш., 78 л.	+	–	–	–
Пациент Д., 66 л.	–	–	–	положительный прик тест, в/к тест не проводили
Пациент К., 59 л.	+	+	+	–
Пациент Б., 80 л.	+	+	+	–
Пациент С., 56 л.	+	+	+	–
Пациент Т., 23 г.	–	+	–	ринорея весной
Пациент С., 20 л.	–	–	–	Левифлоксацин гемигидрат
Пациент Я., 63 г.	–	–	–	Анальгин (метамизол)

Аллергические реакции на β-лактамы (беталактаммы) – является частой причиной побочных медикаментозных реакций, опосредованных специфическими иммунологическими механизмами [3].

При проведении кожных проб необходимо учитывать перекрестную реактивность. Кожные пробы часто выявляют перекрестную реактивность между беталактамными антибиотиками (пенициллины, цефалоспорины) [3].

Для иллюстрации приводим клинический случай: больной Т., 18 лет, студент медицинского вуза, поступил в пульмонологическое с жалобами на затруднение дыхания, отек слизистых оболочек губ, появление на коже одиночных высыпаний красного цвета, которые сопровождаются зудом и жжением, влажный кашель, повышение температуры тела до 39 °С, незначительную отдышку в покое, потливость, общую слабость.

Из анамнеза заболевания известно, что пациент лечил негоспитальную правостороннюю нижнедолевую пневмонию у семейного врача, после назначенного левофлоксацина 500 мг (1 таблетка) в течении 20 минут у пациента появились жалобы на затруднение дыхания, отек слизистых оболочек, появление на коже одиночных высыпаний красного цвета, которые сопровождаются зудом и жжением. Скорой медицинской помощью пациент доставлен в приемное отделение городской клинической больницы. Из анамнеза жизни известно, что в детстве болел ветрянкой. Аллергологический анамнез ранее не отягощен.

Данные объективного обследования: состояние больного средней степени тяжести. Кожные покровы лица, туловища, верхних и нижних конечностей покрыты макулопапулярной сыпью. Слизистые оболочки губ отечны. Периферические лимфоузлы не увеличены. Частота дыхания 20 в 1 минуту, при перкуссии притупление легочного звука справа в нижнем отделе, при аускультации справа крепитация, влажные хрипы справа. АД 120/80 мм рт.ст., пульс 90 ударов в 1 мин. Границы сердца в пределах возрастной нормы. Тоны сердца звучные, ритмичные. Язык обложен белым налетом. Живот при

пальпации мягкий, безболезненный. Симптом покачивания отрицательный с обеих сторон.

Данные анализа крови: эритроциты – $4,8 \times 10^{12}/л$, гемоглобин – 146 г/л, цветной показатель – 0,91, тромбоциты – $350 \times 10^9/л$, лейкоциты – $17,0 \times 10^9/л$, СОЭ – 12 мм/ч; лейкоцитарная формула: палочкоядерные лейкоциты – 10%, сегментоядерные лейкоциты – 74%, эозинофилы – 12%, лимфоциты – 14%, моноциты – 3%. ЭКГ: ЧСС – 90 в 1 минуту, ритм синусовый, электрическая ось сердца не отклонена. Рентген органов грудной клетки: в нижней доле справа локальное усиление, сгущение легочного рисунка. Заключение: правосторонняя нижнедолевая пневмония.

Из выше представленного можно поставить предварительный диагноз: негоспитальная правосторонняя нижнедолевая пневмония, клиническая группа III, дыхательная недостаточность 0. Реакция гиперчувствительности немедленного типа на левофлоксацин. Учитывая данную ситуацию, для подбора лечения антибиотиками, пациенту провели прик-тест и внутрикожные пробы со следующими препаратами: бензилпенициллин натриевая соль 0,5 мг/мл, цефтриаксон 5 мг/мл, амоксициллин клавулонат 20 мг/мл. Результаты проведенных тестов были отрицательными. Пациенту назначили эмпирическое лечение внегоспитальной пневмонии: цефтриаксон 1,0 г внутривенно капельно один раз в день 5 дней, азитромицин 500 мг, 1 таблетка 1 раз в день 3 дня.

Из-за сходства в структурах существует перекрестная реактивность между различными пенициллинами и даже между пенициллинами и цефалоспорины [8,9,10]. Общим в структуре является четырехчленное бета-лактамное кольцо, которое у пенициллинов сочленено с пятичленным тиазолидиновым кольцом, у цефалоспоринов с шестичленным дигидротиазининовым кольцом. Пенициллины имеют одну боковую цепь (R1), а цефалоспорины две (R1 и R2), при замене на R1 и R2 боковых цепей получают различные антибиотики. Эти изменения, хотя и незначительные, могут распознаваться иммунной системой как разные с соответствующими клиническими последствиями [11].

Выводы

1. Аллергия на β -лактамы, в частности, на пенициллин часто сообщается пациентами, но в большинстве случаев это не доказано. Поэтому пациентам у которых была аллергия на β -лактамы проводят прик тесты и внутрикожные пробы для подтверждения диагноза. В случае доказанной аллергии пациенту дают четкие рекомендации по использованию данной группы препаратов.

2. На сегодняшний день применение β -лактамовых антибиотиков, является безопасным так как имеет мало побочных эффектов, широкий спектр действия и низкую цену на курс лечения. Следует отметить, что врачи разных специальностей не обосновано забывают о этой группе препаратов.

3. В отличие от β -лактамовых антибиотиков, группа цефалоспоринов имеет высокие риски развития побочных эффектов, которые приводят к аллергическим реакциям. Примером является представленный клинический случай.

Литература

1. International Consensus on drug allergy / P. Demoly, N.F. Adkinson, K. Brockow [et al.] // *Allergy*. – 2014. – Vol. 69 (4). – P. 420-37.
2. Gruchalla R.S. Clinical practice. Antibiotic allergy / R.S. Gruchalla, M. Pirmohamed // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354 (6). – P. 601-609.
3. Кайдашев И.П. Гиперчувствительность к лекарственным препаратам. Руководство для врачей. – Киев: Медкнига, 2016. – 288 с.
4. Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology; Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. Drug allergy: an updated practice parameter // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2010. – Vol. 105(4). – P. 259-273.
5. Treatment of patients with a history of penicillin allergy in a large tertiary-care academic hospital / M. Picard, P. Bégin, H. Bouchard [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* – 2013. – Vol. 1 (3). – P. 252-257. doi:10.1016/j.jaip.2013.01.006.
6. Impact of a clinical guideline for prescribing antibiotics to inpatients reporting penicillin or cephalosporin allergy / K.G. Blumenthal, E.S. Shenoy, C.A. Varughese [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2015. – Vol. 115 (4). – P. 294-300. doi: 10.1016/j.anai.2015.05.011.
7. Ahlstedt S. Penicillin allergy. Can the incidence be reduced? / S. Ahlstedt // *Allergy*. – 1984. – Vol. 39. – P. 151-164.
8. Immunologic response to different determinants of benzylpenicillin, amoxicillin, and ampicillin. Comparison between urticaria and anaphylactic shock / M.J. Torres, C. Mayorga, R. Pamies [et al.] // *Allergy*. – 1999. – Vol. 54 (9). – P. 936-943.
9. Studies of the specificities of IgE antibodies found in sera from subjects with allergic reactions to penicillins / F. Moreno, M. Blanca, C. Mayorga [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1995. – Vol. 108 (1). – P. 74-81.
10. Systemic reactions during skin tests with betalactams: a risk factor analysis / H.B. Co Minh, P.J. Bousquet, C. Fontaine [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 117 (2). – P. 466-468.
11. New aspects of allergic reactions to betalactams. Cross-reactions and unique specificities / M. Blanca, J.M. Vega, J. García [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. – 1994. – Vol. 24 (5). – P. 407-415.

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2018.22.3-4.03>

ENGLISH VERSION: THE STUDY OF PREVALENCE OF HYPERSENSITIVITY TO B-LACTAM ANTIBIOTICS AMONG THE POPULATION OF UKRAINE*

Lavrenko A.V., Kaidashev I.P.

Ukrainian Medical Stomatological Academy

This article is a part of research project of Ukrainian Medical Stomatological Academy "The Study of the Prevalence of Hypersensitivity to β -Lactam Antibiotics among the Ukrainian Population", state registration No. 0116U004377.

Allergic reactions to β -lactam antibiotics are the most common cause of adverse drug reactions, mediated by specific immunological mechanisms. The aim of this research was to determine the prevalence of hypersensitivity to β -lactam antibiotics among the population, by examining anamnestic data and conducting allergological examination to increase the safety of antibiotic therapy and improve the pharmaco-economic profile of treatment.

Key words: β -lactams, hypersensitivity, skin tests, drug allergy.

Drug allergy is a pathological reaction to medications, based on immunological mechanisms [1, 2]. At present, the range of applied β -lactam antibiotics has changed and benzylpenicillin is no longer the most common representative agent of this group: other drugs have taken its place. In Spain, France and the United States, ampicillin and cephalosporins are currently more often prescribed, and these drugs are the main cause of allergy [3].

Most patients with the allergic history of penicillin or β -lactam antibiotics (BLAs) are misdiagnosed in 90% about the allergic reaction to penicillin, due to the fact that symptoms, associated with the patient's disease, are obscured as allergy [4].

The prevalence of reported allergy to penicillin is estimated at 9 to 12% [5,6]. Meanwhile, its prevalence in hospitalized patients can reach up to 15% [7]. The frequency of allergic reactions to penicillins varies from 0.7 to 10%, with the frequency of anaphylactic reactions ranging from 0.015 to 0.004% [7].

In Ukraine, today there is no special system for registering the drug allergy (DA), and accordingly there is no precise information on the number of hypersensitivity reactions to medications, as well as the types of reactions and their consequences. In addition, there is no evidence on the effectiveness of their treatment at both in- and out-patient stages. It should be noted that in Ukraine, the over-the-counter drug sale is also implemented. At the same time, the increase in the number of DA has lately attracted attention in the developed countries as well.

The aim of the research was to determine the prevalence of hypersensitivity to β -lactam antibiotics among the population by studying the anamnestic data and conducting allergic examination to improve the safety of antibiotic therapy and enhance the pharmaco-economic profile of treatment.

Materials and methods

In order to achieve aim of the research, 81 women and 119 men were enrolled in a clinical study. The examined patients underwent prick and intradermal tests to determine the prevalence of hypersensitivity to β -lactam antibiotics. The study was conducted on the basis of the city clinical hospital over the period from 2016 to 2017.

Prior to the launch of the study, written consent was obtained from each patient for participation in scientific research and carrying out procedures. The decision of the commission on bioethics of city clinical hospital No.1 was

also obtained (abstract of minutes No. 17 as of 02.04.2016).

To conduct prick tests, we used solutions with the following concentrations: benzylpenicillin sodium salt 0.5 mg / ml, ceftriaxone 5 mg / ml, amoxicillin clavulonate 20 mg / ml. The second stage of the diagnostics was carried out with the help of diagnostic preparations benzylpenicilloyl poly-L-lysine (PPL), a mixture of minor determinants of penicillin (SMD), clavulanic acid (DIATER, Spain).

The prick test procedure was conducted as follows: a drop of histamine solution (positive control) is applied to the skin of the inner surface of the forearm, underneath – a drop of water for injections (negative control), downwards – the solution of the studied allergen (benzylpenicillin sodium salt, ceftriaxone, amoxicillin clavulonate). After that, the skin is pierced through the drop with a special lancet. The result of the reaction is evaluated using standard criteria. The formation of a blister more than 3 mm in diameter with the surrounding erythema 20 minutes after the test is regarded as a positive reaction (Romano A. Et al., 2005). In addition, testing the drugs requires to assess the results of prick tests 24 hours after the test.

The intradermal test was conducted as follows: the antibiotic solution is injected intracutaneously into the skin of the inner surface of the forearm. The results are assessed in 20 minutes. The reaction is considered positive if the diameter of the formed element exceeds 2 diameters of the injection papule or exceeds the diameter of the injection papule by 3 mm. When evaluating the reaction after 24 hours and later, the reaction is considered positive if an infiltrated erythematous element develops [3].

The reaction results were registered with a contour on a transparent adhesive tape.

Results and discussion

In the course of the study, we 200 examined patients who were treated at the hospital of a therapeutic profile. The patients' age was 56.2 ± 3.6 years. The duration of the underlying disease is 8.49 ± 5.68 . Patients were diagnosed according to ICD-10.

The structure of the basic morbidity includes: diseases of the respiratory system – 6%, diseases of the cardiovascular system – 75.5%, diseases of the gastrointestinal tract – 10.5%, diseases of the urogenital system – 2%, diseases of the musculoskeletal system – 3%, diseases of the blood system – 6% (Fig. 1).

* To cite this English version: A.V. Lavrenko, I.P. Kaidashev. The Study of Prevalence of Hypersensitivity to β -Lactam Antibiotics among the Population of Ukraine // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2018. - Vol 22, № 3-4. - P. 11-13.

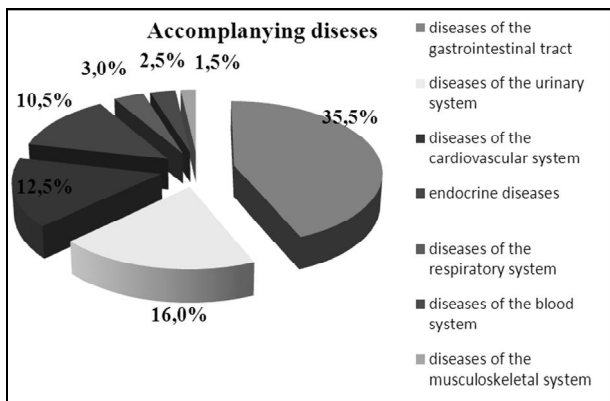


Figure 1. The structure of the basic morbidity of patients examined for hypersensitivity to β -lactams

The structure of concomitant diseases includes: diseases of the respiratory system – 3%, diseases of the cardiovascular system – 12.5%, diseases of the gastrointestinal tract – 35.5%, diseases of the urogenital system – 16%, diseases of the endocrine system – 10.5%, diseases of the musculoskeletal system – 1.5%, diseases of the blood system – 2.5% (Fig. 2).

After conducting the tests and collecting the history, we analyzed the obtained data. We found that out of 200 patients, 21 patients had a positive prick test. The table given below demonstrates the data on patients with a detailed history and tests results. In 9 patients, the anamnesis was not aggravated, but in conducting the tests there were 2 patients in whom the tests for histamine, water, benzylpenicillin sodium salt, ceftriaxone and amoxicillin clavulonate were positive and therefore no

intradermal tests were performed. In 7 patients, a positive intradermal test was observed only for amoxicillin clavulonate in 1 patient, for benzylpenicillin sodium salt and ceftriaxone – in 2 patients, only for benzylpenicillin sodium salt – in 1 patient, for benzylpenicillin sodium salt, ceftriaxone and amoxicillin clavulonate – in 3 patients.

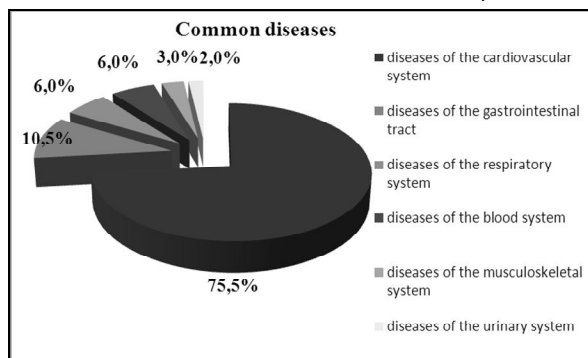


Figure 2. The structure of concomitant diseases in patients examined for hypersensitivity to β -lactams

The remaining 12 patients from the table had an aggravated allergic history, despite the fact that almost all allergens were different. Analyzing the data of the, 8 people with an aggravated anamnesis who had negative prick tests and intradermal tests were observed. 1 patient had a positive test for benzylpenicillin sodium salt, ceftriaxone and amoxicillin clavulonate, 2 patients – for ceftriaxone, and 1 patient – for benzylpenicillin sodium salt and ceftriaxone.

