

# Патологія



Том 14, № 2(40), травень–серпень 2017 р.

## Редакційна колегія

Головний редактор – проф. В.О. Туманський  
Заст. гол. редактора – проф. А.В. Абрамов  
Відповідальний секретар – проф. С.І. Тертишний

проф. Т.М. Бойчук (Чернівці)  
проф. О.В. Ганчева (Запоріжжя)  
проф. С.Г. Гичка (Київ)  
проф. С. М. Завгородній (Запоріжжя)  
проф. Т.Д. Задорожна (Київ)  
академік НАМН, чл.-кор. НАН України, проф. Д.Д. Зербіно (Львів)  
проф. Ю.М. Колесник (Запоріжжя)  
проф. В.Д. Марковський (Харків)  
проф. Н.С. Михайловська (Запоріжжя)  
академік НАМН, чл.-кор. НАН України, проф. О.Г. Резніков (Київ)  
академік НАМН, чл.-кор. НАН України, проф. А.М. Романенко (Київ)  
проф. Г.Г. Скібо (Київ)  
чл.-кор. НАМН України, проф. В.І. Черній (Київ)  
проф. В.О. Шаврін (Запоріжжя)  
проф. Г.А. Шифрін (Запоріжжя)  
проф. І.С. Шпонька (Дніпро)

## Редакційна рада

проф. Самір С. Амр (Дахран, Саудівська Аравія)  
чл.-кор. РАМН, проф. Н.М. Анічков (Санкт-Петербург)  
проф. Я.Я. Боднар (Тернопіль)  
проф. Кристер Буш (Уппсала, Швеція)  
проф. О.С. Гавриш (Київ)  
проф. А.І. Гоженко (Одеса)  
проф. І.С. Давиденко (Чернівці)  
проф. О.О. Дядик (Київ)  
проф. Міхал Єлень (Вроцлав, Польща)  
проф. Френсіс Жубер (Париж, Франція)  
чл.-кор. РАМН, проф. Л.В. Кактурський (Москва, РФ)  
проф. О.М. Камишний (Запоріжжя)  
проф. М.О. Клименко (Миколаїв)  
проф. Джордж Контогеорґос (Афіни, Греція)  
проф. Г.О. Леженко (Запоріжжя)  
проф. В.Ф. Мислицький (Чернівці)  
проф. І.О. Михайлюк (Івано-Франківськ)  
проф. Барат Натвані (Лос-Анджелес, США)  
проф. М.К. Недзьведь (Мінськ, Республіка Білорусь)  
академік РАМН, проф. М.А. Пальцев (Москва, РФ)  
проф. Ю.О. Поспішіль (Львів)  
проф. О.С. Решетнікова (Калінінград, РФ)  
проф. В.П. Сільченко (Київ)  
проф. І.В. Сорокіна (Харків)  
проф. В.П. Терещенко (Київ)  
проф. П.І. Червяк (Київ)  
проф. Шоджи Фукушіма (Канагава, Японія)

## Pathologia

Volume 14 No. 2 May–August 2017

Scientific Medical Journal. Established in October 2004  
Zaporizhzhia State Medical University  
Submit papers are peer-reviewed

© Патологія, 2017

## Editorial Board

Editor-in-Chief – V.A. Tumanskiy  
Deputy Editor-in-Chief – A.V. Abramov  
Executive secretary – S.I. Tertyshniy  
T.M. Boichuk (Chernivtsi, Ukraine)  
O.V. Gancheva (Zaporizhzhia, Ukraine)  
V.I. Cherniy (Kyiv, Ukraine)  
S.G. Gichka (Kyiv, Ukraine)  
Yu.M. Kolesnik (Zaporizhzhia, Ukraine)  
V.D. Markovsky (Kharkiv, Ukraine)  
N.S. Mykhailovska (Zaporizhzhia, Ukraine)  
A.G. Reznikov (Kyiv, Ukraine)  
A.M. Romanenko (Kyiv, Ukraine)  
V.A. Shavrin (Zaporizhzhia, Ukraine)  
G.A. Shifrin (Zaporizhzhia, Ukraine)  
I.S. Shpon'ka (Dnipro, Ukraine)  
G.G. Skibo (Kyiv, Ukraine)  
T.D. Zadorozhnaya (Kyiv, Ukraine)  
S.M. Zavorodniy (Zaporizhzhia, Ukraine)  
D.D. Zerbino (Lviv, Ukraine)

## Scientific Editorial Board

Samir S. Amr (Dhahran, Saudi Arabia)  
N.M. Anichkov (St. Petersburg, RF)  
Ya.Ya. Bodnar (Ternopil, Ukraine)  
Ch. Busch (Uppsala, Sweden)  
P.I. Cherviak (Kyiv, Ukraine)  
I.S. Davidenko (Chernivtsi, Ukraine)  
O.O. Dyadyk (Kyiv, Ukraine)  
Sh. Fukushima (Kanagawa, Japan)  
A.S. Gavriush (Kyiv, Ukraine)  
A.I. Gozhenko (Odessa, Ukraine)  
M. Jelen (Wroclaw, Poland)  
F. Joubert (Paris, France)  
L.V. Kaktursky (Moscow, RF)  
O.M. Kamyshny (Zaporizhzhia, Ukraine)  
M.O. Klimenko (Mykolaiv, Ukraine)  
G. Kontogeorgos (Athens, Greece)  
G.O. Lezhenko (Zaporizhzhia, Ukraine)  
I.O. Michailiuk (Ivano-Frankivsk, Ukraine)  
V.F. Mislitskiy (Chernivtsi, Ukraine)  
B. Nathwani (Los Angeles, USA)  
M.K. Nedz'ved' (Minsk, Belarus)  
M.A. Paltsev (Moscow, RF)  
Yu.A. Pospishil (Lviv, Ukraine)  
I.S. Reshetnikova (Kaliningrad, RF)  
V.P. Silchenko (Kyiv, Ukraine)  
I.V. Sorokina (Kharkiv, Ukraine)  
V.P. Tereschenko (Kyiv, Ukraine)

Mayakovsky Avenue, 26, Zaporizhzhia,  
69035, UKRAINE  
Tel./fax: +38 (061) 233-02-34  
e-mail: med.jur@zsmu.zp.ua  
http://pat.zsmu.edu.ua

## Науково-практичний медичний журнал Запорізького державного медичного університету

Заснований у жовтні 2004 р.  
Виходить один раз на 4 місяці.  
Свідоцтво про реєстрацію  
КВ № 20604-10404  
від 27.02.2014 р.  
Передплатний індекс – 95911.

### Атестований

як наукове фахове видання,  
в якому можуть публікуватися  
результати дисертаційних робіт  
у галузі медичних наук  
(Наказ Міністерства освіти  
і науки України  
№ 1081 від 29.09.2014 р.)

### Журнал включений до

### WEB OF SCIENCE®

та інші міжнародні  
наукометричні бази даних.  
Статті, що надходять до журналу,  
рецензуються за процедурою  
Double-blind.

Ліцензія Creative Commons



Редакція може публікувати  
матеріали, не поділяючи  
думки авторів.

### Рекомендовано до друку

Вченою радою ЗДМУ  
протокол № 13 від 22.06.2017 р.  
Підписано до друку  
21.08.2017 р.

### Редакція:

Начальник редакційно-  
видавничого відділу  
В.М. Миклашевський  
Літературний редактор  
І.І. Гаркавцева  
Технічний редактор  
Ю.В. Полулан

### Адреса редакції і видавця:

69035, Україна,  
м. Запоріжжя,  
пр. Маяковського, 26, ЗДМУ,  
тел./факс: +38 (061) 233-02-34,  
e-mail: med.jur@zsmu.zp.ua  
http://pat.zsmu.edu.ua

### Віддруковано

у друкарні ТОВ «Х-ПРЕСС»  
69068, м. Запоріжжя,  
вул. Кругова, 165/18,  
тел. (061) 220-42-29.  
Свідоцтво  
про державну реєстрацію  
АОО №198468 від 01.07.1999 р.  
Формат 60x84/8.  
© Папір крейдяний,  
безкислотний,  
Умов. друк. арк. 6.  
Тираж 200 прим.  
Зам. № 8/17.

## Оригінальні дослідження

**Абрамова Т. В., Колесник Ю. М.**

Особенности организации популяции альфа-клеток в поджелудочной железе у крыс со спонтанной гипертензией (SHR)

**Туманский В. А., Христенко Т. А.**

Особенности транскрипционной активности гена *K-RAS* и экспрессии рецепторов семейства ErbB в аденокарциноме желудка кишечного типа

**Бадарбекова М. М., Калмыкова А. В.**

Имуногистохимическая характеристика иммуноклеточного микроокружения плоскоклеточного рака лёгкого

**Михайловська Н. С., Міняйленко Л. Є.**

Динаміка структурно-функціональних і вегетативних змін серця під впливом комбінованої терапії урсодезоксихолевою кислотою та L-аргініном у хворих на ішемічну хворобу серця, асоційовану з неалкогольною жирною хворобою печінки

**Прозорова Т. М., Камишна В. А., Камишний О. М.**

Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламіду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків

**Абрамов А. В., Шаменко В. А.**

Особенности экспрессии HIF-1α и HIF-3α в гипоталамусе у крыс линии Вистар под влиянием прерывистой гипобарической гипоксии

**Медведкова С. О.**

Прогностичне значення рівнів мелатоніну та серотоніну в ранньому відновному періоді мозкового ішемічного півкульового інсульту

**Шинкаренко Т. В.**

Експресія матриксних металопротеїназ у дифузних гліомах: діагностична роль

**Каменщик А. В., Іванько О. Г.**

Гіпертрофія міокарда та внутрішньосерцева гемодинаміка в дітей із двостулковим аортальним клапаном серця

**Сафонов Д. М.**

Алгоритм диференційної діагностики ендегенної кататонії, кататоморфних та кататомімікрічних станів

**Баязітов Д. М., Кресюн Н. В., Бузиновський А. Б., Баязітов М. Р., Ляшенко А. В., Годлевський Л. С., Приболовєць Т. В., Біднюк К. А.**

Ефективність автоматизованої лапароскопічної діагностики патологічного стану печінки при застосуванні різних методів класифікації цифрових зображень

**Бойцова О. Н.**

Персонифікація периопераційного біомоніторинга

**Сухин Ю. В., Павлычко Ю. Ю., Данилов П. В.**

Эффективность лечения больных с переломами голени после внутрикостного заблокированного остеосинтеза с применением дозатора нагрузки

**Пономаренко О. В., Коваленко І. С.**

Альтернативний спосіб лікування тривало існуючих ранових дефектів тулуба та кінцівок

## Original research

**124 Abramova T. V., Kolesnyk Yu. M.**

Features of the alpha-cell population organization in pancreas of spontaneously hypertensive rats (SHR)

**129 Tumanskiy V. A., Khrystenko T. A.**

The features of transcriptional activity of *K-RAS* gene and expression of ErbB family receptors in intestinal-type gastric adenocarcinoma

**136 Baudardekova M. M., Kalmykova A. V.**

Immunohistochemical Characteristic of the Microenvironment in Squamous Cell Lung Cancer

**142 Mykhailovska N. S., Miniaienko L. Ye.**

Dynamics of structural, functional and vegetative changes of heart under the influence of combined therapy with the use of ursodeoxycholic acid and L-arginine in patients with coronary heart disease associated with nonalcoholic fatty liver disease

**149 Prozorova T. M., Kamyshna V. A., Kamyshnyi O. M.**

Effect of experimental gestational diabetes and administration of glibenclamide on mRNA level of NLRP3-inflammasome and distribution of NLRP3<sup>+</sup>-cells in mesenteric lymph nodes in progeny

**156 Abramov A. V., Shamenko V. A.**

Peculiarities of expression of HIF-1A and HIF-3A in hypothalamus of Wistar rats under the influence of intermittent hypobaric hypoxia

**163 Medvedkova S. O.**

Predictive value of melatonin and serotonin levels in early recovery period of cerebral ischemic hemispheric stroke

**167 Shynkarenko T. V.**

Expression of matrix metalloproteinases in diffuse gliomas: diagnostic value

**172 Kamenshchik A. V., Ivanko O. G.**

Myocardial hypertrophy and intracardial hemodynamics in children with bicuspid aortic valve

**177 Safonov D. N.**

Differential diagnosis algorithm of endogenous catatonia, catatonia-morphic and catatonia-mimicking states

**182 Bayazitov D. N., Kresyun N. V., Buzinovskiy A. B., Bayazitov N. R., Lyashenko A. V., Godlevskiy L. S., Prybolovets T. V., Bidnyuk K. A.**

The effectiveness of automatic laparoscopic diagnostics of liver pathology using different methods of digital images classification

**188 Boitsova O. N.**

Personification of perioperative biomonitring

**193 Sukhin Yu. V., Pavlychko Yu. Yu., Danilov P. V.**

Treatment efficiency of patients with shin fracture after intraosseous blocked osteosynthesis by using the load dispenser

**197 Ponomarenko E. V., Kovalenko I. S.**

Alternative method of treating prolonged wound defects of trunk and extremities

## Оригінальні дослідження

**Туманский В. А., Пирогова З. А.**

Особенности иммуногистохимической экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

**Шаповал О. С.**

Проблемні питання лікування ендометріюїдних кіст яєчників у жінок репродуктивного віку

**Ясинський Р. М., Разнатовська О. М., Конакова О. В., Камишний О. М., Рохманова Н. А., Клименко А. В., Жан-Люк Берланд, Марі Гуйєр**

Ефективність застосування методу GenoType MTBDRplus у діагностиці туберкульозу в Запорізькій області

**Подплетня О. А., Хомяк О. В., Кошова І. П.**

НПЗП: чи може наявність інфекційного агента впливати на вибір знеболювального препарату?

**Воронцова Л. Л., Дуб М. І., Коваленко В. А., Журавльова М. Є.**

Особливості стану цитокінового статусу в інфертильних чоловіків на тлі токсокарозної інвазії

## Огляди

**Туманская Н. В., Клименко А. В., Кичангина Т. М., Ярешко Н. А., Джос И. П.**

Магнитно-резонансная холангиопанкреатография в клинической практике

**Разнатовська О. М., Бобровнича-Двізова Ю. М., Норејко С. Б., Гріцова Н. А.**

Актуальність проблеми поєданого перебігу мультирезистентного туберкульозу легень із цукровим діабетом

## Original research

**202 Tumanskiy V. A., Pyrogova Z. A.**

Immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer

**209 Shapoval O. S.**

Problematic issues of treatment of ovarian endometriomas in women of reproductive age

**214 Yasinskiy R. M., Raznatovska O. M., Konakova O. V., Kamysnyi O. M., Rokhmanova N. A., Klymenko A. V., Jean-Luc Berland, Marie Gauthier**

The effectiveness of GenoType MTBDRplus using in the diagnosis of tuberculosis in Zaporizhzhia region

**219 Podpletnya O. A., Khomiak O. V., Koshova I. P.**

NSAIDs: can the presence of infectious agent influence the choice of analgesic drug?