Table 1
The results of intradermal tests in patients examined for hypersensitivity to β -lactams

Patients	Benzylpenicillin sodium salt	Ceftriaxone	Amoxicillin clavulonate	Allergic history
Patient N., age: 29	–	–	+	–
Patient N., age: 65	+	+	+	cereals, honey, dust, fluff, ambrosia, arginine glutamate, Novocaine (procaine hydrochloride)
Patient L., age: 71	+	+	–	–
Patient P., age: 71	+	+	–	–
Patient S., age: 63	–	–	–	mulberries, vitamin B12 (methylcobalamin), Biseptol (sulfamethoxazole, trimethoprim), tetracycline hydrochloride, diacardine retard (diltiazem hydrochloride).
Patient V., age: 61	–	–	–	iodine
Patient Kh., age: 66	–	–	–	ambrosia
Patient T., age: 39	–	–	–	B12 group vitamins (methylcobalamin), Novocaine (procaine hydrochloride), sage grass
Patient A., age: 44	–	+	–	ambrosia
Patient S., age: 53	+	+	–	Benzylpenicillin sodium salt, tetracycline hydrochloride
Patient K., age: 34	–	–	–	azithromycin
Patient G., age: 33	–	–	–	Retarpen (benzathine benzylpenicillin)
Patient Ch., age: 41	–	–	–	positive prick test, intradermal test was not conducted
Patient Sh., age: 78	+	–	–	–
Patient D., age: 66	–	–	–	positive prick test, intradermal test was not conducted
Patient K., age: 59	+	+	+	–
Patient B., age: 80	+	+	+	–
Patient S., age: 56	+	+	+	–
Patient T., age: 23	–	+	–	spring rhinorrhea
Patient S., age: 20	–	–	–	Levofloxacin hemihydrate
Patient Ya., age: 63	–	–	–	Analgin (metamizole)

Allergic reactions to β -lactam antibiotics (β -lactams) are a common cause of adverse drug reactions, mediated by specific immunological mechanisms [3].

When conducting skin tests, it is necessary to consider cross-reactivity. Skin tests often demonstrate cross-reactivity between β -lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins) [3].

The following clinical case report will illustrate this tendency: Patient T., aged 18, a medical student, was admitted to the pulmonology department with complaints of breathing difficulty, swelling of the mucous membranes of the lips, the appearance on the skin of single red lesions that were accompanied by itching and burning, productive cough, fever up to 39°C, slight shortness of breath at rest, sweating, general weakness.

From the anamnesis of the disease, it is known that the patient had community-acquired right-sided lower lobe pneumonia, which was treated by the family doctor. After administering the prescribed levofloxacin, 500 mg (1 tablet), in 20 minutes the patient started to complain of breathing difficulty, swelling of the mucous membranes, the appearance of single red eruptions on the skin, which were accompanied by itching and burning. The ambulance service took the patient to the emergency room of the city clinical hospital.

From the anamnesis of life, it is known that he had chickenpox as a child. Allergic history has not been previously aggravated.

Data of the objective examination: the patient's condition of moderate severity. The skin of the face, trunk, upper and lower extremities are covered with maculopapular rash. The labial mucosa is swollen. Peripheral lymph nodes are not enlarged.

Respiratory rate is 20 per 1 min., on percussion: dullness of the pulmonary sound on the right in the lower part, on auscultation: crepitus on the right, moist rales on the right.

Blood pressure: 120/80 mm Hg, pulse: 90 beats per 1 min; borders of the heart are within the age norm. Heart sounds are loud, rhythmic.

The tongue is covered with white coating. Abdomen on palpation is soft, painless. Costovertebral angle tenderness symptom is negative on both sides.

Blood test data: RBC – $4.8 \times 10^{12} / l$, hemoglobin – 146 g / l, color index – 0.91, platelets – $350 \times 10^9 / l$, WBC – $17.0 \times 10^9 / l$, ESR – 12 mm / h, WBC count: stab – 10%, segmented – 74%, eosinophils – 12%, lymphocytes – 14% monocytes – 3%. ECG: HR – 90 per 1 min., sinus rhythm. Electrical axis of heart is not deviated. X-ray of thoracic organs: local amplification, thickening of the pulmonary pattern in the lower lobe on the right. Conclusion: right-sided lower lobe pneumonia.

From the above presented, it is possible to make a preliminary diagnosis: community-acquired right-sided lower lobe pneumonia, grade III, RF 0. Immediate-type hypersensitivity reaction to levofloxacin. Considering this situation, for the selection of antibiotic treatment, the patient underwent the prick and intradermal tests with the following drugs: benzylpenicillin sodium salt 0.5 mg / ml, ceftriaxone 5 mg / ml, amoxicillin clavulonate 20 mg / ml. The results of the tests were negative. The patient was prescribed empirical treatment of community-acquired pneumonia: ceftriaxone 1.0 intravenously, in dropper once a day for 5 days, azithromycin 500 mg, 1 tablet once a day for 3 days.

Due to the similarity in the structures, there is cross-reactivity between different penicillins and even between penicillins and cephalosporins [8, 9, 10]. A common feature in the structure is a four-membered β -lactam ring, which is articulated with a five-membered thiazolidine

ring in penicillins and a six-membered dihydrothiazine ring in cephalosporins. Penicillins have one side chain (R1), whereas cephalosporins – two (R1 and R2). When R1 and R2 of the side chains are replaced, different antibiotics are obtained. These changes, although minor, can be recognized by the immune system as different ones with the corresponding clinical consequences [11].

Conclusions:

1. Allergy to β -lactams, in particular, to penicillin, is often reported by patients, but in most cases this has not been proven. Therefore, patients who have been allergic to β -lactams are given prick tests and intradermal tests to confirm the diagnosis. In case of proven allergy, the patient is provided with precise recommendations on the use of this group of drugs.

2. To date, the use of β -lactam antibiotics is safe because it has few side effects, a wide spectrum of action and a low price for a course of treatment. It should be noted that doctors of different specialties unreasonably ignore this group of drugs.

3. Unlike β -lactam antibiotics, the group of cephalosporins has high risks of side effects that lead to allergic reactions. The presented clinical case report is an example of this tendency.

References

1. International Consensus on drug allergy / P. Demoly, N.F. Adkinson, K. Brockow [et al.] // *Allergy*. – 2014. – Vol. 69 (4). – P. 420-37.
2. Gruchalla R.S. Clinical practice. Antibiotic allergy / R.S. Gruchalla, M. Pirmohamed // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354 (6). – P. 601-609.
3. Kaidashev IP. Giperchuvstvitel'nost' k lekarstvennym preparatam. Rukovodstvo dlya vrachej [Hypersensitivity to drugs. A guide for doctors]. Kiev: Medkniga; 2016. 288 s.].
4. Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology; Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. Drug allergy: an updated practice parameter // *Ann Allergy Asthma Immunol.* – 2010. – Vol. 105(4). – P. 259-273.
5. Treatment of patients with a history of penicillin allergy in a large tertiary-care academic hospital / M. Picard, P. Bégin, H. Bouchard [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* – 2013. – Vol. 1 (3). – P. 252-257. doi:10.1016/j.jaip.2013.01.006.
6. Impact of a clinical guideline for prescribing antibiotics to inpatients reporting penicillin or cephalosporin allergy / K.G. Blumenthal, E.S. Shenoy, C.A. Varughese [et al.] // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2015. – Vol. 115 (4). – P. 294-300. doi: 10.1016/j.anai.2015.05.011.
7. Ahlstedt S. Penicillin allergy. Can the incidence be reduced? / S. Ahlstedt // *Allergy*. – 1984. – Vol. 39. – P. 151-164.
8. Immunologic response to different determinants of benzylpenicillin, amoxicillin, and ampicillin. Comparison between urticaria and anaphylactic shock / M.J. Torres, C. Mayorga, R. Pamies [et al.] // *Allergy*. – 1999. – Vol. 54 (9). – P. 936-943.
9. Studies of the specificities of IgE antibodies found in sera from subjects with allergic reactions to penicillins / F. Moreno, M. Blanca, C. Mayorga [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1995. – Vol. 108 (1). – P. 74-81.
10. Systemic reactions during skin tests with betalactams: a risk factor analysis / H.B. Co Minh, P.J. Bousquet, C. Fontaine [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 117 (2). – P. 466-468.
11. New aspects of allergic reactions to betalactams. Cross-reactions and unique specificities / M. Blanca, J.M. Vega, J. García [et al.] // *Clin. Exp. Allergy*. – 1994. – Vol. 24 (5). – P. 407-415.

Матеріал надійшов до редакції 01.10.2018

© Nedoborenko V.M., Shlykova O.A., Izmailova O.V., Ishcheikin K.E., Kaidashev I.P.
УДК 616.155.194-056.5-055.2

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2018.22.3-4.04>

SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE IN FEMALE PATIENTS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA AND OBESE WOMEN DOES NOT DIFFER IN THE EXPRESSION OF IKBA*

Nedoborenko V.M., Shlykova O.A., Izmailova O.V., Ishcheikin K.E., Kaidashev I.P.

Ukrainian Medical Stomatological Academy

Prerequisites and objective: Abdominal obesity is a common metabolic disease characterized by excessive accumulation of white adipose tissue, with excessive production of inflammatory mediators that activate transcriptional nuclear factors, in particular the nuclear factor kB. Hecpudin is the main hormone in the systemic regulation of iron. Its expression increases with elevated level of pro-inflammatory cytokines, as a result of which the concentration of iron in the blood plasma decreases, which reliably results in the activation of NF-kB. Therefore, the aim of the research was to determine the level of expression of IKβa in subcutaneous adipose tissue in iron deficiency anemia concurrent with obesity. Methods: The study included 40 female women. Hemogram parameters, parameters of iron metabolism (serum iron, ferritin, hepcidin, total iron binding ability of serum, saturation of transferrin by iron) in serum and level of expression of the IkBa gene in subcutaneous adipose tissue were evaluated. Research results. The examined women had an average age of 40.3 ± 7.59 years. In the distribution of patients due to the cause and degree of severity of IDA, there was no reliable difference between the groups. The control group consisted of 10 obese women without IDA. Expression of IkBa by subcutaneous adipose tissue in female patients with IDA with and without obesity compared with the control group did not display a significant difference between the groups (p <0.05). In the course of correlation analysis, the expression of IkBa by subcutaneous adipose tissue to BMI, iron and hemogram rates did not have a correlated significance. Conclusion. Subcutaneous adipose tissue in women with iron deficiency anemia with and without obesity compared with obese women has no difference in expression of IkBa.

Key words: IkBa expressions, obesity, anemia.

Ожиріння органів черевної порожнини - це загальне метаболічне захворювання, що характеризується надмірним накопиченням білої жирової тканини, з надмірним виробництвом медіаторів запалення, які активують транскрипційні ядерні фактори, зокрема ядерний фактор kB. Гепсидин є основним гормоном системної регуляції заліза. Його експресія зростає з підвищенням рівнем прозапальних цитокінів, внаслідок чого концентрація заліза у плазмі крові знижується, що надійно призводить до активації NF-kB. Тому метою дослідження було визначення рівня експресії ІКβa в підшкірній жировій тканині при залізодефіцитній анемії, що супроводжується ожирінням. Дослідження включало 40 жінок. Оцінювали параметри гемограми, параметри метаболізму заліза (сироваткове залізо, феритин, гепсидин, загальна залізов'язувальна здатність сироватки, насичення трансферину залізом) в сироватці та рівень експресії гену ІkBa в підшкірній жировій тканині. Опитані жінки мали середній вік 40,3 ± 7,59 років. У розподілі пацієнтів через причину та ступінь тяжкості залізодефіцитної анемії була відсутня достовірна різниця між групами. Контрольну групу склали 10 пацієнтів із ожирінням, які не мали залізодефіцитної анемії. Експресія ІkBa підшкірною жировою тканиною у пацієнтів з залізодефіцитною анемією з ожирінням та без нього порівняно з контрольною групою не відрізнялася значною різницею між групами (p <0,05). У ході кореляційного аналізу експресія ІkBa підшкірною жировою тканиною до показників залізодефіцитної анемії, заліза та гемограми не мала корельованого значення. Підшкірна жирова тканина у жінок з дефіцитом заліза з і без ожиріння в порівнянні з жінками з ожирінням не має різниці в експресії ІkBa.

Ключові слова: експресія ІkBa, ожиріння, анемія.

Introduction

Abdominal obesity is a common metabolic disease characterized by excessive accumulation of white adipose tissue.

Subcutaneous adipose tissue is infiltrated by numerous immune cells, primarily macrophages, which account for up to 40% of all fatty tissue cells [1] and are the main source of inflammatory mediators in the fatty tissues of humans and animals. Pro-inflammatory cytokines affect the intracellular pathways regulating inflammation by activating transcriptional nuclear factors, in particular the nuclear factor kB (NF-kB), which is the most important pro-nuclear nuclear transcription factor that corresponds to most of the external and internal stimuli and provokes inflammation by activating or sup-

pressing the transcription of numerous genes involved in the inflammatory reaction [2].

Iron plays an important role in immunological surveillance due to its stimulating and differentiating properties on the immune system. Excessive concentration of iron in macrophages reduced the level of phagocytosis, respiratory burst and cytokine expression – the effects that are probably mediated by iron toxicity. On the other hand, in non-toxic concentrations, iron contributes to the differentiation of macrophages, and treatment with iron chelators inhibits the expression of NF-KB activated by lipopolysaccharides, tumor necrosis factor-α and interleukin-6 [3]. The addition of ionized iron to the macrophage culture of the liver caused activation of IKK (a complex that is a critical point of this signaling pathway) [4], which con-

* To cite this English version: V.M. Nedoborenko, O.A. Shlykova, O.V. Izmailova, K.E. Ishcheikin, I.P. Kaidashev. Subcutaneous adipose tissue in female patients with iron deficiency anemia and obese women does not differ in the expression of IkBa // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2018. - Vol 22, № 3-4. - P. 14-17.

firmed the role of iron as an independent agonist and potential signaling molecule for activating IKK [3].

Hepcidin is the main hormone in the systemic regulation of iron. Hepcidin is a negative regulatory hormone, whose expression increased with elevated level of pro-inflammatory cytokines and iron. The mechanism of exposure to hepcidin was detected in binding with ferroportin, which led to its internalization and degradation [5]. As a result, the content of circulating iron level was reduced and the suppression of its export from macrophages was intensified by the same mechanism that reliably resulted in the activation of NF- κ B.

However, at present there are no data demonstrating the relationship between iron, hepcidin and NF- κ B human adipose tissue in vivo. The activation of NF- κ B may be evidenced by changes in the expression of its inhibitor, I κ B α [6], therefore, the aim of our study was to determine the level of expression of I κ B α in subcutaneous adipose tissue in iron deficiency anemia concurrent with obesity.

Materials and methods

The study was conducted after authorization by the Bioethics Commission of Ukrainian Medical Stomatological Academy, and all the examined subjects voluntarily signed the informed consent.

A total of 40 female patients with iron deficiency anemia (IDA) (30 women with concomitant obesity and 10 without obesity) were examined. They were treated at the out-patient department of the City clinical hospital in Poltava from March 2016 to January 2017. The control group consisted of 10 obese women without IDA.

The inclusion criteria were the presence of iron deficiency anemia based on: hemoglobin level (Hb) \leq 120 g/L for women, signs of microcytosis and anemia (Mean Corpuscular Volume (MCV) \leq 80 fl, Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) \leq 27, 5 pg, Mean Corpuscular Hemoglobin

Concentration (MCHC) \leq 335 g/L, in the presence of serum iron level (SI) $<$ 11.5 μ mol/L, total serum iron binding capacity (TSIBC) $>$ 72 μ mol/L, saturation of transferrin with iron (NTZ) $<$ 15% and ferritin level \leq 12 ng/ml in serum.

The blood parameters were determined using the BC 3000 Plus Mindray, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., China.

Determination of iron level in serum and total serum iron binding capacity was carried out with sets of reagents of SpinLab Ltd, Ukraine. Saturation of transferrin with iron was determined by the method of calculating the content of the SI / TSIBC * 100%.

The level of ferritin (LLC «Alkor-Bio», Russian Federation), hepcidin (Peninsula Laboratories, LLC, USA) in blood serum was determined by the method of immunoassay analysis.