**224 Vorontsova L. L., Dub M. I., Kovalenko V. A., Zhuravlova M. Ye.**

Features of the state of cytokine status in infertile men against the background of toxocarasis

## Review

**230 Tumanskaya N. V., Klymenko A. V., Kichangina T. M., Yaresko N. A., Dzhos I. P.**

Magnetic resonance cholangiopancreatography in clinical practice

**236 Raznatovska O. M., Bobrovnycha-Dvizova Yu. M., Norejko S. B., Gricova N. A.**

Topicality of the problem of combined course of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis with diabetes mellitus

## Міжнародна індексація журналу / Indexing

**Web of Science:** <http://science.thomsonreuters.com/cgi-bin/jmlst/jlresults.cgi?PC=MASTER&ISSN=2306-8027>

**Ulrich's Periodicals Directory (США)**

**WorldCat (США):** [http://www.worldcat.org/title/patolohiia/oclc/260006269&referer=brief\\_results](http://www.worldcat.org/title/patolohiia/oclc/260006269&referer=brief_results)

**The National Library of Medicine (США):** [http://locatorplus.gov/cgi-bin/Pwebrecon.cgi?v1=1&ti=1,1&SearchArg=Pathologia&Search\\_Code=JALL&SL=None&CNT=25&PID=gATyrKW75IFCFItxUc1ajaR9n&SEQ=20141105025042&SID=3](http://locatorplus.gov/cgi-bin/Pwebrecon.cgi?v1=1&ti=1,1&SearchArg=Pathologia&Search_Code=JALL&SL=None&CNT=25&PID=gATyrKW75IFCFItxUc1ajaR9n&SEQ=20141105025042&SID=3)

**The National Center for Biotechnology Information:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101470944>

**WORLDWIDE ELIBRARY(США):** <http://www.sciary.com/journal-scientific-patology-article-77962>

**getCITED (США):** <http://www.getcited.org/pub/103524559>

**BASE (Bielefeld Academic Search Engine) (ФРН):** <http://www.base-search.net/Search/Results?lookfor=%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F&type=all&oaboost=1&ling=1&name=&thes=&refid=dcesde&newsearch=1>

**JournalTOCs (Великобританія):** [http://www.journaltoCs.ac.uk/index.php?action=browse&subAction=pub&publisherID=2830&journalID=29710&pageb=1&userQueryID=&sort=&local\\_page=1&sortType=&sortCol=1](http://www.journaltoCs.ac.uk/index.php?action=browse&subAction=pub&publisherID=2830&journalID=29710&pageb=1&userQueryID=&sort=&local_page=1&sortType=&sortCol=1)

**CiteFactor (США):** [http://www.citefactor.org/journal/index/10492/pathologia#.VDJGUWd\\_smg](http://www.citefactor.org/journal/index/10492/pathologia#.VDJGUWd_smg)

**Index Copernicus (Польща):** <http://www.journals.indexcopernicus.com/Pathologia,p5665,3.html>

**Google Scholar (Академія):** [http://scholar.google.com.ua/scholar?q=%D0%B6%D1%83%D1%80%D0%BD%D0%B0%D0%BB+%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F%2C+Pathologia&btnG=&hl=ru&as\\_sdt=1%2C5&as\\_ylo=2014&as\\_vis=1](http://scholar.google.com.ua/scholar?q=%D0%B6%D1%83%D1%80%D0%BD%D0%B0%D0%BB+%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F%2C+Pathologia&btnG=&hl=ru&as_sdt=1%2C5&as_ylo=2014&as_vis=1)

**DOAJ (Великобританія):** <https://doaj.org/toc/2310-1237>

## Особенности организации популяции альфа-клеток в поджелудочной железе у крыс со спонтанной гипертензией (SHR)

Т. В. Абрамова, Ю. М. Колесник

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

### Ключевые слова:

$\alpha$ -клетки, глюкагон, артериальная гипертензия.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 124–128

DOI: 10.14739/2310-1237.2017.2.109249

E-mail: abramov@zsmu.pp.ua

Альфа-клетки панкреатических островков составляют вторую по численности популяцию эндокриноцитов поджелудочной железы, а синтезируемый в них глюкагон играет важную роль в регуляции гомеостаза глюкозы. При этом глюкагон-супрессивная терапия определяется как стратегически главный источник успеха лечения пациентов с сахарным диабетом 2 типа. В клинической практике диабет часто ассоциирован с гипертонической болезнью в метаболическом синдроме, что и обуславливает интерес к патофизиологии  $\alpha$ -эндокриноцитов.

**Цель работы** – изучить параметры распределения  $\alpha$ -клеток в панкреатических островках поджелудочной железы у гипертензивных крыс линии SHR и охарактеризовать морфофункциональное состояние глюкагон-синтезирующих эндокриноцитов.

**Материалы и методы.** В гистологических срезах поджелудочной железы иммунофлуоресцентным методом выявляли глюкагон; анализировали площадь панкреатических островков, количество в них  $\alpha$ -клеток, концентрацию в клетках иммунореактивного глюкагона, удельные показатели распределения островков,  $\alpha$ -клеток и глюкагона на единицу площади железы. Результаты обрабатывали пакетом статистических программ, для оценки достоверности различий в группах применяли t-критерий Стьюдента и W-критерий Уилкоксона.

**Результаты.** У нормогликемических гипертензивных крыс линии SHR количество островков, содержащих глюкагон-синтезирующие  $\alpha$ -клетки, было на 10 % больше ( $p < 0,05$ ), чем у нормотензивных крыс линии Wistar. В ткани поджелудочной железы у крыс обеих линий встречались единичные  $\alpha$ -эндокриноциты, не формирующие отдельные островки. У крыс линии SHR в гигантских островках насчитывалось на 72 % больше  $\alpha$ -эндокриноцитов, чем у крыс линии Wistar, а в больших островках это различие было двукратным. Соответственно,  $\alpha$ -клетки этих островков вносили существенный вклад в более высокие показатели содержания глюкагона в поджелудочной железе гипертензивных крыс: в гигантских островках количество гормона было на 80 %, а в больших островках – в 3,6 раза выше, чем у нормотензивных крыс. В работе обсуждаются механизмы, приводящие к повышению численности  $\alpha$ -клеток в поджелудочной железе гипертензивных крыс.

**Выводы.** Панкреатические островки нормогликемических гипертензивных крыс линии SHR характеризуются увеличением пула  $\alpha$ -эндокриноцитов, численность которых в 1,9 раза больше, чем у нормотензивных крыс линии Wistar. У крыс линии SHR в поджелудочной железе наблюдается увеличение удельного содержания глюкагона, количество которого в 2 раза превышает показатели у нормотензивных крыс линии Wistar.

### Ключові слова:

$\alpha$ -клітини, глюкагон, артеріальна гіпертензія.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 124–128

## Особенности организации популяции альфа-клетин у подшлунковой железе в шурив із спонтанною гіпертензією (SHR)

Т. В. Абрамова, Ю. М. Колесник

Альфа-клітини панкреатичних острівців становлять другу за чисельністю популяцію ендокриноцитів підшлункової залози, а глюкагон, що синтезується в них, відіграє важливу роль у регуляції гомеостазу глюкози. При цьому глюкагон-супресивна терапія є стратегічно головним джерелом успіху для пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу. У клінічній практиці діабет часто асоційований із гіпертонічною хворобою в метаболічному синдромі, що й зумовлює інтерес до патофізіології  $\alpha$ -ендокриноцитів.

**Мета роботи** – вивчити параметри розподілу  $\alpha$ -клітин у панкреатичних острівцях підшлункової залози в гіпертензивних шурив лінії SHR і схарактеризувати морфофункціональний стан глюкагон-синтезуючих ендокриноцитів.

**Матеріали та методи.** У гістологічних зрізах підшлункової залози імунофлуоресцентним методом виявляли глюкагон; аналізували площу панкреатичних острівців, кількість у них  $\alpha$ -клітин, концентрацію в клітинах імунореактивного глюкагону, питомі показники розподілу острівців,  $\alpha$ -клітин і глюкагону на одиницю площі залози. Результати опрацювали за допомогою пакета статистичних програм, для оцінювання вірогідності відмінностей у групах застосовували t-критерій Стьюдента та W-критерій Вілкоксона.