The level of expression of the I κ B α gene was determined in the subcutaneous fat using the real-time PCR method. The material was obtained by thin-layer aspiration puncture biopsy, samples were stored at -70°C until RNA extraction. The total RNA was isolated from the biological specimen using a set of "RIBO-sol-V reagents" (AmpliSens, Russia). To obtain cDNA, a set of reagents was used for the reverse transcription reaction (SYNTOL, Russia). The reaction mixture contained: 10 x reverse transcriptase buffer, 5 mM deoxynucleotide triphosphate, 15 U / ml oligo primer (dT) 15, 50 units/ μ l of inverse mRNA-RT transcriptase, 5 units/ μ l RNase inhibitor, 1-2 μ g total RNA, and deionizing water free of RNase. Determination of the expression of the I κ B α gene was carried out in real time using a DT-Light detecting amplifier ("DNA-Technology", Russia) in the reaction mixture. As a reference gene, the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) gene was used. For data analysis, a relative Ct method was used with the calculation of the formula: 2 $^{-\Delta$ Ct.

Table 1. Primers for determining the expression of the I κ B α gene [7]

Gene	Sequence of primers
I κ B α	F: 5' - GGC TGA AGA AGG AGC GGC TA - 3' R: 5' - CCA TCT GCT CGT ACT CCT CG -3'
GAPDH	F: 5' - GGC CTC CAA GGA GTA AGA CC - 3' R: 5' - AGG GGA GAT TCA GTG TGG TG - 3'

Furthermore, all patients were evaluated for the level of total protein, total bilirubin, ALT, AST, creatinine, endoscopic and X-ray examination of the gastrointestinal tract, to exclude ulcerative and inflammatory diseases at the time of the study.

For all patients, the examination included measurements of anthropometric indicators: height, body weight, waist and hip circumference, body mass index (BMI). The index was calculated as the ratio of body weight in kilograms (kg) to the square of height in meters (m²). Adult obesity was established according to the WHO definition based on (BMI) \geq 30 kg / m².

The distribution of adipose tissue is determined by the coefficient of the waist circumference / hip circumference (WC / HC). The value of WC / HC in women $>$ 0.85 indicated the abdominal type of obesity.

The study excluded patients who at the time of the study had been taking iron preparations during the last 3 months, non-steroidal anti-inflammatory drugs more than 3 times a week during the last 6 months, patient with conditions of significant bleeding over the past 6 months, oncopathology, autoimmune diseases, acute and chronic diseases that can lead to tissue hypoxia, chronic renal

failure, chronic liver disease with hepatocellular insufficiency, vegetarianism, pregnancy and lactation.

The static processing of the obtained data was performed using the software package SPSS 17.0. The reliability of the discrepancies (p) of the anthropometric data and hematological parameters was evaluated by the one-way analysis of variance for independent groups (ANOVA). Relationships in groups were evaluated using Pearson correlation analysis. For all types of analysis, statistically significant differences were considered at p $<$ 0.05.

Results

The examined women had an average age of 40.3 \pm 7.59 years. In the distribution of patients due to the cause and degree of severity of IDA, there was no reliable difference between the groups.

In the analysis of anthropometric data of women, the group with IDA and obesity had statistically higher BMI compared to the group with IDA and without obesity (p $<$ 0.05) and had no statistically significant differences compared with the control group (p $>$ 0.05). The analysis of the ratio of WC / HC revealed that all the examined patients in this group had an abdominal type of adipose tissue deposit.

Table 2. Indices of hemogram and iron metabolism parameters in women with IDA with and without obesity (M ± SD)

Indicator, unit of measurement	Group with IDA and obesity, (n = 30)	Group with IDA and without obesity, (n = 10)	Control group, (n = 10)
Erythrocytes, 10 ⁹ /l	3.98 ± 0.26 ^{aa}	4.0 ± 0.2 ^{aa}	4.3 ± 0.2 ^a
Hb, g/l	90.4 ± 10.3 ^a	91.6 ± 8.65 ^a	129 ± 3.8 ^b
MCV, fl	71.6 ± 5.1 ^a	72.0 ± 4.8 ^a	88.4 ± 4.6 ^b
MCHC, g/l	316.6 ± 19.42 ^{aa}	316.3 ± 15.8 ^{aa}	338.9 ± 6.0 ^b
MCH, g/l	22.6 ± 1.95 ^a	22.7 ± 1.83 ^a	29.9 ± 1.3 ^b
Fe ³⁺ , μmol/l	5.6 ± 2.38 ^a	7.3 ± 1.4 ^a	15.3 ± 2.34 ^b
TSIBC, μmol/l	74.5 ± 2.0 ^a	73.8 ± 1.3 ^a	61.0 ± 4.96 ^b
STI, %	7.7 ± 3.30 ^a	9.8 ± 2.0 ^a	25.0 ± 2.5 ^b
Ferritin, ng/ml	4.7 ± 2.68 ^a	3.5 ± 2.93 ^a	29.7 ± 10.8 ^b
Hepcidin, ng/ml	16.6 ± 11.9 ^a	25.4 ± 8.6 ^b	14.4 ± 12.0 ^a

Note: aa, bb = no significant difference between the groups (p > 0.05); ab, ba = significant difference between groups (p < 0.05).

Indicators of Hb, MCV, MCHC, MCH, SI, STI and ferritin in the groups of women with IDA without and with obesity were significantly lower (p < 0.05) compared with the control group and did not differ significantly between these parameters (p > 0.05). On the contrary, TSIBC in the groups of women with IDA without and with obesity was significantly higher (p < 0.05) compared with the control group and had a significant difference (p > 0.05) (Table 1).

Hepcidin in the serum was higher in women with IDA without obesity (p < 0.05) compared to women with obesity and control group who did not have significant differences (p > 0.05) (Table 1).

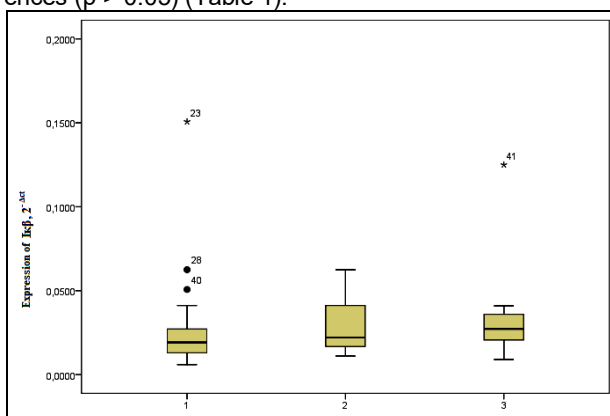


Figure 1. Expression of Ikbα, 2-Δct in female patients with IDA and obesity - (1), IDA without obesity - (2) and control group (3).

Expression of Ikbα subcutaneous adipose tissue in female patients in IDA with and without obesity compared with the control group did not have a significant difference between the groups (p < 0.05) (Fig. 1).

In the course of correlation analysis, the expression of Ikbα by subcutaneous adipose tissue to BMI, iron metabolism and hemogram rates did not have a correlated reliable significance.

Discussion

Our study showed the condition of iron metabolism, namely its deficiency, in absolute (true) IDA (Hb, MCV, MCHC, MCH) [8] using a rather wide range of indicators of its metabolism (SI, STI, TSIBC, ferritin and hepcidin) [9]. As is evident, there was no statistically significant difference between the hemogram parameters and the markers of iron homeostasis among the study groups, except for the hepcidin, which had a higher level in the group with IDA without obesity (25.4 ± 8.6 ng/ml), as compared with the group of IDA with obesity and control group (16.6 ± 11.9 ng/ml and 14.4 ± 12.0 ng/ml, re-

spectively), but still within the range of reference value. This fact may be explained by the presence of a significant degree of obesity for increased hepcidin and inflammatory markers, as established by Cheng et al. and Karl et al. [10, 11].

NF-κB is a transcription factor, which is the most important pro-inflammatory nuclear transcription factor, one of the key regulators of immunity, stress reactions, apoptosis and cell differentiation. Its activation is observed under the influence of numerous stimuli, both intracellular and extracellular ones [12]. Intracellular free iron was involved in a number of these stimuli activation [13].

Our study was based on two reliable facts: the first one – obesity has been studied in recent years as a condition of chronic low-intensity inflammation with excessive production of inflammatory mediators, in particular IL-6 and CRP [14], followed by activation in the expression of the hepcidin gene [15], which leads to the accumulation of iron trace element in macrophages and according to Shigang Xiong et al. [16], iron acts as a pro-inflammatory effector molecule by selective induction of intracellular signaling for NF-κB; the second one – IDA is the final degree of iron deficiency, characterized by both external and intracellular decrease in iron concentration, and according to previous studies with chelated iron, the reduction of free intracellular iron generally inhibits the activation of NF-κB [17].

However, despite these assumptions, our results show that the expression of Ikbα by subcutaneous adipose tissue in female patients in IDA with and without obesity, as well as obese women do not display a significant difference between groups (0.26 ± 0.2-2 Δct, 0.3 ± 0.1-2 Δct, 0.35 ± 0.3-2 Δct, respectively).

In addition, no significant correlations were found between expression of the Ikbα gene, BMI, iron metabolism, and morphology of erythrocytes.

This study is the first attempt to describe the expression of Ikbα by subcutaneous adipose tissue in female patients in IDA as compared with women only with obesity in vivo. However, it is well understood that adipose tissue is not homogeneous [18]. Therefore, despite the reported data that Ikbα has no significant difference between the study groups in women, we cannot rule out the possibility that visceral adipose tissue has no effect on the regulation of systemic or localized iron metabolism. Moreover, subcutaneous adipose tissue may have a protective effect in many pathological conditions.

Conclusion. Subcutaneous adipose tissue in female patients with iron deficiency anemia with and without obesity has no difference in expression of Ikbα as compared with obese women.

References

1. Lee, B-C, & Lee, J. Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-induced Insulin Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1842(3): 446–462.
2. Kaidashev IP. Nf-kb-signalizatsiya kak osnova razvitiya sistemnogo vospaleniya, insulinorezistentnosti, lipotoksichnosti, sakharnogo diabeta 2-go tipa i ateroskleroza. *Mezhdunarodnyy endokrinologicheskiy zhurnal*. 2011; 3 (35): 35-45.
3. Xiong S, She H, Takeuchi H. Signaling Role of Intracellular Iron in NF-κB Activation. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 17646-17654.
4. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NFκappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2009; 1(4): 28 - 34
5. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004; 306: 2090–2093.
6. Tak PP, Firestein GS. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107(1):7-11.
7. Zhou C, Tabb MM, Nelson EL, et al. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-κB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(8): 2280-2289.
8. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha ÁF. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *Journal of Clinical Pathology* 2011; 64: 287-296.
9. Camaschella C. Iron-Deficiency Anemia. *N Engl J Med*. 2015; 372:1832-1843.
10. Cheng HL, Bryant CE, Rooney KB et al. Iron, hepcidin and inflammatory status of young healthy overweight and obese women in Australia. *PLoS One*. 2013; 8(7):e68675.
11. Karl JP, Lieberman HR, Cable SJ et al. Poor iron status is not associated with overweight or overfat in non-obese pre-menopausal women. *J Am Coll Nutr*. 2009; 28(1): 37–42.
12. Kaïdashev IP. NF-κB activation as a molecular basis of pathological process by metabolic syndrome. *Fiziol Zh*. 2012; 58(1):93-101. Review. Ukrainian.
13. Wang L, Cherayil BJ. Ironing Out the Wrinkles in Host Defense: Interactions between Iron Homeostasis and Innate Immunity. *Journal of Innate Immunity*. 2009;1(5):455-464.
14. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83:461-465
15. Bekri S., Gual P. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH / Soumeya Bekri, // *Gastroenterology*. 2006; 131: 788-796.
16. Xiong S, She H, Tsukamoto H. Signaling role of iron in NF-kappa B activation in hepatic macrophages. *Comparative Hepatology*. 2004; 3(Suppl 1):S36.
17. She H, Xiong S, Lin M, Zandi E, Giulivi C, Tsukamoto H: Iron activates NF-B in Kupffer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283:G719–G726.
18. Smith S. R., Lovejoy J. C., Greenway F. et al., Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism*. 2001; 50(4): 425–435.

Матеріал надійшов до редакції 04.09.2018

СОЦІАЛЬНІ АСПЕКТИ

© Morokhovets H. Yu., Lysanets Yu. V.
UDC 378.147:577

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2018.22.3-4.05>

METHODS OF EFFECTIVE TEACHING BIOINFORMATICS IN MEDICAL ACADEMIC SETTING*

Morokhovets H. Yu., Lysanets Yu. V.

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

Вища медична освіта є вимогою сучасності, що потребує переосмислення методів і форм навчання, а також принципів та підходів згідно із сучасними досягненнями науки і техніки. Пріоритетний напрям трансформації вищої медичної освіти – підготовка компетентних фахівців, спроможних відповідати на виклики часу, готових до самовдосконалення та постійного розвитку. Підготовка фахівців на третьому освітньо-науковому рівні вищої освіти сьогодні потребує форм та методів навчання, спрямованих на практичне використання отриманих знань.

Key words: біоінформатика, діяльнісний метод, метод задач, метод кейсів, медична освіта.

Higher medical education is a prerequisite of the present, requiring re-consideration of teaching methods and forms, as well as principles and approaches in accordance with the latest advances in science and technology. The priority direction in the transformation of higher medical education is training the competent specialists, capable of responding to the challenges of time, ready for self-improvement and continuous development. Training of specialists at the third educational and scientific level of higher education today requires forms and methods of training, aimed at the practical use of the knowledge gained.

Key words: bioinformatics, activity method, task method, case study, medical education.

The analysis of recent studies and publications on this problem has shown that the didactic foundations of the development and implementation of innovative pedagogical technologies are reflected in various fields in the research works of leading Ukrainian scientists: M. Zhal-dak, Y. Mashbytsia, N. Morze, Yu. Atamanchuk [1], R. Horbatiuk [4], R. Hurevych [5]. Special attention of researchers is attracted to the issue of application of computer technology in the process of training [4, 5, 10, 11]. The main achievements of bioinformatics, pharmacogenetics are described in detail in the works by I. Kaidashev [6, 7]. The problem of teaching bioinformatics at the third educational and scientific level requires an updated approach and a scientific substantiation of pedagogical conditions that would ensure the effectiveness of the educational process.

Our analysis of the studies by the domestic scientists gives grounds to assert that the didactic basis of teaching for postgraduate students is not sufficiently reflected in the scientific literature, and the level of methodological provision of teaching the disciplines of general scientific and research cycles at the third educational and scientific level of higher education is not adequately developed and needs further study of the fundamental aspects in its

implementation.

The aim of the research is to highlight the main advantages of using teaching methods, differentiated by the level of independent mental activity, when teaching bioinformatics at the third educational and scientific level of higher education.

The subject "Bioinformatics" is a component of the educational and scientific program of training specialists for the third level of higher education in the field of training 22 – Healthcare (specialties 091 – Biology, 221 – Dentistry, 222 – Medicine) at Ukrainian Medical Stomatological Academy, consisting of lectures and practical lessons, which deals with specific problems on experimental biology and the approaches, methods, techniques for their solution by modern methods, provided by specialized computers.

Didactic principles, updated by the modern tendencies of the information society, should change the vector of action from the reproductive mastering of a large amount of theoretical knowledge to the ability to apply it in everyday life and professional activities. Today, not only knowledge, but also the awareness of where and how to apply it, becomes necessary, in addition, any data lose their significance over time [2].

* To cite this English version: H. Yu. Morokhovets, Yu. V. Lysanets. Methods of effective teaching bioinformatics in medical academic setting. // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2018. - Vol 22, № 3-4. - P. 18-21.

The current issue is the search, interpretation and creation of new data, that is, the focus on the outcome of the activity. Didactic principles of higher education should be aimed at linking the theory with practice and science, the availability of scientific knowledge, the combination of individual knowledge with the ability to work in the team. For medical students at the third educational and scientific level, important elements of the didactic system are activity, consciousness and autonomy in education. One of the most effective methods of training to implement this goal is the activity approach. Activity oriented learning involves mastering skills, first of all, their new types: educational, research, design, creative, and others. As a result, actual knowledge will be the result of working on tasks combined into an effective methodological system. And when choosing tasks, it is necessary to take into account that when solving a learning problem, the subject of education independently formulates the problem, finds the algorithm for its solution, solves and tests the correctness of this decision. Thus, the permanent resolution of such educational tasks is transformed into a systematic independent search activity.

For example, task 1: Study the following biological sequence databases:
 MSNITIYDVAREANVSMATVSRVNGNPNVKPTRRKKV
 LEAIERLGYRPNVAVARGLASKKTTTVGVIIPISSIFYSEL
 ARGIEDIATMYKYNILSNSDQNMEKELHLLNTMLGKQV
 DGIVFMGGNITDEHVAEFKRSPVPIVLAASVEEQEETPS
 VAIDYEQAIYDAVKLLVDKGHTDIAFVSGPMAEPINRSK
 KLQGYKRALEEANLQFNEQFVAEGDYTYDSGLEALQHL
 MSLDKKPTAILSATDEMAGIHAHQDQGLSIPEDLDIIGF
 DNTRLMLMVRPQLSTVQPTYDIGAVAMRLLTKLM-
 NKEPVEEHIVELPHRIELRKSTKS in the databases
 GenBank and Protein Data Bank. Analyze the results. Find how the second amino acid chain is encoded in the text of saved PDB format sequence (using the UCSF Chimera software). In the JalView editor, save the resulting sequences in one FASTA file.

To accomplish the task, the following algorithm must be performed:

- 1) to search GenBank, you need to find the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). On this website you need to find BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - a resource for finding local alignment) [3];
- 2) go for a search on the protein base (protein blast),
- 3) find the amino acid sequence from the indicated letters in the base;
- 4) copy the set of letters into the search bar and press the BLAST button;
- 5) evaluate and save the result; obtain detailed information on the sequence;
- 6) go to the Protein Data Bank database at [www.pdb.org.](http://www.pdb.org/);
- 7) enter the identifier in the search string, get the sequence information;
- 8) evaluate the received sequence, scroll the three-dimensional structure of the model in the browser, using the 3D View function, select models that are similar in amino acid sequence or structure, etc.;
- 9) open the UCSF Chimera window at <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>;
- 10) choose File / Fetch by ID, enter the sequence code;
- 11) evaluate the obtained model;
- 12) determine which sequence of amino acids the model corresponds to (in the Tools / Sequence / Sequence menu);

13) save the result through the File / Save PDB function.

The step-by-step use and complication of such tasks will, in our opinion, contribute to the formation of necessary skills and practical orientation of learning.

Forms of organization of educational activities for implementation of the activity approach are traditional: lectures, practical classes, self-directed and individual work [4, 11]. Hence, for individual work, we offer task 2 for analysis, synthesis, structuring of information: Create a library of articles on the topic of your research in Google Scholar. In the international Scopus database, find the h-index of scientists you quote in your research and analyze their work.

Performing such type of tasks forms the ability to think critically and determine the reliability of the information that can be used for further scientific research. Increasing the complexity of the tasks performed will contribute to the formation of work experience and increase the level of the formation of computer literacy in general [9, 12].

To study certain topics of the subject, we used the method of tasks, the essence of which is the teacher's organizing the process of mastering knowledge through structuring the educational material in the form of a sequence of tasks that have a certain logical connection with each other. The PhD student, following this chain from one task to another, is included in the active process of self-mastery of knowledge. The list of tasks is quite extensive: tasks based on a clear algorithm; tasks requiring changes to the basic algorithm and simple mental activity; tasks in the reproduction of real situations that require a solution (research problems of increased complexity). Objectives based on a clear algorithm ensure the integrity of the mastering the corresponding actions. Correctly mastered and automated actions on the basis of algorithms, allow to form appropriate skills and abilities to successfully solve non-standard tasks [8]. When studying the topic "Alignment of biological sequences" the teacher needs to use special software tools to explain the principles of this process. In our opinion, this problem is the most effectively implemented through the appropriate actions. To explain the principles of the ClustalW and MUSCLE programs, we use the dot matrix principle. Alignment of closely related sequences is a rather simple task and can be produced by visual analysis. The purpose of the tasks based on the algorithm in this case is to ensure the integrity of mastering the relevant actions [3].

For example, task 3: Using the matrix principle, align the two sequences 1: FTFTALILLAVAV and 2: FTFTALITLAVTV.

Action algorithm:

- 1) two aligned sequences are written as a row and column of the table;
- 2) all identical nucleotides (or amino acids) are marked with dots in the corresponding cells of the table;
- 3) dots are combined in a line.
- 4) further – in the event that two sequences are identical, the dots will be in each cell on the diagonal of the table. If two sequences have substitutions but do not have spaces, then the dots will be in most cells on the diagonal of the table; if in the analyzed sequences there is a gap, then the diagonal is shifted vertically or horizontally.

Task 4: Based on the Nidman-Wunsha algorithm, align the two sequences 1: FTFTALILLAVAV and 2: FTFTALITLAVTV.

Action algorithm:

1) the aligned sequences are written as the first row and the first column of the matrix table;

2) cells with identical amino acids are assigned a value of 1, and cells with different amino acids;

3) determine the maximum possible sum of numbers in all cells at all possible steps through the matrix top-down down from left to right;

4) starting from the upper left cell for each next cell of the matrix the maximum possible estimate is determined, as if the aligned sequences ended in this position. For this, the maximum number of the column row from the top to the left of this cell is added to the initial number of the cell (0 or 1).

Next we offer to use the ClustalW and MUSCLE programs to align the biological sequences.

Task 5: Use the ClustalW program to align two biological sequences.

Action algorithm:

1) enter the web server browser web page <http://www.ebi.ac.uk/services>;

2) select the DNA & RNA block (genes, genomes & variation) and go to the page containing the programs of this block;

3) select ClustalW2 and go to the page with the window of the program;

4) for the amino acid sequences select the option Protein, and for the nucleotide – DNA;

5) insert a set of sequences in the window;

6) with the help of the Alignment option, select the type of alignment: slow or rapid;

7) using the option of DNA weight Matrix, select a matrix replacement, Gap Open – a penalty for the beginning of the break, End Gaps – a penalty for the end of the gap, Gap Extension – a penalty for the length of the gap;

8) click “Submit”.

We gradually complicate the task and suggest solving the previous task using the MUSCLE program with the following options:

1. Output Format – it selects the format for the file containing the result of multiple alignment;

2. Output Tree – it determines whether a tree will be displayed; if so, after which iteration.

3. Output Order – it defines the order in which the sequences will appear in the final alignment.

As a result of this type of assignment, post-graduate students memorize the techniques of search operations for their correct execution on a sample basis.

As a modern means of studying at a higher educational institution, the method of case study is actively used, the main purpose of which is to create such a situation by the teacher, when PhD students themselves have to make a decision.

Case is an event that actually took place in a certain area of activity and is the basis for discussion. When using the case, the participants are given a preliminary opportunity to get acquainted with the list of circumstances underlying which are real or imaginary situations. The description of this situation simultaneously covers not only a certain practical problem, but also actualizes a certain complex of knowledge that must be mastered during its solution. There are the following variants of application of the method:

- diagnostics of the problem;

- diagnostics of one or several problems and participants' workout of ways of their solution;

- assessment by participants of existing actions regarding the solution of the problem and its consequences.

In each of the following options, the learning process is carried out by the teacher's providing information in the form of a problem or a series of problems. This information can be presented in a documentary, pre-prepared form or by means of verbal and visual means (slides or video materials). Upon completion of the exercise, PhD students offer their work, which can be the basis for the discussion.

Preparation for a class using a case method should be consistent with a number of methodological conditions, in particular:

- the situation should be adapted to the knowledge that the teacher plans to update;

- presentation of information must be logical, consistent with detail, and information itself must contain a problem that PhD students may encounter in their professional activities;

- the problem solved by the teacher should have several options (this circumstance is especially important for large groups);

- information can be provided by hand-out material or multimedia presentations, video presentations, etc.

- for discuss the audience needs to familiarize with the material;

- it is necessary to choose the optimal homework, which will include a review of additional literature and information from Internet resources, etc.

For example, during the study of the topic “Genome Sequencing”, PhD students are suggested to study the issue of synthesis of peptide analogues and their biological activity.

We have divided the study of this issue into the following stages:

1) individual study of the problem under consideration (extra-curricular activities) with the help of the proposed list of sources, including articles in medical journals, Internet resources, information from the textbook;

2) classroom discussion of the method of a phased study of a solid mixture with the subsequent study of individual fractions, which is an accepted method for the separation of peptide mixtures;

3) discussion of the impossibility to use this method for separation of certain mixtures;

4) discussion of the essence of the alternative method for the separation of peptide mixtures proposed by Falk and Rotzschke in 1991 [6, 7];

5) division of the audience into groups;

6) discussing the advantages and disadvantages of each method;

7) general discussion, evaluation of the results of work.

This method of teaching may be an element of individual consultation, a credit test, when PhD students are asked to explain individual questions. The results of the method is necessarily analyzed by the teacher.

Conclusions. In the educational process at the third educational and scientific level of higher education in teaching the subjects of general scientific and research cycles, it is feasible to use tasks aimed at using knowledge in practice and real life situations, the content of which is presented in a non-standard form and requires the analysis of data or their interpretation, the formulation of conclusions or the consequences of various changes.

References

1. Atamanchuk YU. M. Osoblyvosti orhanizatsiyi samostiyanoi roboty studentiv v informatsiyno-navchal'nomu seredovyshchi universytetu / YU. M. Atamanchuk // Visnyk Cherkas'koho universytetu. – Seriya : Pedagogichni nauky. – Vyp. 126. – Cherkasy : CHNU im. Bohdana Khmel'nyts'koho, 2008. – S. 7-13.
2. Asherov A. T., Lohvinenko V. H. Metody i modeli otsinky pedagogichnoho vplyvu na rozvytok piznaval'noyi samostiynosti studentiv / Ukrayins'ka inzhenerno-pedagogichna akademiya. — KH. : UIPA, 2005. – 164s.
3. Vasyleva N. YU. Byoinformatyka. Mnozhestvennoe vyravnyvanye. Fylohenetycheskye derev'ya: metodycheskoe posobyе / N. YU. Vasyleva. – Odessa: «Odesskyy natsionalnyy unyversytet ymeny Y. Y. Mechnykova», 2014. – 70 s.
4. Horbatiuk R. M. Profesiyna pidhotovka maybutnikh fakhivtsiv u haluzi komp'yuternykh tekhnolohiy / R. M. Horbatiuk // Aktual'ni problemy derzhavnoho upravlinnya, pedagogiky ta psykholohiyi // Zbirnyk naukovykh prats. – Vyp. 1(10). – Kherson, 2014. – S.74–77.
5. Hurevych R. S. Informatsiyno-komunikatsiyi tekhnolohiyi v profesiyniy osviti / R. S. Hurevych, M. YU. Kademiya, M. M. Kozyar; za red. chlen-kor. NAPN Ukrayiny Hurevycha R. S., –2012. – 506 s.
6. Kaydashev I. P. Vlyyanye otdel'nykh peptydnykh fraktsyy, vydelenykh yz razlychnykh orhanov, y ymmunorehulyatornoe deystvye peptydnoho ékstrakta pochek / I. P. Kaydashev // Byopolymery y kletka. – 1995. T. 11. – № 5. – s. 61-75.
7. Kaydashev I. P. Évoluyutsyonyrovanye y sovremennoe sostoyanye farmakohentycheskykh yssledovanyy (chast' I) / I. P. Kaydashev, O. A. Shlykova, O. V. Izmaylova // Problemy ékolohyy y medytsyny. – Poltava.- 2010. - №5-6. –S. 3-12.
8. Morokhovets' H. YU., Sayenko M. S., Lysanets' YU. V., Silkova O. V. Vykorystannya systemy komp'yuternoyi matematyky Maple u navchanni medychniy i biolohichniy fizytsi. // Problemy ekolohiyi i medytsyny. – 2 01 8. – T. 2, No 1-2. – S. 60 – 62.
9. Morokhovets H.Yu.; Lysanets' Y. V. Developing the professional competence of future doctors in the instructional setting of higher medical educational institutions. Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960), 2017, 70.1: 101-104.
10. 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.
11. Morokhovets H. Yu. Using multimedia technologies in the teaching process of higher medical educational institutions / H. Yu. Morokhovets, Yu. V. Lysanets // Pedagogy and Psychology. – Almaty, 2017. – 1 (30). – P. 108–113.
12. 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://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13256-017-1247-x>

Матеріал надійшов до редакції 04.10.2018

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Bagmut I.Yu., Kolisnyk I.L., Titkova A.V., Rezenenko Yu.K.,* Boiagina O.D. *
UDK [616.36:611.018.1]-099

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2018.22.3-4.06>

THE DEVELOPMENT OF MEMBRANOUS PATHOLOGY OF HEPATOCYTES THE INFLUENCE OF INTOXICATION*

Bagmut I.Yu., 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 study was performed at the Department of Clinical Pathophysiology, Topographical Anatomy and Operative Surgery at Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education as a part of research project "Radiotoxins' pathochemical mechanisms and methods of early diagnostics and correction", state registration No. 0117U000589.

We studied the subtoxic effect of small doses of sodium fluoride on the activity of microsomal hepatocytes on 30 Wistar rats' populations in subacute experiment. The intensity of lipid peroxidation (LPO) in liver of rats which were administered sodium fluoride orally for a long time at doses of 1/10 and 1/100 LD₅₀, was evaluated by the content of its molecular products - diene conjugates (DC), and MDA-reagents Schiff bases. We found that oral administration of sodium fluoride to rats at doses of 1/10 and 1/100 LD₅₀ promotes a statistically significant increase ($r \leq 0,002$) relative to the control group of animals in DC content during the entire period of observation. At a dose 1/10 LD₅₀ we observed the most significant increase in this indicator on the 10th day of the experiment - at 265%, and at a dose 1/100 LD₅₀ - on the 20th day an average of 234%. In rats' liver by the action of subtoxic dose of sodium fluoride at a dose of 1/10 LD₅₀, starting from the 20th day, we detected a gradual increase ($r \leq 0,001$) of TBA-reagents relative to control - for 27, 41, 78, 133%. Secondary end products and lipid peroxidation, which are defined under the long-term of sodium fluoride, somehow contribute to the disruption of the microstructure of hepatocytes membranes, their permeability, reduce their division, regeneration and inhibition of mitochondrial respiratory chain enzymes and microsomal monoxygenase system.

Keywords: free radical processes, lipid peroxidation, sodium fluoride, liver of rats.

На 30 щурах популяції Вістар досліджено в підгострому досліді дію малих субтоксичних доз фториду натрію на активність мікросом гепатоцитів. Про інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у печінці щурів, яким тривалий час перорально вводили фторид натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀, судили за вмістом молекулярних продуктів – дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-реактантів і шифових основ. З'ясовано, що пероральне введення щурам фториду натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀ сприяє статистично значимому ($p \leq 0,002$) по відношенню до контрольної групи тварин підвищенню вмісту дієнових кон'югатів у всі терміни спостереження. У випадку дози 1/10 LD₅₀ найбільш суттєвим збільшення цього показника спостерігалось на 10-ту добу експерименту – на 265 %, а у випадку дози 1/100 LD₅₀ – на 20-ту добу в середньому на 234 %. У печінці щурів, при дії субтоксичних дох фториду натрію – в дозі 1/10 LD₅₀, починаючи з 20-ї доби, чітко визначалося поступове підвищення ($p \leq 0,001$) рівня ТБК-реактантів по відношенню до контролю – на 27, 41, 78, 133 %. Вторинні та кінцеві продукти ПОЛ, що виявляються при тривалій дії фториду натрію, так чи інакше сприятимуть порушенню мікроструктури мембран гепатоцитів, їх проникності, зниженню їх ділення та регенерації, а також пригніченню активності ферментів мітохондріального дихального ланцюга та мікросомальної монооксигеназної системи.

Ключові слова: вільно радикальні процеси, перекисне окислення ліпідів, фторид натрію, печінка щурів

Introduction

The main biological role of fluoride and its compounds consists in bone formation, formation of dentin, enamel, preventing the development of senile osteoporosis. High concentrations of fluoride stimulate lipid peroxidation and inhibit antioxidant defense system. It belongs to the elements of the first class of danger - especially hazardous

chemicals. Prolonged excessive intake of fluoride compounds in the composition of the body can cause pathological condition - fluorosis. Despite the significant content of fluoride in different tissues of the human body, its physiological role so far has not been clarified.