**Результати.** У нормоглікемічних гіпертензивних шурив лінії SHR кількість острівців, що містять глюкагон-синтезуючі  $\alpha$ -клітини, була на 10 % більшою ( $p < 0,05$ ), ніж у нормотензивних шурив лінії Wistar. У тканині підшлункової залози в шурив обох ліній виявлялись поодинокі  $\alpha$ -ендокриноцити, що не формують окремі острівці. У шурив лінії SHR у гігантських острівцях налічували на 72 % більше  $\alpha$ -ендокриноцитів, ніж у шурив лінії Wistar, а у великих острівцях ця різниця була дворазовою. Відповідно,  $\alpha$ -клітини цих острівців робили суттєвий внесок у вищі показники вмісту глюкагону в підшлунковій залозі гіпертензивних шурив: у гігантських острівцях кількість гормона була на 80 %, а у великих острівцях – у 3,6 рази вищою, ніж у нормотензивних шурив. У роботі обговорюються механізми, що призводять до підвищення чисельності  $\alpha$ -клітин у підшлунковій залозі гіпертензивних шурив.

**Висновки.** Панкреатичні острівці нормоглікемічних гіпертензивних шурив лінії SHR характеризуються збільшенням пулу  $\alpha$ -ендокриноцитів, чисельність яких в 1,9 рази більша, ніж у нормотензивних шурив лінії Wistar. У шурив лінії SHR у підшлунковій залозі спостерігається збільшення питомого змісту глюкагону, кількість якого вдвічі перевищує показники в нормотензивних шурив лінії Wistar.

## Features of the alpha-cell population organization in pancreas of spontaneously hypertensive rats (SHR)

T. V. Abramova, Yu. M. Kolesnyk

Alpha cells of pancreatic islets constitute the second largest population of pancreatic endocrinocytes, and the glucagon synthesized in them plays an important role in the regulation of glucose homeostasis. At the same time, glucagon-suppressive therapy is defined as the strategically main source of success of therapy for patients with type 2 diabetes mellitus. In clinical practice, diabetes is often associated with hypertension in the metabolic syndrome, which causes interest in the pathophysiology of  $\alpha$ -endocrinocytes.

**The aim** of the study was to investigate the distribution parameters of  $\alpha$ -cells in the pancreatic islets of SHR and to characterize the morphological and functional state of glucagon-synthesizing endocrinocytes.

**Materials and methods.** In the histological sections of the pancreas, glucagon was detected by the immunofluorescence method; the area of pancreatic islets, as well as the number of  $\alpha$ -cells in them, the concentration of immunoreactive glucagon in these cells, the specific indices of the distribution of islets,  $\alpha$ -cells and glucagon per unit area of the gland. The results were processed with a package of statistical programs, to assess the reliability of the differences in the groups, the Student's t-test and the Wilcoxon W-test were used.

**Results.** In normoglycemic SHR, the number of islets containing glucagon-synthesizing  $\alpha$ -cells was 10 % more ( $p < 0.05$ ) than in normotensive Wistar rats. In the pancreatic tissue, single  $\alpha$ -endocrine cells were found in rats of both lines, not forming separate islets. In giant islets of SHR there were 72 % more  $\alpha$ -endocrine cells than in Wistar rats, and in large islets this difference was twofold. Accordingly,  $\alpha$ -cells of these islets contributed significantly to higher glucagon levels in the pancreas of hypertensive rats: in giant islets, the amount of the hormone was 80 %, and in large islets – 3.6 times higher than in normotensive rats. In this paper we discuss the mechanisms that lead to an increase in the number of  $\alpha$ -cells in the pancreas of hypertensive rats.

**Conclusions.** Pancreatic islets of normoglycemic SHR are characterized by an increase in the  $\alpha$ -endocrinocyte pool, which number is 1.9 times greater than in normotensive Wistar rats. In SHR in the pancreas, an increase in the specific glucagon content is observed, one's amount is 2 times higher than that of normotensive rats of the Wistar line.

Альфа-клетки панкреатических островков составляют вторую по численности (15–20 %) после инсулин-синтезирующих  $\beta$ -клеток популяцию эндокриноцитов поджелудочной железы [1,2]. Синтезирующийся в  $\alpha$ -клетках глюкагон играет важную роль в регуляции гомеостаза глюкозы, активируя в печени глюконеогенез и повышая тем самым уровень гликемии. Более чем 40 лет назад Unger и Orci [3], предложив биогормональную гипотезу патогенеза сахарного диабета, рассматривали инсулин и глюкагон как ключевые и равнозначные регуляторы гомеостаза глюкозы. В настоящее время всё больше исследователей, в том числе и сам R. H. Unger, склоняются к глюкагоноцентрической теории патогенеза диабета [4], определяя глюкагон-супрессивную терапию как стратегически главный источник успеха терапии пациентов с сахарным диабетом 2 типа [4,5]. В этой связи понятен возрастающий интерес к физиологии и патофизиологии  $\alpha$ -эндокриноцитов не только в норме или при экспериментальной и клинической эндокринной патологии [6,7], но и в случае развития неэндокринных заболеваний. К последним можно отнести гипертоническую болезнь, которая патогенетически не связана с сахарным диабетом, но часто с ним ассоциирована в так называемом метаболическом синдроме. В предыдущих исследованиях нами показано, что формирование наследственной артериальной гипертензии у половозрелых крыс линии SHR сопровождается нарушением цитоархитектоники панкреатических островков, уменьшением пула  $\beta$ -эндокриноцитов и удельного содержания инсулина в поджелудочной железе [8,9]. Подобное ремоделирование инсулярного аппарата, которое происходит на фоне нарушения липидного обмена у крыс линии SHR, способствует нарушению толерантности к глюкозе [10] и может рассматриваться как фактор риска развития метаболического синдрома.

### Цель работы

Изучить параметры распределения  $\alpha$ -клеток в панкреатических островках поджелудочной железы у гипертензивных крыс линии SHR и охарактеризовать морфофункциональное состояние глюкагон-синтезирующих эндокриноцитов.

### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 10 нормотензивных самцах крыс линии Wistar (систолическое АД – 105,0  $\pm$  1,1 мм рт. ст.; масса животных – 232  $\pm$  7 г; уровень гликемии натощак – 3,94  $\pm$  0,09 ммоль/л) и 15 гипертензивных крысах линии SHR (систолическое АД – 155,7  $\pm$  0,9 мм рт. ст.; масса животных – 306  $\pm$  5 г) с нормогликемией натощак (4,73  $\pm$  0,10 ммоль/л). Величину АД измеряли с помощью системы неинвазивного контроля давления BP-2000 (Visitech Systems, США). Концентрацию глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, определяли глюкометром GlucoCard-II (Япония). Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении без ограничения доступа к воде и пище.

Поджелудочную железу извлекали после декапитации экспериментальных животных под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг), фиксировали в жидкости Буэна (20 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парапласт (McCormick, США). На ротационном микротоме Microm-325 (Microm Corp., ФРГ) готовили серийные срезы поджелудочной железы толщиной 5 мкм, которые депарафинировали и демаскировали в цитратном буферном растворе (pH = 9,0) в РТ-модуле (Thermo Scientific, США). Глюкагон в поджелудочной железе выявляли иммунофлюоресцентным методом:

**Key words:**  
 $\alpha$ -cells,  
glucagon,  
hypertension.

**Pathologia**  
2017; 14 (2), 124–128

срезы инкубировали с козьими IgG к глюкагону крысы (sc-7779, Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:200 (влажная камера, T = +4 °C, 24 часа), затем с мышиными IgG к IgG козы, конъюгированными с FITC (sc-2356, Santa Cruz Biotechnology, США), в разведении 1:64 (влажная камера, T = +37 °C, 45 мин) и заключали в смесь глицерин/фосфатный буфер (9:1). Контроль специфичности связывания антител проводили аналогичным образом, за исключением инкубации с первичными антителами.