The processes of free radical oxidation constitute an important part of nonspecific metabolic component of adaptation to the effects of stress factors, including chemi-

* To cite this English version: Bagmut I.Yu., Kolisnyk I.L., Titkova A.V., Rezenenko Yu.K. Boiagina O.D The development of membranous pathology under the influence of intoxication. // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 3-4. - P. 22-24.

cal origin. Evidence of this position is confirmed by the nature of radical systems, especially on electron transport chain of endoplasmic reticulum and mitochondria. Adaptive adjustment of the oxygen metabolism due, for example, to stress, xenobiotics biotransformation accompanied usually by certain shifts in the mode of formation of free radical intermediates [1,2,3].

The aim of this study is to investigate the state of free radical processes and lipid peroxidation in the liver of rats with chronic fluoride intoxication.

Material and methods

Studies were conducted on mature rats of Wistar line weighing 180-220 g, which were kept at hospital vivarium. Rats were subjected to oral seed 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 were under 20 mg/kg, 2 mg/kg and 0.2 mg/kg body weight (FS average lethal dose for rats received orally, is 200 mg/kg). The animals in the control group were injected with appropriate amounts of drinking water. Research conducted indices 10, 20, 30, 50 and 60 days after the start of the experiment. Each group had 10 animals. Rats were euthanized by decapitation with guillotine knife, pre-anesthetized with thiopental sodium 50 mg/kg.

The content of diene conjugates in rats' liver homogenate was evaluated by spectrophotometer at 233 nm with pre-extraction with heptane izopropanol mixture [2,3,4]. The content of diene conjugates was calculated based on the molar extinction coefficient $\epsilon=2,2 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The content of TBA-reagents in rats' liver homogenate was determined by reaction between malondialdehyde and tiobarbiturats acid (TBA), which at high temperature and acidic environment is to form try-metynes colored complex with maximum absorption at a wavelength of 532 nm [5]. Number of TBA-calculated reagents was based on the molar extinction coefficient $\epsilon=1,56 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The level of Schiff bases - products of interaction of carbonyl compounds and amins groups of proteins, amino acids, nucleic acids - was measured in the liver homogenate by spectrofluorometer at a wave length of 360 nm, excitation and emission - wave length of 430 nm from the previous extraction by Folcha mixture (chloroform-methanol) [6].

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

Results and discussion

The level of free radical processes in the liver of rats, which during the 60 days were administered in doses of FS 1/10 and 1/100 LD₅₀ was evaluated in the intensity of H₂O₂-induced chemiluminescence (CL). On the 10th and 20th day of the experiment, we observed a statistically significant increase ($p<0.001$) relative to the control rate of case of FS action at a dose 1/10 LD₅₀, respectively, 37 and 134%. On the 30th day we registered a slight decrease (37%) of CL intensity in relation to the value of the previous observation period, but compared to control - increase ($p<0.001$) by 66%. It is necessary to point out that on the 60th day of oral administration of FS to rats at doses 1/10 LD₅₀ there was a statistically significant ($p<0.001$) reduction of 33% of CL intensity in the liver of rats as compared with control. Action of FS at a dose 1/100 LD₅₀ was accompanied by a rather significant increase ($r\leq 0.002$) when compared to control intensity su-

perweak glow in all periods of observation, especially pronounced in the 30th day - an average of 85%. In terms of level of intensity, following chemiluminescence in the liver of rats it gradually decreased and on the 60th day of FS administration it was 19%.

It is proved that any disruption of dynamic equilibrium between pro- and antioxidants in many pathological conditions is displayed on CL intensity biological substrates [4,5]. Thus, the increase in intensity of rat liver homogenate CL for actions in the UNFPA doses of 1/10 and 1/100 LD₅₀ can be explained by a shift prooxidant-antioxidant balance toward increased formation of pro-oxidant, including the AFC. However, recently the scientists have widely discussed the involvement of ROS in signal transduction from the receptors to the cell nucleus and ROS regulation being dependent on redox signaling system [6, 7, 8].

The peculiarity of the latter is a property of ROS to cause the expression of genes, the products of which have antioxidant activity, which leads to increased buffer capacity and restoring redox homeostasis. However, the continued generation of abnormally large amounts of ROS can cause persistent changes in signal transduction and gene expression, impaired redox balance of the cells of oxidative stress, apoptosis and dysregulation as a consequence of pathological conditions.

One should emphasize the fact that a large number of ROS acts as inducers of oxidative damage to macromolecules basic cell, primarily proteins, in disruption of their functional activity [9]. Changing any component of redox homeostasis leading to its imbalance of compensatory reactions on the local level, which probably arises under conditions of FS effects on rats showed increased intensity and refrigerator. The prevalence of nonspecific oxidative stress in cells entails the use of energy substrates and proteins are important to balance the redox system. Depending on the length of oxidative stress and antioxidant system functional reserves depletion occurring in reparation and adaptation of the organism, which is probably on the 60th day of oral dose of FS 1/10 LD₅₀ and is confirmed by a reduction in the intensity of CL homogenate in rats' liver.

The intensity of LPO in liver of rats which were administered FS orally for a long time at doses 1/10 and 1/100 LD₅₀, was evaluated by the content of its molecular products - diene conjugates (DC), TBA-reagents and Schiff bases. The results showed that oral administration to rats in doses of FS 1/10 and 1/100 LD₅₀ promotes statistically significant ($r\leq 0.002$) relative to the control group of animals increase in GC content during the entire monitoring period. If the dose was 1/10 LD₅₀, the most significant increase in this indicator was observed on the 10th day of the experiment - at 265%, and if the dose was 1/100 LD₅₀ on the 20th day - an average of 234%. In the liver of rats FS toxification was also increasing the content of TBA-reagents. On the 10th day of the experiment, there was an increase when compared with the value in control was unreliable for both doses ($p=0.059$ and $p=0.199$). If the dose 1/10 LD₅₀, starting from the 20th day, clearly defined gradual increase ($r\leq 0.001$) of TBA-reagents relative to control - for 27, 41, 78, 133%. Similar dynamics was characterized by change and action to FS in a dose 1/100 LD₅₀ - an increase of TBA-reagents was 19, 73, 70 and 99%, respectively, on the 20th, 30th, 50th and 60th day of observation. On the 10th and 20th day of FS action at doses 1/10 and 1/100 LD₅₀ when compared to control statistically significant changes in the content of

the end products of lipid peroxidation – Schiff bases were observed. The results showed a significant gradual increase ($p < 0.001$) of this indicator on the 30th, 50th and 60th day - 172, 370 and 380% respectively. A similar, but less pronounced dynamics was found to 1/100 the dose LD_{50} - 103, 173 and 169%.

In general, the results obtained reflect the initiation of LPO process that can be regarded as a mechanism response on organism rats on long-term effect of FS. Dynamics of LPO products content has a certain dependence on the term of the FS. In the initial stages (10 and 20 days) oral doses of FS 1/10 and 1/100 LD_{50} recorded a marked increase in primary products of lipid peroxidation - DK, indicating the initial activation process. DK is the most volatile products of lipid peroxidation, increase of their level usually reflects the significant impact of the intensity of the pro-oxidant, such as ROS [10,11].

The logical consequence of activation of lipid peroxidation in the liver of rats under FS action is to increase secondary products - TBA-reagents (especially since the 30th day), indicating a more intense and deep course of the process. But in rat liver, beginning with the 50th day, FS LPO activation is more pronounced at the formation of end products – Schiff bases, which are regarded as indicators of chronic processes of free radical oxidation. Secondary end products and lipid peroxidation, which are under long-term FS somehow contribute to the disruption of the microstructure of hepatocytes membranes their permeability, reduce their division, regeneration and inhibition of mitochondrial respiratory chain enzymes and microsomal monooxygenase system [12-15].

To confirm the orientation of the dynamics of lipid peroxidation in rats under conditions of prolonged exposure to doses of FS 1/10 and 1/100 LD_{50} calculated the ratio Schiff bases/(DC+TBA-reagents). It proved statistically significant ($r \leq 0.016$) relative to control reduction coefficient of 10 and 20 th day dose in steps UNFPA 1/10 LD_{50} respectively 63 and 59%, while 30, 50 and 60th day, on the contrary, increased respectively by 16, 92 and 120%. In oral administration at a dose of FS 1/100 LD_{50} value ratio decreased on the 10th, 20th and 30th day of the experiment (respectively 69, 70 and 11%) and on the 50th and 60th day – increased to 17 and 32% relative to control values.

Conclusion. The observed increase in the coefficient of correlation Schiff bases/(dienes+TBA-reagents) in the liver under the action of UNFPA clearly indicates the direction of LPO towards the formation of toxic end products – Schiff bases and reduce the activation of POL at the formation of primary and secondary products.

References

1. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK, Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview: IJPSR, 2010, Vol. 13: P. 185-192.
2. Meyerson FS. Adaptation Medicine: Mechanisms and Protective effects of adaptation - M.: Hypoxia Medical, 1993. – 331p.
3. Dubinina Ye. Ye. Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidaniye i razrusheniye). Fiziologicheskkiye i kliniko-biokhimicheskkiye aspekty / Ye. Ye. Dubinina. – SPb.: Meditsinskaya pressa, 2006. – 400 s.
4. Orehovych VN, Modern methods in biochemistry. - M., Medicine, 1977. - 371 p.
5. Zakaryan A.Ye. Razlichnyye metody khemilyuminescentnogo analiza v otsenke urovnya svobodnoradikal'nogo perekisnogo okisleniya lipoproteinov syvorotki krovi cheloveka pri razvitiy patologicheskikh protsessov v organizme / A. Ye. Zakaryan, Z. A. Zakaryan, A. A. Trchunyan // DNAN Armenii. – 2012. – T. 112, № 1. - S. 79-86.
6. Lesovskaya MI, Hemylyumynestsent antioxidant diagnosis and correction of health violations during oxidative stress; Modern scientific technology, 2010, № 7: P. 190-192.
7. Kormosh N.G. Fiziologicheskaya rol' aktivnikh form kisloroda (subkletechnyy uriven') – viglyad klinitsista / N.G. Kormosh // Ross. Bioterapevticheskiy zhurnal. – 2011. – T. 10, № 4. – S. 29-35.
8. Martinovich G. G. Redoks-gomeostaz kletok / G. G. Martinovich, S. N. Martinovich // Uspekhi fiziologicheskikh nauk. – 2008. – T. 39, № 3. – S. 29-44.9. Ray PD, HuangBW, TsujiY, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling: Cell Signal., 2012, Vol. 24, № 5: P. 981-990.
9. Okislitel'nyy stress: patologicheskkiye sostoyaniya i zabolevaniya / [Men'shchikova Ye. B., Zenkov N. K., Lankin V.Z. i dr.]. – Novosibirsk : ARTA, 2008. – 284 s.
10. Zhi-Hua S, Etsuo N, Two faces of lipid peroxidation products: the -Yin and Yang- principles of oxidative stress: J. Exp. Integr. Med., 2011, Vol. 1 (4): P. 215-219.
11. Saha D, Tamrakar A, Xenobiotics, oxidative stress, free radicals Vs. Antioxidants: dance of death to heaven's life: Asian J. Res. Pharm. Sci, 2011, Vol. 1, Iss. 2: P. 36-38.
12. Klimenko MO, Kucheryavchenko MO, Bagmut IYu, Zhukov VI, Long subtoxic laproksyd influence on the metabolic activity of monooxygenase system hepatocyt in subacute experiment: Problems of continuing medical education and research, 2014, 4 [16]: P. 57-60.
13. Bagmut I. The impact on the state oligoesters mikrosomal 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.
14. Bagmut IYu, Klimenko NA, Zhukov VI, 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, "Byal-GRAD-BG" OOD, 2013, V. 37: P. 7-10.

Матеріал надійшов до редакції 12.07.2018

© Шликова О. А., Ізмайлова О. В., Лисанець Ю. В.
УДК 612.438:616.61:611.018.1

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2018.22.3-4.07>

ПРИРОДНІ ПЕПТИДНІ КОМПЛЕКСИ ТИМУСА ТА НИРОК ПІДСИЛЮЮТЬ АПОПТОЗ ТРАНСФОРМОВАНИХ Т-КЛІТИН, АЛЕ НЕ ВПЛИВАЮТЬ НА ПРОЦЕСИ АПОПТОЗУ В-КЛІТИН*

Шликова О. А., Ізмайлова О. В., Лисанець Ю. В.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Одним із найважливіших питань сучасної медицини є пошук методів регуляції програмованої загибелі клітин із метою розробки нових підходів до лікування, у тому числі раку та лейкемії. Гуморальна регуляція процесів апоптозу за допомогою цитокінів, гормонів, ростових факторів, пептидів посідає важливе місце серед механізмів регуляції апоптозу. Досліджено вплив природних пептидних комплексів тимуса та нирок на процеси апоптозу клітин НРВ-ALL (гострий Т-клітинний лейкоз) та VJAB (лімфома Беркіта). Показано, що природні пептидні комплекси тимуса та нирок мають незначний стимулюючий вплив на апоптоз пухлинних В-клітин лінії VJAB у низьких концентраціях, а при збільшенні дози пептидів не впливають на процеси апоптозу; вірогідно підсилюють процеси елімінації трансформованих Т-клітин шляхом активації в них процесів апоптозу. При дії природного пептидного комплексу тимусу цей ефект має дозозалежний характер – зростає при збільшенні дози.

Ключові слова: апоптоз, природні пептидні комплекси тимуса та нирок, трансформовані Т- та В-клітини.

Апоптоз відіграє ключову роль у видаленні з організму небажаних або потенційно небезпечних клітин, наприклад, трансформованих клітин [1]. З літературних джерел відомо, що супресія апоптозу може бути однією з причин підсилення проліферативної активності передракових та ракових новоутворень [2].

Порушення плину апоптотичних процесів може призвести до порушення гомеостазу лімфопротиперативної системи та розвитку лейкемії та лімфом [3]. Експериментальне підтвердження отримали припущення про те, що в основі багатьох лімфопротиперативних захворювань лежить процес порушення клітинного апоптозу за типом блоку негативних наслідків активації, в результаті чого виникає нестримувана клітинна проліферація [4].

Дефекти апоптозу лежать в основі як пухлиноутворення, так і появи стійкості пухлин до лікарських препаратів [5,6]. Тому, одним із найважливіших питань є пошук методів регуляції програмованої загибелі клітин з метою розробки нових підходів до лікування раку та лейкемії. Інгібуючі ефекти можуть бути націлені на різні рівні регуляції: перехват стимулу, формування антагонізму до індуктора, припинення трансляції сигналу, блокада клітинних каталітичних ферментів – учасників клітинного самогубства [7, 8].

Гуморальна регуляція процесів апоптозу за допомогою цитокінів, гормонів, ростових факторів, пептидів посідає важливе місце серед механізмів регуляції апоптозу.

Вивченню механізмів впливу регуляторних пептидів на процеси апоптозу надається у теперішній час значна увага, так як накопичуються дані про підсилення або гальмування процесів апоптозу клітин різних тканин під дією пептидних речовин [9,10].

Показано, що синтезовані проапоптотичні пептиди володіють антипухлинною активністю проти пухлин кровоносних судин у мишей. При проникненні в середину клітини вони пошкоджують мембрани мітохондрій, що

викликає загибель ендотеліальних пухлинних клітин [11]. Отримані дані про наявність у пептидів, виділених із тимуса, антиканцерогенних властивостей [12].

Метою роботи було вивчення впливу природних пептидних комплексів тимуса та нирок на процеси апоптозу клітин НРВ-ALL (гострий Т-клітинний лейкоз) та VJAB (лімфома Беркіта).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені на клітинах лінії VJAB (лімфома Беркіта) та клітинах лінії НРВ-ALL (гострий Т-клітинний лейкоз людини). Клітини культивували в середовищі RPMI-1640 (Gibco BRL) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (BioMark), 10мМ HEPES (SIGMA, USA) і 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ГНЦЛС, Україна). Природний пептидний комплекс тимусу (тималін) (Россия, Санкт-Петербург, ЗМП) і природний пептидний комплекс нирок (ППКН) [13] додавали до культурального середовища в концентрації 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл відповідно та інкубували 24 години при 37 °С у вологому повітрі з 5% CO₂.