Изучение иммунофлуоресцентной реакции проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImager-M2 (Carl Zeiss, ФРГ), оснащённом камерой AxioCam-HRm (Carl Zeiss, ФРГ), с применением высокоэмиссионного светофильтра 38HE ( $\lambda_{ex} = 470/40$  нм,  $\lambda_{em} = 525/50$  нм) (Carl Zeiss, ФРГ). Количественный анализ иммунофлуоресцентной реакции проводили с помощью системы цифрового анализа изображения AxioVision-4.8.2 (Carl Zeiss, ФРГ). Панкреатические островки классифицировали в зависимости от величины площади их поперечного сечения. Концентрацию иммунореактивного глюкагона в  $\alpha$ -клетках вычисляли как десятичный логарифм отношения интенсивности флуоресценции секреторных гранул к неспецифической флуоресценции ацинарной ткани железы и выражали в условных единицах флуоресценции ( $E_{i\alpha}$ ). Содержание глюкагона в поджелудочной железе рассчитывали как произведение концентрации глюкагона, площади иммунореактивного материала в клетке и удельного количества  $\alpha$ -клеток (с учётом представительности островков различных типов) и выражали в единицах  $E_{i\alpha}$  на 1 см<sup>2</sup> площади среза железы. Исследовали не менее 5 см<sup>2</sup> суммарной площади срезов поджелудочной железы у каждого животного.

Экспериментальные данные обрабатывали пакетом программ для статистического анализа EXCEL 2003 (Microsoft Corp.) с интегрированной программной надстройкой AtteStat [11]. Данные с непрерывным распределением представляли в виде средней величины и ошибки средней ( $M \pm m$ ), а дискретно распределённые данные (количество клеток, островков) – в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ( $Q1 \div Q3$ ). Достоверность различий между экспериментальными группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (для непрерывно распределённых и данных с нормальным распределением) и W-критерия Уилкоксона (для

дискретно распределённых данных), считая различия достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ распределения панкреатических островков в поджелудочной железе показал: количество островков, содержащих глюкагон-синтезирующие  $\alpha$ -клетки, у гипертензивных крыс линии SHR было на 10 % больше ( $p < 0,05$ ), чем у нормотензивных крыс линии Wistar (табл. 1).

При этом достоверные различия в характере распределения островков различного типа отмечались только со стороны больших островков (площадью 3500 – 7500 мкм<sup>2</sup>), количество которых в поджелудочной железе было на 65 % больше у крыс линии SHR. Примечательно, что в ткани поджелудочной железы у крыс обеих линий встречались единичные  $\alpha$ -эндокриноциты, не формирующие отдельные островки. Единичные  $\alpha$ -клетки нормотензивных крыс отличались от эндокриноцитов сформированных островков на 12–13 % меньшей площадью ( $p < 0,05$ ) с более высокой (на 13–36 %,  $p < 0,01$ ) концентрацией глюкагона в цитоплазме (табл. 2).

У гипертензивных крыс площадь единичных  $\alpha$ -клеток была также меньше, чем эндокриноцитов сформированных островков (на 20–22 %,  $p < 0,05$ ), однако и концентрация глюкагона в них была на 13–32 % ниже ( $p < 0,05$ ). В то же время, если показатели площади  $\alpha$ -клеток сформированных островков у животных обеих линий не отличались, то концентрация глюкагона в маленьких и средних островках у крыс линии SHR была меньше на 21 % и 11 % соответственно ( $p < 0,05$ ).

Следует отметить, что у гипертензивных крыс линии SHR в гигантских островках (площадью более 7500 мкм<sup>2</sup>) насчитывалось на 72 % больше  $\alpha$ -эндокриноцитов, чем у крыс линии Wistar, а в больших островках это различие было двукратным (табл. 2). Соответственно,  $\alpha$ -клетки этих островков вносили существенный вклад в более высокие показатели содержания глюкагона в поджелудочной железе гипертензивных крыс: в гигантских островках количество гормона было на 80 %, а в больших островках – в 3,6 раза выше, чем у нормотензивных крыс. При этом удельное содержание глюкагона в поджелудочной железе у

**Таблица 1.** Параметры распределения панкреатических островков, содержащих  $\alpha$ -клетки, в поджелудочной железе (на 1 см<sup>2</sup> площади среза) крыс линии Wistar (числитель) и линии SHR (знаменатель)

Тип островков	Количество островков, Me (Q1 ÷ Q3)	Количество клеток, Me (Q1 ÷ Q3)	Содержание глюкагона, $E_{i\alpha}$ , M ± m
Единичные $\alpha$ -клетки	1 (1 ÷ 3) 2 (1 ÷ 3)	1 (1 ÷ 3) 2 (1 ÷ 3)	8,6 ± 1,5 6,4 ± 0,9
Маленькие, площадью <1500 мкм <sup>2</sup>	12 (9 ÷ 17) 15 (8 ÷ 18)	107 (75 ÷ 116) 109 (68 ÷ 126)	409 ± 24 368 ± 46
Средние, площадью 1500–3500 мкм <sup>2</sup>	15 (14 ÷ 18) 12 (8 ÷ 17)	211 (141 ÷ 272) 145 (105 ÷ 188)	784 ± 45 681 ± 56
Большие, площадью 3500–7500 мкм <sup>2</sup>	9 (6 ÷ 17) 21 (19 ÷ 24)*	257 (121 ÷ 397) 766 (729 ÷ 911)*	1125 ± 54 4102 ± 118*
Гигантские, площадью >7500 мкм <sup>2</sup>	9 (9 ÷ 9) 8 (6 ÷ 16)	507 (312 ÷ 543) 639 (440 ÷ 1415)	2103 ± 148 3802 ± 132*
Всего (M ± m)	53 ± 1 59 ± 1**	1051 ± 23 1951 ± 50**	4428 ± 30 8959 ± 39*

\*: во всех таблицах указана достоверность отличий  $p < 0,05$  для t-критерия Стьюдента; #: для W-критерия Уилкоксона.

**Таблица 2.** Характеристика  $\alpha$ -клеток поджелудочной железы у крыс линии Wistar (числитель) и линии SHR (знаменатель)

Тип островков	Количество $\alpha$ -клеток в плоскости сечения островка, Ме (Q1 $\div$ Q3)	Площадь $\alpha$ -клетки, мкм <sup>2</sup> , M $\pm$ m	Концентрация глюкагона в $\alpha$ -клетке, Ме <sub>эф</sub> , M $\pm$ m
Единичные $\alpha$ -клетки	1 1	52,0 $\pm$ 2,2 46,7 $\pm$ 2,8	90,0 $\pm$ 16,7 49,9 $\pm$ 2,3
Маленькие, площадью <1500 мкм <sup>2</sup>	6 (4 $\div$ 11) 6 (4 $\div$ 9)	59,3 $\pm$ 0,7 60,6 $\pm$ 1,2	73,5 $\pm$ 3,7 58,0 $\pm$ 0,4*
Средние, площадью 1500–3500 мкм <sup>2</sup>	11 (8 $\div$ 14) 12 (8 $\div$ 20)	60,0 $\pm$ 0,5 60,0 $\pm$ 0,4	65,5 $\pm$ 2,7 58,3 $\pm$ 2,1*
Большие, площадью 3500–7500 мкм <sup>2</sup>	20 (16 $\div$ 27) 44 (37 $\div$ 52) <sup>#</sup>	60,2 $\pm$ 0,2 60,2 $\pm$ 1,0	66,2 $\pm$ 1,7 71,8 $\pm$ 3,5
Гигантские, площадью >7500 мкм <sup>2</sup>	42 (33 $\div$ 57) 75 (70 $\div$ 94) <sup>#</sup>	60,2 $\pm$ 0,6 60,0 $\pm$ 0,05	69,6 $\pm$ 2,8 73,8 $\pm$ 2,8

крыс линии SHR в 2 раза превышало аналогичный показатель крыс линии Wistar, равно как и удельный показатель численности  $\alpha$ -эндокриноцитов был в 1,9 раза больше у гипертензивных животных (табл. 1).