Досліджували морфологічні зміни при апоптозі: гіперхромність ядер, конденсацію й фрагментацію хроматину. Крім класичного забарвлення за Май-Грюнвальдом-Романовським [14] використовували також флуоресцентний “ядерний” барвник Hoechst 33342 [15]. Розраховували кількість клітин із морфологічними ознаками апоптозу як відсоток клітин із наявністю фрагментації або конденсації хроматину на 100 лімфоцитів.

ДНК з трансформованих клітин, що досліджувались, виділяли за допомогою фенол-хлороформного методу. Проводили аналіз міжнуклеосомної фрагментації ДНК у вигляді “сходинок”, яка виникає послідовно при розщепленні ДНК ендонуклеазами, з використанням агарозного гелю-електрофорезу з візуалізацією результатів в ультрафіолетовому світлі в присут-

* Цитування при атестації кадрів: Шликова О. А., Ізмайлова О. В., Лисанець Ю. В. Природні пептидні комплекси тимуса та нирок підсилюють апоптоз трансформованих т-клітин, але не впливають на процеси апоптозу в-клітин.. // Проблеми екології і медицини. – 2018. – Т. 22, № 3-4. – С. 25–29.

ності етидіуму броміду [14]. В якості маркера молекулярної ваги використовували ДНК λ-фага після обробки рестриктазою Pst 1. Результати документували фотографічно.

Підраховували загальну кількість клітин в 1мл суспензії. Проводили диференціювання живих та мертвих клітин за допомогою забарвлення клітин барвником акридинової оранжевий/етидіум бромід для оцінки відсоткового вмісту клітин, що знаходяться в стані апоптозу [16].

Підраховували кількість зелених (живих) і оранжевих (мертвих) клітин за допомогою мікроскопу "Люмам-Р-8" (Ломо, Росія) при збільшенні x360 під флуоресцентним мікроскопом в ультрафіолетовому світлі та видимій частині спектра. Розраховували кількість мертвих і живих клітин, як відсоток клітин із наявністю

оранжевого й зеленого забарвлення відповідно на 100 клітин.

Результати та їх обговорення

Дослідження загальної кількості клітин лінії ВJAB та їх життєздатності показали, що в вихідній культурі загальна кількість клітин складала $3,0 \pm 0,4 \times 10^6$ /мл, відсоток мертвих клітин дорівнює $4,6 \pm 0,8$. Кількість клітин при дії тималіну в мінімальній дозі - 0,01 мкг/мл та в дозі 0,1 мкг/мл незначно підвищилась, в дозах 1 мкг/мл та 10 мкг/мл загальна кількість клітин дорівнювала контрольній групі. Відсоток мертвих клітин майже не змінювався при дії тималіну і ППКН у дозах 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл у порівнянні з контрольними клітинами, при збільшенні дози пептидів дорівнював контрольній групі (табл. 1).

Таблиця 1

Загальна кількість та життєздатність клітин ВJAB при дії тималіну та ППКН

Показник	Контроль	Тималін, мкг/мл				ППКН, мкг/мл			
		0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число клітин 10^6 /мл, (n=6)	$3,0 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,22$	$3,4 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,42$	$3,0 \pm 0,5$
Кількість мертвих клітин, % (n=6)	$4,6 \pm 0,8$	$5,66 \pm 0,66$	$5,2 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,3$	$4,16 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,61$	$5,8 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,7$	$4,16 \pm 0,74$

Примітка: * $p < 0,05$ - у порівнянні з контрольними клітинами;

При дослідженні морфологічних проявів апоптозу при забарвленні за Май-Грюнвальдом-Романовським та фарбування Hoechst 33342 при дії мінімальних доз тималіну та ППКН спостерігалось незначне підвищен-

ня кількості клітин із фрагментацією ядра. При збільшенні дози пептидів рівень клітин із наявністю фрагментації ядра дорівнював контрольній групі (табл. 2).

Таблиця 2

Морфологічні ознаки апоптозу при дії тималіну і ППКН

Показник	Контроль	Тималін, мкг/мл				ППКН, мкг/мл				
		0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10	
Май-Грюнвальд-Романовський	Фрагментація, % n=6	$1,0 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,6$	$1,50 \pm 0,22$	$1,16 \pm 0,16$	$1,33 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$1,25 \pm 0,17$	$1,16 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,36$
	Конденсація, % n=6	$3,5 \pm 0,42$	$4,5 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,49$	$3,0 \pm 0,57$	$3,0 \pm 0,51$	$4,3 \pm 0,61$	$3,0 \pm 0,63$	$4,0 \pm 0,44$	$3,2 \pm 0,47$
Hoechst 33345	Фрагментація, % n=6	$1,5 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,36$	$1,66 \pm 0,33$	$1,33 \pm 0,33$	$2,5 \pm 0,42$	$1,0 \pm 0,34$	$1,45 \pm 0,18$	$1,58 \pm 0,18$
	Конденсація, % n=6	$4,5 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,6$	$4,66 \pm 0,33$	$5,16 \pm 0,54$	$4,3 \pm 0,55$	$5,66 \pm 0,76$	$4,5 \pm 0,42$	$5,0 \pm 0,25$	$5,16 \pm 0,6$

Примітка: * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними клітинами;

Подібні зміни спостерігались і при виявленні конденсації хроматину. Результати досліджень електрофоретичних зразків ДНК клітин при дії тималіну і ППКН показали, що істотних змін не відбулося, міжнуклеосомальна деградація ДНК не спостерігалась (рис.1).

Таким чином, природні пептидні комплекси тимуса та нирок мають незначний стимулюючий вплив на

апоптоз пухлинних В - клітин лінії ВJAB у низьких концентраціях, а при збільшенні дози пептидів не впливають на процеси апоптозу. Відомо, що окремі лінії В - клітин мають великий рівень експресії Bcl-2, що обумовлює їх високу стійкість до дії апоптоз-індукуючих чинників [17].

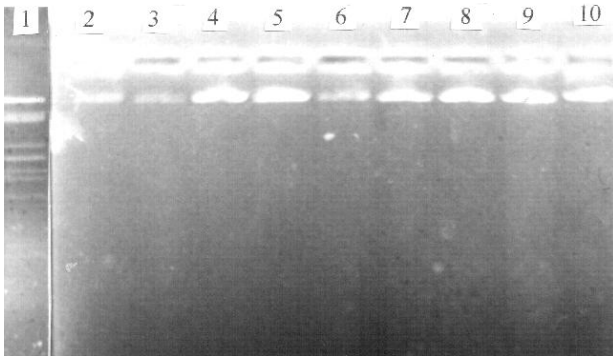


Рисунок 1. Аналіз міжнуклеосомальної деградації ДНК клітин лінії ВЈАВ людини при дії різних доз тималіну і ППКН при електрофорезі в агарозному гелі.

- 1- маркер молекулярної ваги ДНК лямбда-фага.
- 2- ДНК клітин лінії ВЈАВ людини (контроль);
- 3- клітини, що підлягали впливу тималіну (0,01 мкг/мл);
- 4- клітини, що підлягали впливу тималіну (0,1 мкг/мл);
- 5- клітини, що підлягали впливу тималіну (1 мкг/мл);
- 6- клітини, що підлягали впливу тималіну (10 мкг/мл);
- 7- клітини, що підлягали впливу ППКН (0,01 мкг/мл);
- 8- клітини, що підлягали впливу ППКН (0,1 мкг/мл);
- 9- клітини, що підлягали впливу ППКН (1 мкг/мл);
- 10- клітини, що підлягали впливу ППКН (10 мкг/мл).

Дослідження загальної кількості клітин лінії НВР-ALL та їх життєздатності показали, що кількість клітин при дії мінімальної дози (0,01 кг/мл) тималіну та ППКН підвищилась (рис.2), в дозах 0,1 мкг/мл і 1 мкг/мл також була вища в порівнянні з кількістю контрольних клітин, що дорівнювала $3,5 \pm 0,24 \times 10^6$ /мл ($p < 0,05$), але спостерігалась тенденція до зменшення кількості клітин у порівнянні з мінімальною дозою.

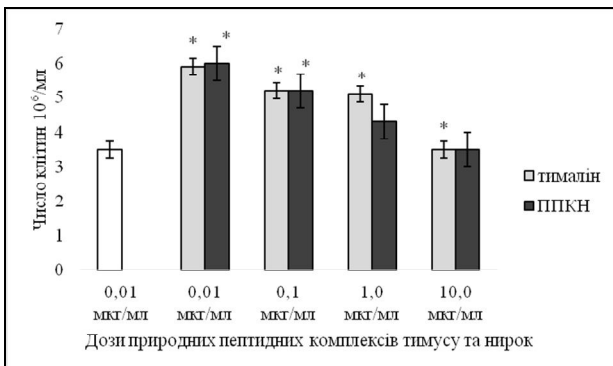


Рисунок 2. Загальна кількість клітин НВР-LLA при дії природних пептидних комплексів тимусу (тималін) та нирок (ППКН).

* $p < 0,05$ - у порівнянні з контрольними клітинами.

У максимальній дозі пептидів (10 мкг/мл) загальна кількість клітин дорівнювала контрольній групі. Відсоток мертвих клітин вірогідно підвищувався при дії тималіну і ППКН у дозах 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл у порівнянні з контрольними клітинами серед яких він дорівнював $5,8 \pm 0,7$ ($p < 0,05$), разом із цим при збільшенні дози пептидів відсоток мертвих клітин мав тенденцію до зниження (рис. 3).

При дослідженні морфологічних проявів апоптозу при забарвленні за Май-Грюнвальдом-Романовським при дії пептидних комплексів, що вивчалися, спостерігали типові апоптотичні ознаки із фрагментацією і пікнозом ядер, зменшення обсягу й розміру цитоплазми.

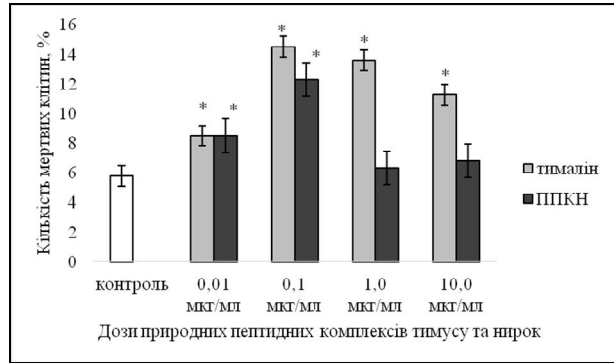


Рисунок 3. Життєздатність клітин НВР-LLA при дії природних пептидних комплексів тимусу (тималін) та нирок (ППКН).

$p < 0,05$ - у порівнянні з контрольними клітинами.

Фарбування Neochst 33342, після обробки тималіном і ППКН, виявило флуоресцентні скупчення, характерні для ядерної ДНК - фрагментації й конденсації хроматину в клітинах. В контрольних клітинах відсоток клітин з фрагментацією та конденсацією при забарвленні за Май-Грюнвальдом-Романовським та Neochst 33342 складав $1,2 \pm 0,2$ та $1,6 \pm 0,33$, відповідно. Було виявлено вірогідне підвищення відсотка клітин із наявністю фрагментації ядра, причому при дії тималіну цей ефект мав дозозалежний характер ($p < 0,05$) (рис. 4 а, б).

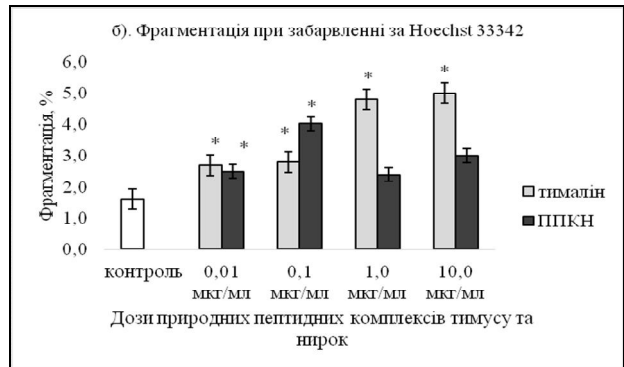
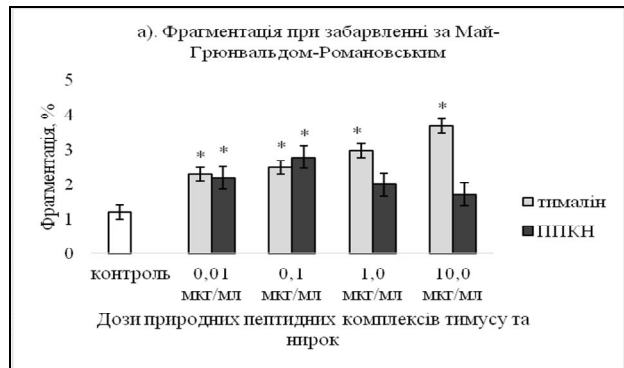


Рисунок 4 а,б. Морфологічні ознаки апоптозу за забарвленням по Май- Грюнвальд-Романовському при дії природних пептидних комплексів тимусу (тималін) та нирок (ППКН).

* $p < 0,05$ - у порівнянні з контрольними клітинами.

Подібні зміни спостерігались і при виявленні конденсації хроматину, але цей ефект був більш виражений при дії тималіну, ніж у ППКН. В контрольних клітинах конденсація хроматину була виявлена за забарвленням за Май-Грюнвальдом-Романовським та Neochst 33342 у $3,5 \pm 0,34$ та $4,0 \pm 1,0$ відсотках клітин, відповідно. Збільшення дози тималіну призводи-

ло до підвищення кількості клітин, що підлягали апоптозу. При дії ППКН ми спостерігали різнонаправлену фазову дію: малі дози пептиду стимулювали апоптоз, а великі – пригнічували (рис. 5 а, б). Дія пептидів в малих дозах відбувається за рахунок генералізації сигналу шляхом утворення вторинних месенджерів, а при збільшенні дози спостерігається гіперактивація систем, що може призводити до пригнічення ефекту [18].

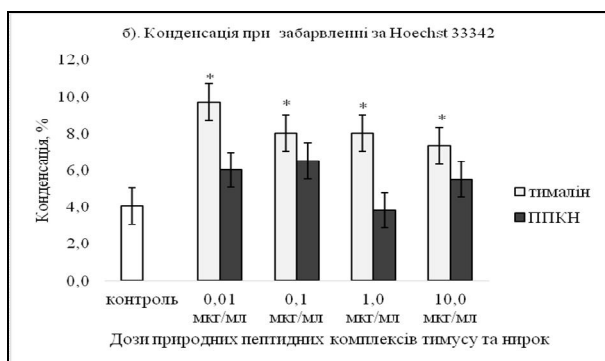
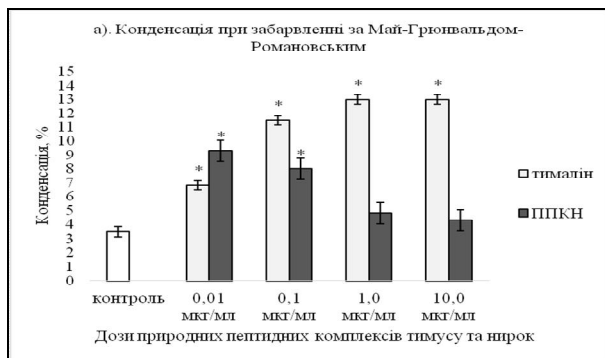


Рисунок 5 а,б. Морфологічні ознаки апоптозу за забарвленням по Hoechst 33345 при дії природних пептидних комплексів тимусу (тималін) та нирок (ППКН). * $p < 0,05$ - у порівнянні з контрольними клітинами.

Результати досліджень електрофоретичних зразків ДНК клітин при дії тималіну і ППКН показали, що істотних змін не відбулося, міжнуклеосомна деградація ДНК не спостерігалась (рис.6).