Таким образом, проведённые исследования показали, что, в отличие от нормотензивных крыс линии Wistar, у гипертензивных крыс линии SHR нормогликемия наблюдалась на фоне более высокого количества  $\alpha$ -эндокриноцитов и содержания глюкагона в поджелудочной железе. Полученные данные подразумевают и более высокие значения глюкагонемии у этих животных, которая сочетается, как ранее было показано [8, 10], с более высоким уровнем инсулина в крови: 10,99  $\pm$  0,37 мкМЕ/мл по сравнению с 8,61  $\pm$  0,41 мкМЕ/мл у крыс линии Wistar. Очевидно, что в данном случае у гипертензивных крыс слабо выражен или редуцирован паракринный эффект инсулина, который должен угнетать секрецию глюкагона в панкреатических островках не только в норме, но и при экзогенном введении инсулина животным с аллоксановым или стрептозототин-индуцированным сахарным диабетом [4, 12]. Увеличение пула  $\alpha$ -эндокриноцитов и синтеза глюкагона в поджелудочной железе в определённой мере объясняет ранее выявленные нами нарушения липидного обмена у крыс линии SHR [10], которые, очевидно, являются следствием усиления липолиза в условиях гиперглюкагонемии.

Вместе с тем причина, по которой у гипертензивных крыс линии SHR наблюдается увеличение пула  $\alpha$ -эндокриноцитов, остаётся не вполне понятной. Возможно, генетически детерминированное развитие гипертензии у крыс линии SHR сочетается с нарушением модуляции транскрипционного фактора NeuroD1/B2, реализующего стратегию дифференцировки эмбриональных эндокриноцитов в отдельные линии  $\alpha$ - и  $\beta$ -клеток [13], и/или более активной экспрессией гена глюкагона в эмбриональных эндокриноцитах под влиянием транскрипционных факторов Brn-4 [14] и Arx [4], что приводит к преобладанию  $\alpha$ -клеточного фенотипа в островках. В предыдущей нашей работе мы обсуждали возможные механизмы, приводящие к уменьшению пула  $\beta$ -эндокриноцитов в поджелудочной железе у гипертензивных крыс линии SHR [9]. Аналогичное уменьшение численности  $\beta$ -клеток, которое наблюдается у мышей линии db/db со 2 типом диабета, сопровождается редуциацией синтеза мРНК к ключевым регуляторам дифференцировки  $\beta$ -эндокриноцитов – Nkx6.1, NeuroD1/B2, Pdx1 [15].

В то же время снижение экспрессии гена инсулина и сопряжённых с ним транскрипционных факторов приводит к усилению экспрессии транскрипционных факторов, активирующих ген глюкагона – Pax6, Foxa1, Foxa2 [16]. Возможно, данный механизм лежит в основе увеличения пула  $\alpha$ -клеток у гипертензивных крыс линии SHR и является проявлением контравегагантной реакции на редуциацию пула  $\beta$ -клеток.

Другое возможное объяснение увеличения массы  $\alpha$ -эндокриноцитов и содержания глюкагона в поджелудочной железе у гипертензивных крыс линии SHR может быть связано с механизмами симпатической и парасимпатической иннервации панкреатических островков, играющей важную роль в индукции секреции глюкагона. Достаточно хорошо известно, что симпатическая иннервация является наиболее сильным стимулятором секреции глюкагона в поджелудочной железе [17, 18]. При этом вопрос о том, что имеет больший приоритет в обеспечении глюкагон-опосредованного контроля уровня гликемии: центральные механизмы, определяемые активностью нейронов вентромедиального ядра гипоталамуса («мозговой сенсор глюкозы») и дорсального комплекса n. vagus, или активность автономной нервной системы – до настоящего времени является предметом дискуссии [19]. В то же время нейрогенные механизмы патогенеза гипертонической болезни у человека хорошо изучены и являются одной из мишеней фармакотерапии, равно как и в экспериментальной медицине нейрогенные механизмы моделирования гипертензии у лабораторных животных используются и в настоящее время [20]. Следовательно, более высокий уровень активности симпатического отдела автономной нервной системы у гипертензивных крыс линии SHR может оказывать стимулирующий эффект на секрецию глюкагона  $\alpha$ -клетками панкреатических островков.

## Выводы

1. Панкреатические островки нормогликемических гипертензивных крыс линии SHR характеризуются увеличением пула  $\alpha$ -эндокриноцитов, численность которых в 1,9 раза больше, чем у нормотензивных крыс линии Wistar.

2. У крыс линии SHR в поджелудочной железе наблюдается увеличение удельного содержания глюкагона, количество которого в 2 раза превышает показатели у нормотензивных крыс линии Wistar.