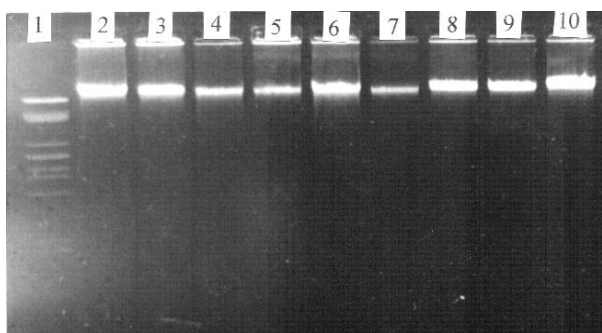


Рис. 6. Аналіз міжнуклеосомальної деградації ДНК клітин лінії НРВ-ALL при дії різних доз тималіну і ППКН при електрофорезі в агарозному гелі.

1-маркер молекулярної ваги: ДНК лямбда-фага розрізана рестриктазою *pst* 1;

2 - ДНК клітин лінії НРВ-ALL людини (контроль);

3 - клітини, що підлягали впливу тималіну (0,01 мкг/мл);

4 - клітини, що підлягали впливу тималіну (0,1 мкг/мл);

5 - клітини, що підлягали впливу тималіну (1 мкг/мл);

6 - клітини, що підлягали впливу тималіну (10 мкг/мл);

7 - клітини, що підлягали впливу ППКН (0,01 мкг/мл);

8 - клітини, що підлягали впливу тималіну ППКН (0,1 мкг/мл);

9 - клітини, що підлягали впливу ППКН (1 мкг/мл);

10 - клітини, що підлягали впливу ППКН (10 мкг/мл).

Таким чином, природні пептидні комплекси тимуса та нирок здатні підсилювати процеси апоптозу в трансформованих Т-клітинах. При дії природного пептидного комплексу тимусу цей ефект має дозозалежний характер.

Отже, природні пептидні комплекси тимусу та нирок вірогідно підсилюють процеси елімінації трансформованих Т-клітин шляхом активації в них процесів апоптозу, але не впливають на процеси апоптозу трансформованих В – клітин. Одним із механізмів дії пептидів може бути їх здатні зв'язуватися з молекулами ГКГС-I класу, що можуть брати участь в реалізації їх дії [19].

Отримані дані підтверджують висновок, що найбільшу активність пептидні біорегулятори виявляють по відношенню до тропного для них виду клітин і тканин. Можливо, на поверхні клітин існують специфічні сайти, що диференційовано сприймають вплив тимічних пептидів на програму апоптозу [20]. Одним із механізмів дії пептидів може бути їх здатні зв'язуватися з молекулами ГКГС-I класу, що можуть брати участь в реалізації їх дії.

Література

1. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development / H.S. Chin, M.X. Li, I.K.L. Tan [et al.] // Nat. Commun. – 2018. – Vol. 9 (1). – P. 4976.
2. Kaser H.E. The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasms / H.E. Kaser, B. Bodey // In. Viv. – 2000. – Vol. 14, N. 6. – P. 789-803.
3. Reed J.C. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies / J.C. Reed, M. Pellecchia // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 408-418.
4. Череев А.Н. Апоптоз как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу / А.Н. Череев, Л.В. Ковальчук // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 7. – С. 31-34.
5. Johnstone R.W. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy / R.W. Johnstone, A. A. Ruefli, S.W. Lowe // Cell. – 2002. – Vol. 108. – P. 153-164.
6. PIM1 overexpression in T-cell lymphomas protects tumor cells from apoptosis and confers doxorubicin resistance by upregulating c-myc expression / X. Xiang, Di Yuan, Yao Liu [et al.] // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2018. – P. 1-7.
7. Methotrexate induces high level of apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines / A. Pawlak, J. Kutkowska, B. Obminska-Mrukowicz [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2017. – Vol. 114. – P. 518-523.
8. ONC201 selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cells via activating pro-apoptotic integrated stress response and inactivating JAK/STAT and NF-kappaB pathways / X. Ni, X. Zhang, C.H. Hu [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – P. 61761-61776.
9. Трипептид неоген усиливает апоптоз Т-лимфоцитов человека при их ответе на митоген / М.Ф. Никонова, Т.Ю. Григорьева, М.М. Литвина [и др.] // Иммунология. – 2000. – № 4. – С. 35-37.
10. Dracorhodin perchlorate induces apoptosis in primary fibroblasts from human skin hypertrophic scars via participation of caspase 3 / P. Zhang, J. Li, X. Tang [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2014. – Vol. 728. – P. 82-92.
11. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides / H.M. Ellerby, W. Arap, L.M. Ellerby [et al.] // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5, N. 9. – P. 1032-1038.
12. Зинченко С.В. Иммуномодуляторы в комплексной терапии онкологических больных (обзор литературы) / С.В. Зинченко // Поволжский онкологический вестник. – 2014. – № 1. – С. 57-64.
13. Патент 10180 Україна, МПК А61 К37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію / Кайдашев І.П., Катрушов О.В.; заявник і патентовласник ТОВ «Фармапол». – № 94052069; заявл. 30.05.1994; опубл. 15.05.2001, Бюл. 4.

14. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та ін.]; під ред. І.П. Кайдашева – Полтава: Полімет, 2003. – 320 с.
15. Особенности индукции апоптоза этопозидом в различных злокачественных лимфоидных клеточных линиях человека / З.А. Бутенко, М.П. Завелевич, И.А. Смирнова [и др.] // Экспериментальная онкология. – 2000. – Т. 22, № 1-2. – С. 26-31.
16. Traganos F. Lysosomal proton pump activity: Supravital cell staining with acridine orange differential leukocytes subpopulations / F. Traganos, Z. Darzynkiewicz // Meth. Cell Biol. – 1994. – N. 41. – P. 185-195.
17. Protein Tyrosine Kinases p53/56^{lyn} i p72^{syk} in MHC class I-Mediated signal Transduction in B-Lymphoma Cells / A.E. Pedersen, S. Bregenholt, S. Skov [et al.] // Experimental Cell Research. – 1998. – Vol. 240. – P. 144-150.
18. Кузник Б.И. Имунофан – синтетический пептидный препарат нового поколения: иммунологические и патогенетические аспекты клинического применения / Б.И. Кузник, В.В. Лебедев // Иммунология. – 1999. – № 1. – С. 25-30.
19. Кайдашев И.П. Роль молекул МНС I класса на опухолевых Т-клетках в передаче пептидного сигнала / И.П. Кайдашев, О.А. Ножинова // Иммунологія та алергологія. – 2002. – № 2. – С. 22-25.
20. Samara P. Prothymosin Alpha and Immune Responses: Are We Close to Potential Clinical Applications? / P. Samara, K. Ioannou, O.E. Tsitsilonis // Vitam. Horm. – 2016. – Vol. 102. – P. 179-207.

ENGLISH VERSION: NATURAL PEPTIDE COMPLEXES OF THYMUS AND KIDNEYS REINFORCE APOPTOSIS OF TRANSFORMED T-CELLS, BUT DO NOT AFFECT THE PROCESSES OF APOPTOSIS IN B-CELLS*

Shlykova O.A., Izmailova O.V., Lysanets Yu.V.

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

One of the most important issues in modern medicine is the search for methods for regulating programmed cell death in order to develop new approaches to treatment, including cancer and leukemia. Humoral regulation of the processes of apoptosis with the help of cytokines, hormones, growth factors, peptides plays an important role in the mechanisms of regulation of apoptosis. The effect of natural peptide complexes of thymus and kidneys on HPB-ALL (acute T-cell leukemia) and BJAB (Berkita lymphoma) cell apoptosis processes has been studied. It has been shown that the natural peptide complexes of the thymus and the kidneys have little stimulating effect on the apoptosis of BJAB tumor B cells at low concentrations, and when increasing the dose of peptides, they do not affect the processes of apoptosis; it is believed that the processes of elimination of transformed T-cells are enhanced by activating apoptosis processes in them. With the action of the natural peptide complex of thymus, this effect has a dose-dependent nature - increases with raising the dose.

Key words: apoptosis, natural peptide complexes of thymus and kidneys, transformed T- and B-cells.

Apoptosis plays a key role in the removal of adverse or potentially dangerous cells from the body, for example, the transformed cells [1]. The literary sources provide evidence that suppression of apoptosis may be one of the reasons for the increase of proliferative activity of precancerous and cancerous tumors [2].

Disrupted course of apoptotic processes may infringe the homeostasis of the lymphoproliferative system and lead to the development of leukemia and lymphoma [3]. Experimental confirmation has been made that the basis of many lymphoproliferative diseases is the process of cellular apoptosis disruption by the type of block of negative effects of activation, resulting in unrestrained cell proliferation [4].

Defects of apoptosis are at the basis of both tumor formation and the appearance of resistance of tumors to medications [5,6]. Therefore, one of the most important issues is the search for methods of regulating programmed cell death in order to develop new approaches to the treatment of cancer and leukemia. The inhibitory effects may be targeted at different levels of regulation: interception of the stimulus, formation of antagonism to the inductor, termination of signal transduction, blockade of cellular catalytic enzymes – participants in the cellular suicide [7, 8].

Humoral regulation of the processes of apoptosis with the help of cytokines, hormones, growth factors and peptides plays an important role in the mechanisms of regulation of apoptosis.

The study of the mechanisms in the influence of regulatory peptides on apoptosis processes is currently given considerable attention, as the data on the amplification or inhibition of the apoptosis processes of cells in various tissues under the influence of peptide substances are gradually accumulated [9, 10].

It has been shown that synthesized pro-apoptotic peptides possess the anti-tumor activity against the blood vessel tumors in mice. When penetrated into the middle of the cell, they damage the membranes of mitochondria, causing the death of endothelial tumor cells [11]. The data on the anti-carcinogenic properties in peptides isolated from the thymus have been obtained [12].

The aim of the research was to study the effects of natural peptide complexes of the thymus and kidneys on the processes of apoptosis in HPB-ALL cells (acute T-cell

leukosis) and BJAB (Burkitt's lymphoma).

Materials and methods

The studies were conducted on cells of the BJAB line (Burkitt's lymphoma) and HBP-ALL cells (acute T-cell leukemia). Cells were cultured in the RPMI-1640 (Gibco BRL) medium with the addition of 10% fetal bovine serum (BioMark), 10 mM HEPES (SIGMA, USA) and 100 µg/ml gentamicin sulfate (GNTSLS, Ukraine). The natural peptide complex of thymus (thymalin) (Russia, St. Petersburg, ZMP) and the natural peptide complex of the kidneys (NPCK) [13] were added to a culture medium at a concentration of 0.01 µg / ml, 0.1 µg / ml, 1 µg / ml, 10 µg/ml, respectively, and incubated for 24 hours at 37°C in a moist air with 5% CO₂.

The morphological changes in apoptosis were studied: hyperchromicity of nuclei, condensation and fragmentation of chromatin. In addition to classical May-Grünwald- Romanowsky staining [14], we also used a fluorescent "nuclear" dye Hoechst 33342 [15]. The number of cells with morphological features of apoptosis was calculated as the percentage of cells with fragmentation or condensation of chromatin per 100 lymphocytes.

The DNA from the transformed cells under consideration was isolated using the phenol-chloroform method. An intercellular DNA fragmentation analysis was performed in the form of "steps" that occurs consistently in DNA splitting by endonuclease, using an agarose gel electrophoresis with visualization of the results in ultraviolet light in the presence of bromide etidium [14]. DNA molecules of λ-phage were used as markers of molecular weight after treatment with restrictase Pst 1. The results were photographed.

The total number of cells was counted in 1 ml of suspension. Differentiation of living and dead cells was performed by staining the cells with acridine orange / ethidium bromide dye to estimate the percentage of cells present in the state of apoptosis [16].

The number of green (living) and orange (dead) cells was counted using a Lumam-P-8 microscope (Lomo, Russia), magnified at x360 under a fluorescence microscope in ultraviolet light and the visible part of the spectrum. The number of dead and living cells was calculated

* To cite this English version: O.A. Shlykova, O.V. Izmailova, Yu.V. Lysanets. Natural peptide complexes of thymus and kidneys reinforce apoptosis of transformed t-cells, but do not affect the processes of apoptosis in b-cells // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2018. - Vol 22, № 3-4. - P. 30-34.

as the percentage of cells with an orange and green color, respectively, per 100 cells.

Results and discussion

The study of the total number of BJAB cells and their viability demonstrated that in the parent culture, the total number of cells was $3.0 \pm 0.4 \times 10^6$ / ml, the percentage of dead cells was 4.6 ± 0.8 . The number of cells with thymalin at a minimum dose of $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$ and a dose of

$0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ slightly increased. At doses of $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ and $10 \mu\text{g} / \text{ml}$, the total number of cells was equal to the control group. Percentage of dead cells was almost unchanged under the action of thymalin and NPCK at doses of $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$, $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ in comparison with control cells. With an increase in the dose of peptides, it was equal to the control group (Table 1).

Table 1
Total amount and viability of BJAB cells under the action of thymalin and NPCK

Parameter	Control	Thymalin, $\mu\text{g} / \text{ml}$				NPCK, $\mu\text{g} / \text{ml}$			
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Number of cells $10^6/\text{ml}$, (n=6)	3.0 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.4	2.8 ± 0.22	3.4 ± 0.3	4.0 ± 0.5	3.8 ± 0.6	3.5 ± 0.42	3.0 ± 0.5
Number of dead cells, %, (n=6)	4.6 ± 0.8	5.66 ± 0.66	5.2 ± 0.9	4.8 ± 0.3	4.16 ± 0.7	5.5 ± 0.61	5.8 ± 0.7	4.1 ± 0.7	4.16 ± 0.74

Note: * $p < 0.05$ – in comparison with control cells

In the study of morphological manifestations of apoptosis in May-Grunwald-Romanovsky staining and Hechst 33342 staining, a slight increase in the number of cells with fragmentation of the nucleus was observed

at the action of minimal doses of thymalin and NPCK. When increasing the dose of peptides, the level of cells with the presence of fragmentation of the nucleus was equal to the control group (Table 2).

Table 2
Morphological signs of apoptosis under the action of thymalin and NPCK

Parameter	Control	Thymalin, $\mu\text{g} / \text{ml}$				NPCK, $\mu\text{g} / \text{ml}$				
		0.01	0.1	1	10	0.01	0.1	1	10	
May-Grunwald-Romanovsky	Fragmentation, % n=6	1.0 ± 0.5	1.8 ± 0.6	1.50 ± 0.22	1.16 ± 0.16	1.33 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.25 ± 0.17	1.16 ± 0.4	0.5 ± 0.36
	Condensation, % n=6	3.5 ± 0.42	4.5 ± 0.5	3.3 ± 0.49	3.0 ± 0.57	3.0 ± 0.51	4.3 ± 0.61	3.0 ± 0.63	4.0 ± 0.44	3.2 ± 0.47
Hoechst 33345	Fragmentation, % n=6	1.5 ± 0.5	2.3 ± 0.7	2.0 ± 0.36	1.66 ± 0.33	1.33 ± 0.33	2.5 ± 0.42	1.0 ± 0.34	1.45 ± 0.18	1.58 ± 0.18
	Condensation, % n=6	4.5 ± 0.7	5.7 ± 0.6	4.66 ± 0.33	5.16 ± 0.54	4.3 ± 0.55	5.66 ± 0.76	4.5 ± 0.42	5.0 ± 0.25	5.16 ± 0.6

Note: * $p < 0.05$ – in comparison with control cells

Similar changes were observed when chromatin condensation was detected. The results of researches of electrophoretic DNA samples of cells under the action of

thymalin and NPCK showed that no significant changes occurred, and no internucleosomal DNA degradation was observed (Fig. 1).

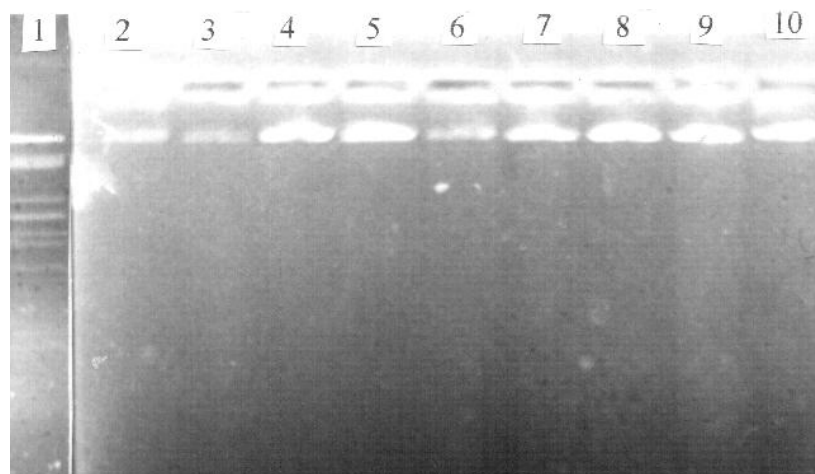


Figure 1. Analysis of internucleosomal degradation of DNA of cells of the human BJAB line at various doses of thymalin and NPCK in electrophoresis in agarose gel.