## Список литературы

- [1] Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy / M. Brissova, M. Fowler, W. Nicholson, et al. // *Journal of Histochemistry, Cytochemistry*. – 2005. – Vol. 53. – №9. – P. 1087–1097.
- [2] Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes / I. Quesada, E. Tuduri, C. Ripoll, A. Nadal // *Journal of Endocrinology*. – 2008. – Vol. 199. – №1. – P. 5–19.
- [3] Unger R. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus // R. Unger, L. Orci // *The Lancet*. – 1975. – Vol. 1(7897). – P. 14–16.
- [4] Unger R. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover / R. Unger, A. Cherrington // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Vol. 122. – №1. – P. 4–12.
- [5] The Alpha-Cell as Target for Type 2 Diabetes Therapy / M. Christensen, J. Bagger, T. Vilsboll, F. Knop // *The Review of Diabetic Studies*. – 2011. – Vol. 8. – №3. – P. 369–381.
- [6] Ahrén B. Glucagon – Early breakthroughs and recent discoveries / B. Ahrén // *Peptides*. – 2015. – Vol. 67. – P. 74–81.
- [7] Valverde I. An overview of glucagon research / I. Valverde // *Diabetologia*. – 2016. – Vol. 59. – №7. – P. 1364–1366.
- [8] Abramova T. The distribution of the islets of Langerhans in pancreas of euglycemic spontaneously hypertensive rats / T. Abramova // *Патологія*. – 2016. – №1(36). – С. 19–21.
- [9] Abramova T. The features of beta-cells organization in the pancreas of spontaneously hypertensive rat (SHR) / T. Abramova, Y. Kolesnyk // *Патологія*. – 2016. – №3(38). – С. 4–8.
- [10] Metabolic disturbances in hypertensive rats / O. Gancheva, Y. Kolesnik, T. Abramova et al. // *Клінічна фармація*. – 2013. – Т. 17. – №4. – С. 56–58.
- [11] Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++ / И.П. Гайдышев. – СПб. : БХВ–Петербург, 2004. – 504 с.
- [12] Gromada J.  $\alpha$ -Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains / J. Gromada, I. Franklin, C. Wollheim // *Endocrine Reviews*. – 2007. – Vol. 28. – №1. – P. 84–116.
- [13] Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in  $\beta$ TA2/NeuroD-deficient mice / F. Naya, H. Huang, Y. Qiu et al. // *Genes and Development*. – 1997. – №11(18). – P. 2323–2334.
- [14] Hussain M. Brn-4 Transcription Factor Expression Targeted to the Early Developing Mouse Pancreas Induces Ectopic Glucagon Gene Expression in Insulin-producing beta Cells / M. Hussain, C. P. Miller, J. F. Habener // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – №18. – P. 16028–16032.
- [15] Chronic Hyperglycemia, Independent of Plasma Lipid Levels, Is Sufficient for the Loss of  $\beta$ Cell Differentiation and Secretory Function in the db/db Mouse Model of Diabetes / C. Kjørholt, M. Akerfeldt, T. Biden, D. Laybutt // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – №9. – P. 2755–2763.
- [16] Gosmain Y. Glucagon: The renewal of an old hormone in the pathophysiology of diabetes / Y. Gosmain, M. Masson, J. Philippe // *Journal of Diabetes*. – 2013. – Vol. 5. – №2. – P. 102–109.
- [17] Ahrén B. Sympathetic Nerve Stimulation Versus Pancreatic Norepinephrine Infusion in the Dog: 1) Effects on Basal Release of Insulin and Glucagon / B. Ahrén, R. Veith, G. Taborsky // *Endocrinology*. – 1987. – Vol. 121. – №1. – P. 323–331.
- [18] Taborsky G. The Physiology of Glucagon / G. Taborsky // *Journal of Diabetes Science And Technology*. – 2010. – Vol. 4. – №6. – P. 1338–1344.
- [19] Abraham M. Glucagon action in the brain / M. Abraham, T. Lam // *Diabetologia*. – 2016. – Vol. 59. – №7. – P. 1367–1371.
- [20] Animal models of hypertension: An overview / L. Lerman, A. Chade, V. Sica, C. Napoli // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 2005. – Vol. 146. – №3. – P. 160–173.
- [7] Valverde, I. (2016). An overview of glucagon research. *Diabetologia*, 59(7), 1364–1366. doi: 10.1007/s00125-016-3946-z.
- [8] Abramova, T. (2016). The distribution of the islets of Langerhans in pancreas of euglycemic spontaneously hypertensive rats. *Pathologia*, 1(36), 19–21. doi: 10.14739/2310-1237.2016.1.72359.
- [9] Abramova, T., & Kolesnyk, Y. (2016). The features of beta-cells organization in the pancreas of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Pathologia*, 3(38), 4–8. doi: 10.14739/2310-1237.2016.3.86931.
- [10] Gancheva, O., Kolesnik, Y., Abramova, T., Samoylenko, N., & Abramov, A. (2013). Metabolic disturbances in hypertensive rats. *Klinichna farmatsiia*, 17(4), 56–58.
- [11] Gajdyshev, I. (2004). *Reshenie nauchnykh i inzhenernykh zadach sredstvami Excel, VBA i C/C++ [Solving the scientific and engineer tasks using Excel, VBA u C/C++]*. Saint Petersburg: BHV-Peretburg. [in Russian].
- [12] Gromada, J., Franklin, I., & Wollheim, C. (2007).  $\alpha$ -Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains. *Endocrine Reviews*, 28(1), 84–116. doi: 10.1210/er.2006-0007.
- [13] Naya, F., Huang, H., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F., Leiter, A., & Tsai, M. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in  $\beta$ TA2/NeuroD-deficient mice. *Genes & Development*, 11(18), 2323–2334. doi: 10.1101/gad.11.18.2323.
- [14] Hussain, M., Miller, C. P., & Habener, J. F. (2002). Brn-4 Transcription Factor Expression Targeted to the Early Developing Mouse Pancreas Induces Ectopic Glucagon Gene Expression in Insulin-producing beta Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16028–16032. doi: 10.1074/jbc.M107124200.
- [15] Kjørholt, C., Akerfeldt, M., Biden, T., & Laybutt, D. (2005). Chronic Hyperglycemia, Independent of Plasma Lipid Levels, Is Sufficient for the Loss of  $\beta$ Cell Differentiation and Secretory Function in the db/db Mouse Model of Diabetes. *Diabetes*, 54(9), 2755–2763. doi: 10.2337/diabetes.54.9.2755.
- [16] Gosmain, Y., Masson, M., & Philippe, J. (2013). Glucagon: The renewal of an old hormone in the pathophysiology of diabetes. *Journal of Diabetes*, 5(2), 102–109. doi: 10.1111/1753-0407.12022.
- [17] Ahrén, B., Veith, R., & Taborsky, G. (1987). Sympathetic Nerve Stimulation Versus Pancreatic Norepinephrine Infusion in the Dog: 1) Effects on Basal Release of Insulin and Glucagon. *Endocrinology*, 121(1), 323–331. doi: 10.1210/endo-121-1-323.
- [18] Taborsky, G. (2010). The Physiology of Glucagon. *Journal of Diabetes Science And Technology*, 4(6), 1338–1344. doi: 10.1177/193229681000400607.
- [19] Abraham, M., & Lam, T. (2016). Glucagon action in the brain. *Diabetologia*, 59(7), 1367–1371. doi: 10.1007/s00125-016-3950-3.
- [20] Lerman, L., Chade, A., Sica, V., & Napoli, C. (2005). Animal models of hypertension: An overview. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 146(3), 160–173. doi: 10.1016/j.lab.2005.05.005.

## References

- [1] Brissova, M., Fowler, M., Nicholson, W., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D., & Powers, A. (2005). Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(9), 1087–1097. doi: 10.1369/jhc.5C6684.2005.
- [2] Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C., & Nadal, A. (2008). Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*, 199(1), 5–19. doi: 10.1677/JOE-08-0290.
- [3] Unger, R., & Orci, L. (1975). The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *The Lancet*, 1(7897), 14–16.
- [4] Unger, R., & Cherrington, A. (2012). Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 4–12. doi: 10.1172/JCI60016.
- [5] Christensen, M., Bagger, J., Vilsboll, T., & Knop, F. (2011). The Alpha-Cell as Target for Type 2 Diabetes Therapy. *The Review of Diabetic Studies*, 8(3), 369–381. doi: 10.1900/RDS.2011.8.369.
- [6] Ahrén, B. (2015). Glucagon – Early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides*, 67, 74–81. doi: 10.1016/j.peptides.2015.03.011.

## Сведения об авторах:

Абрамова Т. В., ассистент каф. детских болезней ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, ректор Запорожского государственного медицинского университета, Украина.

## Відомості про авторів:

Абрамова Т. В., асистент каф. дитячих хвороб ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, ректор Запорізького державного медичного університету, Україна.

## Information about authors:

Abramova T. V., Assistant of the Department of Pediatrics of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSci, Professor, Department of Pathological Physiology, Rector of Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 22.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 25.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 01.06.2017



# Особенности транскрипционной активности гена *K-RAS* и экспрессии рецепторов семейства ErbB в аденокарциноме желудка кишечного типа

В. А. Туманский, Т. А. Христенко

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

**Цель работы** – изучить особенности экспрессии мПНК гена *K-RAS*, а также ростовых рецепторов семейства ErbB (EGFR и HER2/neu) опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа и их взаимосвязь с уровнями клеточной пролиферации и апоптоза.

**Материалы и методы.** Проведено патогистологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследование аденокарциномы желудка кишечного типа у 30 пациентов 49–86 лет, а также 10 образцов слизистой оболочки желудка обычной гистологической структуры.

**Результаты.** Установлено, что аденокарцинома желудка кишечного типа характеризуется повышенным уровнем экспрессии мПНК гена *K-RAS* [Me = 3,62 (0,57; 5,87)]. Имеется обратная слабая корреляционная связь между возрастом уровня экспрессии мПНК гена *K-RAS* и снижением степени гистологической дифференцировки опухоли от G3 до G1 ( $r = -0,36$ ). В 100 % аденокарцином желудка кишечного типа выявлена мембранная экспрессия рецепторов EGFR и HER2/neu. При этом выраженная (++/+++ ) экспрессия EGFR имеет место в 76,66 % аденокарцином, в то время как HER2 позитивные (+++) составили 46,66 %. Имеется прямая сильная корреляционная связь между показателями экспрессии опухолевыми клетками рецепторов EGFR и HER2/neu ( $r = 0,80$ ), прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии маркеров EGFR и Ki-67 ( $r = 0,53$ ), а также прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии маркера EGFR и мПНК гена *K-RAS* ( $r = 0,57$ ). Не выявлено корреляций между уровнями экспрессии опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа маркеров апоптоза (p53 и каспазы-3), рецепторов EGFR и HER-2/neu, а также уровнем экспрессии мПНК гена *K-RAS*.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что возрастание экспрессии рецепторов EGFR и HER2/neu клетками аденокарциномы желудка кишечного типа приводит к активации транскрипции и трансляции гена *K-RAS* с последующей активацией ERK-сигнального пути, реализующего пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Определение ErbB-рецепторного статуса аденокарциномы желудка кишечного типа целесообразно учитывать при выборе индивидуализированной таргетной терапии.