- 1- marker of the molecular weight of DNA of lambda phage; 2- human DNA BJAB cells (control);
- 3- cells that were exposed to thymalin ($0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$); 4- cells that were exposed to thymalin ($0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$);
- 5- cells that were subjected to thymalin ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$); 6- cells that were exposed to thymalin ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$);
- 7- cells that were exposed to NPCK ($0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$); 8- cells that were exposed to NPCK ($0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$);
- 9- cells that were exposed to NPCK ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$); 10- cells that were exposed to NPCK ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Thus, the natural peptide complexes of the thymus and kidneys have little stimulating effect on the apoptosis of tumor B-cells of the BJAB line at low concentrations, and when the dose of peptides increases, they do not affect the processes of apoptosis. It is known that separate lines of B-cells have a high level of expression of Bcl-2, which results in their high resistance to apoptotic-inducing factors [17].

Studies of the total number of HBP-ALL cells and their viability showed that the number of cells with the action of a minimum dose (0.01 µg/ml) of thymalin and NPCK increased (Fig. 2) at doses of 0.1 µg/ml and 1 µg/ml was also higher in comparison with control cells, which was $3.5 \pm 0.24 \times 10^6$ / ml ($p < 0.05$), but there was a tendency to decrease in the number of cells in comparison with the minimum dose.

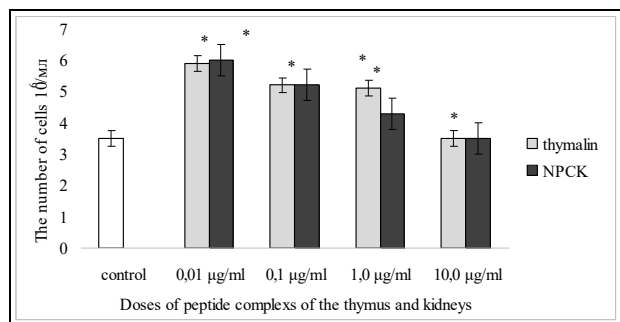


Figure 2. The total number of HBP-LLA cells under the action of natural peptide complexes of the thymus (thymalin) and kidneys (NPCK).

* $p < 0.05$ – in comparison with control cells.

At the maximum dose of peptides (10 µg/ml), the total number of cells was equal to the control group. Percentage of dead cells is believed to be elevated at the action of thymalin and NPCK at doses of 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, compared with control cells, where it was 5.8 ± 0.7 ($p < 0.05$). Along with this increase in the dose of peptides, the percentage of dead cells tended to decrease (Fig. 3).

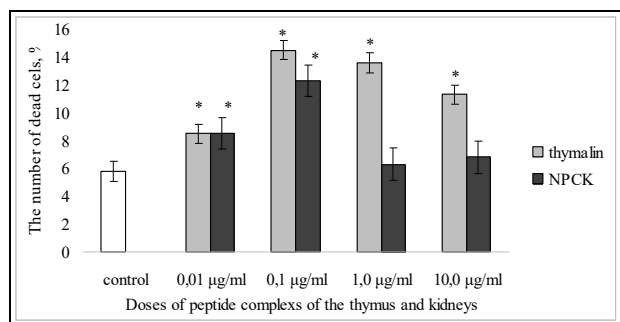


Figure 3. Viability of HBP-LLA cells under the action of natural peptide complexes of the thymus (thymalin) and kidneys (NPCK).

* $p < 0.05$ – in comparison with control cells.

In the study of morphological manifestations of apoptosis in May-Grunwald-Romanovsky staining under the influence of the examined peptide complexes, typical apoptotic signs were observed with the fragmentation and pyknosis of the nuclei, and the decrease in the volume and size of the cytoplasm. The Hoechst 33342 staining, after treatment with thymalin and NPCK, revealed fluorescence clusters characteristic for nuclear DNA – fragmentation and condensation of chromatin in cells. In the control cells, the percentage of cells fragmentation and condensation in May-Grunwald-Romanovsky and Hoechst 33342 staining was 1.2 ± 0.2

and 1.6 ± 0.33 , respectively. A probable increase in the percentage of cells with the presence of fragmentation of the nucleus was revealed, and with effect of thymalin, this effect had a dose-dependent nature ($p < 0.05$) (Fig. 4 a, b).

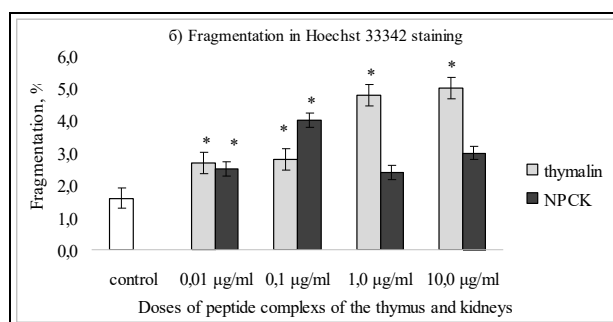
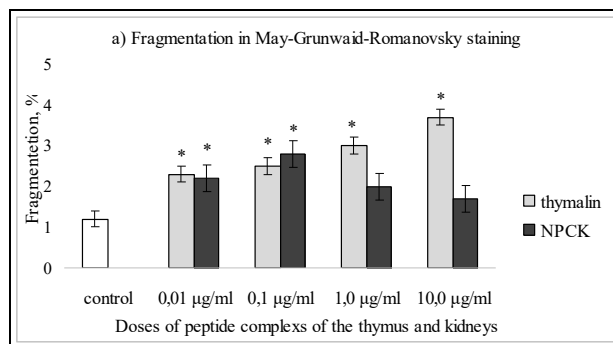
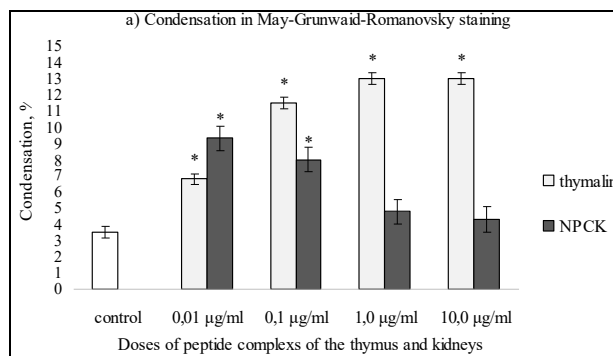


Figure 4 a, b. Morphological signs of apoptosis in May-Grunwald-Romanovsky staining under the action of natural peptide complexes of the thymus (thymalin) and kidneys (NPCK).

* $p < 0.05$ – in comparison with control cells.

Similar changes were observed when chromatin condensation was detected, but this effect was more pronounced in the action of thymalin than in the NPCK. In the control cells, chromatin condensation was detected in May-Grunwald-Romanovsky and Hoechst 33342 staining at 3.5 ± 0.34 and 4.0 ± 1.0 percent of cells, respectively. An increase in the dose of thymalin resulted in an increase in the number of cells subjected to apoptosis. At the action of NPCK, we observed a multi-directional phase effect: the small doses of peptide stimulated apoptosis, whereas the large ones suppressed it (Fig. 5 a, b). The effect of peptides in small doses is due to the generalization of the signal by the formation of secondary messengers, and with the increase in dose, hyperactivation of systems is observed, which can lead to the suppression of the effect [18].



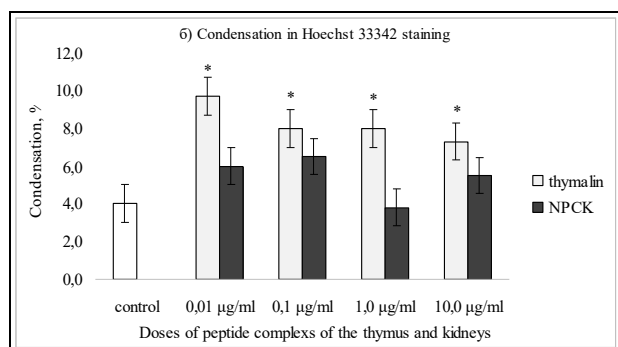


Figure 5 a,b. Morphological signs of apoptosis in Hoechst 33342 staining under the action of natural peptide complexes of the thymus (thymalin) and kidneys (NPCK). * $p < 0.05$ – in comparison with control cells.

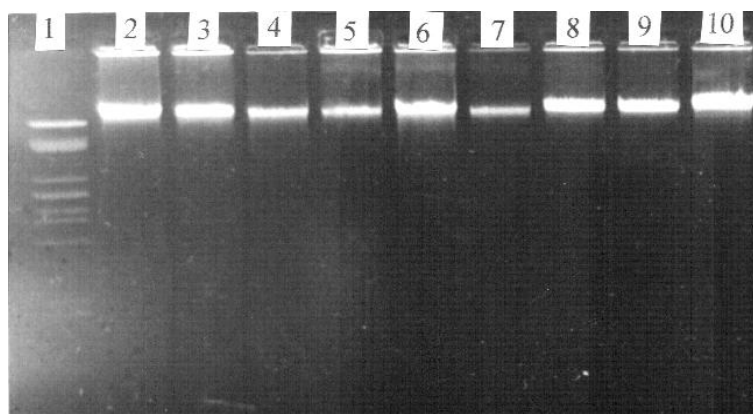


Fig.6. Analysis of internucleosomal degradation of DNA cells of the HPB-ALL line under various doses of thymalin and NPCK in agarose gel electrophoresis.

1- marker of molecular weight: DNA of lambda-phage is cut with restrictase pst
 2- human DNA cells of the HPB-ALL line (control); 3- cells that were exposed to thymalin (0.01 µg / ml);
 4- cells subjected to the action of thymalin (0.1 µg / ml); 5- cells subjected to the action of thymalin (1 µg / ml);
 6- cells that were exposed to thymalin (10 µg / ml); 7- cells that were exposed to NPCK (0.01 µg / ml);
 8- cells that were exposed to thymalin of NPCK (0.1 µg / ml); 9- cells that were exposed to NPCK (1 µg / ml);
 10- cells that were exposed to NPCK (10 µg / ml).

The obtained data confirm the conclusion that peptide bioregulators exhibit the greatest activity in relation to the tropical type of cells and tissues. Presumably, there are specific sites on the cell surface that perceive the effect of thymic peptides on the apoptosis program in a differentiated manner [20]. One of the mechanisms of action of peptides may be their ability to bind to the molecules of MHC-I class, which can participate in the implementation of their actions.

References

1. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development / H.S. Chin, M.X. Li, I.K.L. Tan [et al.] // Nat. Commun. – 2018. – Vol. 9 (1). – P. 4976.
2. Kaser H.E. The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasms / H.E. Kaser, B. Bodey // In. Viv. – 2000. – Vol. 14, N. 6. – P. 789-803.
3. Reed J.C. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies / J.C. Reed, M. Pellecchia // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 408-418.
4. Cheredeev A.N. Apoptoz kak vazhnyy etap ozenki immunoy sistemy po patogeneticheskomu prinzipu / A.N. Cheredeev, L.V. Koval'chuk // Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. – 1997. – № 7. – S. 31-34.
5. Johnstone R.W. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy / R.W. Johnstone, A. A. Ruefli, S.W. Lowe // Cell. – 2002. – Vol. 108. – P. 153-164.
6. PIM1 overexpression in T-cell lymphomas protects tumor cells from apoptosis and confers doxorubicin resistance by

The results of studies of electrophoretic DNA samples of cells under the action of thymalin and NPCK showed that no significant changes occurred, internucleosomal degradation of DNA was not observed (Fig. 6).

Thus, the natural peptide complexes of the thymus and the kidneys are capable of reinforcing the processes of apoptosis in the transformed T-cells. With the action of natural peptide complex of thymus, this effect has a dose-dependent character.

Consequently, the natural peptide complexes of thymus and kidneys are likely to increase the processes of elimination of the transformed T-cells by activating apoptosis processes in them, but they do not affect the processes of apoptosis of the transformed B-cells. One of the mechanisms of action of peptides may be their ability to bind to the molecules of MHC-I class, which can participate in the implementation of their actions [19].

- upregulating c-myc expression / X. Xiang, Di Yuan, Yao Liu [et al.] // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2018. – P. 1-7.
7. Methotrexate induces high level of apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines / A. Pawlak, J. Kutkowska, B. Obminska-Mrukowicz [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2017. – Vol. 114. – P. 518-523.
8. ONC201 selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cells via activating pro-apoptotic integrated stress response and inactivating JAK/STAT and NF-kappaB pathways / X. Ni, X. Zhang, C.H. Hu [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – P. 61761-61776.
9. Tripeptid neogen usilivaet apoptoz T-limfozitiv cheloveka pri ich otvete na mitogen / M.F. Nikonova, T.Yu. Grigor'eva, M.M. Litvina [i dr.] // Immunologiya. – 2000. – № 4. – S. 35-37.
10. Dracorhodin perchlorate induces apoptosis in primary fibroblasts from human skin hypertrophic scars via participation of caspase 3 / P. Zhang, J. Li, X. Tang [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2014. – Vol. 728. – P. 82-92.
11. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides / H.M. Ellerby, W. Arap, L.M. Ellerby [et al.] // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5, N. 9. – P. 1032-1038.
12. Zinchenko S.V. Immunomodulatory v kompleksnoy terapii onkologicheskich bol'nyh (obzor literatury) / S.V. Zinchenko // Povolzhskiy onkologicheskij vestnik. – 2014. – № 1. – S. 57-64.
13. Patent 10180 Ukraïna, MPK A61 K37/00. Sposib oderzhannya biologichno aktivnoi rehovini, scho mae regeneratornu ta modulyuyuchu diyu / Kaydashev I.P., Katrushov O.V.; zayavnik i patentovlasnik TOV «Farmapol». – № 94052069 ; zayavl. 30.05.1994 ; opubl. 15.05.2001, Byul. 4.

14. Metodi klinichnich ta eksperimental'nich doslidzhen' v medizini / [L.V. Berkalo, O.V. Bobovich, N.O. Bobrova ta in.]; pid red. I.P. Kaydasheva – Poltava: Polimet, 2003. – 320 s.
15. Osobennosti indukzii apoptoza etopozidom v razlich-nych zlokachestvennykh limfoidnykh kletochnykh liniyakh cheloveka / Z.A. Butenko, M.P. Zavelevich, I.A. Smirno-va [i dr.] // Eksperimental'naya onkologiya. – 2000. – T. 22, № 1-2. – S. 26-31.
16. Traganos F. Lysosomal proton pump activity: Supravital cell staining with acridine orange differential leukocytes subpopulations / F. Traganos, Z. Darzynkiewicz // Meth. Cell Biol. – 1994. – N. 41. – P. 185-195.
17. Protein Tyrosine Kinases p53/56^{lyn} i p72^{syk} in MHC class I-Mediated signal Transduction in B-Lymphoma Cells / A.E. Pedersen, S. Bregenholt, S. Skov [et al.] // Experimental Cell Research. – 1998. – Vol. 240. – P. 144-150.
18. Kuznik B.I. Imunofan – sinteticheskiy peptidnyy preparat novogo pokoleniya: immunologicheskie i patogenicheskie aspekty klinicheskogo primeneniya / B.I. Kuznik, V.V. Lebedev // Immunologiya. – 1999. – № 1. – S. 25-30.
19. Kaydashev I.P. Rol' molekul MNS I klassa na opucholevykh T-kletkach v peredache peptidnogo signala / I.P. Kaydashev, O.A. Nozhinova // Immunologiya ta alergologiya. – 2002. – № 2. – S. 22-25.
20. Samara P. Prothymosin Alpha and Immune Responses: Are We Close to Potential Clinical Applications? / P. Samara, K. Ioannou, O.E. Tsitsilonis // Vitam. Horm. – 2016. – Vol. 102. – P. 179-207.

Матеріал надійшов до редакції 03.10.2018

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.