## Ключевые слова:

рак желудка, аденокарцинома, рецепторы факторов роста, пролиферация, апоптоз.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 129–135

**DOI:**  
10.14739/2310-1237.2017.2.109250

**E-mail:**  
hristenkota@i.ua

# Особливості транскрипційної активності гена *K-RAS* та експресії рецепторів сімейства ErbB в аденокарциномі шлунка кишкового типу

В. О. Туманський, Т. О. Христенко

**Мета роботи** – вивчити особливості експресії мПНК гена *K-RAS*, а також ростових рецепторів сімейства ErbB (EGFR і HER2/neu) пухлинними клітинами аденокарциноми шлунка кишкового типу та їхній взаємозв'язок із рівнями проліферації та апоптозу.

**Матеріали та методи.** Здійснили патогістологічне, імуногістохімічне та молекулярно-генетичне дослідження аденокарциноми шлунка кишкового типу у 30 пацієнтів 49–86 років, а також 10 зразків слизової оболонки шлунка звичайної гістологічної будови.

**Результати.** Установлено, що аденокарцинома шлунка кишкового типу характеризується підвищеним рівнем експресії мПНК гена *K-RAS* [Me = 3,62 (0,57; 5,87)]. Наявний зворотний слабкий кореляційний зв'язок між зростанням рівня експресії мПНК гена *K-RAS* і зниженням ступеня гістологічного диференціювання пухлини від G3 до G1 ( $r = -0,36$ ). У 100 % аденокарцином шлунка кишкового типу виявлено мембранну експресію рецепторів EGFR і HER2/neu. При цьому виразна (++/+++ ) експресія EGFR спостерігалась у 76,66 % аденокарцином, тоді як HER2 позитивні (+++) пухлини становили 46,66 %. Наявний прямий сильний кореляційний зв'язок між показниками експресії пухлинними клітинами рецепторів EGFR і HER2/neu ( $r = 0,80$ ), прямий середньої сили кореляційний зв'язок між показниками експресії маркерів EGFR і Ki-67 ( $r = 0,53$ ), а також прямий середньої сили кореляційний зв'язок між показниками експресії маркера EGFR і мПНК гена *K-RAS* ( $r = 0,57$ ). Не виявлено кореляцій між рівнями експресії пухлинними клітинами аденокарциноми шлунка кишкового типу маркерів апоптозу (p53 та каспази-3), рецепторів EGFR і HER2/neu, а також рівнем експресії мПНК гена *K-RAS*.

**Висновки.** Дані, що отримали, свідчать: збільшення експресії рецепторів EGFR і HER2/neu клітинами аденокарциноми шлунка кишкового типу призводить до активації транскрипції та трансляції гена *K-RAS* із наступною активацією ERK-сигнального каскаду, що реалізує проліферативний потенціал пухлинних клітин. Визначення ErbB-рецепторного статусу аденокарциноми шлунка кишкового типу доцільно враховувати під час вибору індивідуалізованої таргетної терапії.

## Ключові слова:

рак шлунка, аденокарцинома, рецептори факторів росту, проліферація, апоптоз.

**Патологія.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 129–135

**Key words:**

gastric cancer, adenocarcinoma, growth factor receptors, cell proliferation, apoptosis.

**Pathologia**

2017; 14 (2), 129–135

## The features of transcriptional activity of *K-RAS* gene and expression of ErbB family receptors in intestinal-type gastric adenocarcinoma

V. A. Tumanskiy, T. A. Khrystenko

**Aim** – to study the features of expression of the *K-RAS* gene mRNA and the ErbB family growth receptors (EGFR and HER-2/neu) by the tumor cells of the intestinal-type gastric adenocarcinoma, and also their relations to the processes of cell proliferation and apoptosis.

**Materials and methods.** Pathohistological, immunohistochemical and molecular-genetic studies of the intestinal-type gastric adenocarcinoma from 30 patients (the age ranged from 49 to 86 years) and 10 samples of the normal gastric mucosa were performed.

**Results.** It has been established that intestinal-type gastric adenocarcinoma is characterized by the elevated level of expression of the *K-RAS* gene mRNA [Me = 3.62 (0.57; 5.87)]. There is the inverse weak correlation between the elevated expression level of the *K-RAS* gene mRNA and the decrease of the histological differentiation degree of the tumor from G3 to G1 ( $r = -0.36$ ). In 100 % of the intestinal-type gastric adenocarcinomas, that were investigated, membrane expression of the EGFR and HER-2/neu receptors was detected. Herewith the intense expression of the EGFR (+++/++) occurs in 76.66 % of the adenocarcinomas, while the HER2 positive status (+++) occurs in 46.66 % of the adenocarcinomas. There is the direct strong correlation between the expression levels of the EGFR and HER2/neu markers by the tumor cells ( $r = 0.80$ ), the direct medium correlation between the expression levels of the EGFR and Ki-67 markers ( $r = 0.53$ ), and the direct medium correlation between the expression levels of the EGFR marker and *K-RAS* gene mRNA ( $r = 0.57$ ). There are no correlations between the levels of expression of the apoptosis markers (p53 and caspase-3), EGFR and HER2/neu receptors, as well as the expression level of the *K-RAS* gene mRNA by the tumor cells of intestinal-type gastric adenocarcinoma.

**Conclusions.** These data suggest that the increasing of the expression levels of EGFR and HER2/neu receptors by the tumor cells of intestinal-type gastric adenocarcinoma leads to the activation of transcription and translation of the *K-RAS* gene, followed by the activation of the ERK-signaling pathway that realizes the proliferative potential of the tumor cells. The examination of ErbB-state of the intestinal-type gastric adenocarcinoma is expediently for the individual target-treatment selection.

Несмотря на регистрируемое в последнее десятилетие снижение частоты рака желудка (РЖ), он, по данным глобальной статистики, занимает четвёртое место в мире по заболеваемости и второе место – по смертности от злокачественных новообразований [1]. Лечение пациентов с местно-распространённым РЖ в странах Западной Европы и Северной Америки проводится преимущественно путём неoadъювантной химиотерапии с последующим хирургическим удалением опухоли, в то время как в странах Азии – преимущественно путём оперативного вмешательства с последующей адъювантной химиотерапией. Показатели выживаемости больных РЖ несколько улучшили достижения в области таргетной терапии [2]. Но даже при условии адекватного лечения показатель 5-летней выживаемости больных с продвинутыми стадиями РЖ не превышает 40 % [3].

В развитии РЖ активно изучается роль протоонкогенов (*c-erbB-2*, *K-RAS*, *c-мус*, *src* и других), контролирующих пролиферацию и апоптоз опухолевых клеток [4], а также влияние ростовых факторов, таких как белки семейства ErbB (HER) – EGFR, *c-erbB-2*, *c-erbB-3* и семейства *c-erbB-4* – HER-1, HER-2, HER-3 и HER-4 [5], поскольку их активация и/или дисрегуляция играют важную роль в опухолевой прогрессии и метастазировании [6]. Аберрантная иммуногистохимическая (ИГХ) экспрессия EGFR и HER-2/neu выявляется не только в РЖ, но также в раке молочной и предстательной железы, в раке яичников и лёгких [5,9]. РЖ отличается выраженной молекулярной гетерогенностью: аденокарцинома желудка кишечного типа (АКЖКТ) характеризуется преимущественно гиперэкспрессией протоонкогенов (*c-erbB-2*, *K-RAS*, *c-мус*, *src*), контролирующих пролиферацию опухолевых клеток, в то время как РЖ диффузного типа характеризуется

преимущественно гиперэкспрессией некоторых онкогенов (*c-met*, *K-Sam*) и утратой опухолевыми клетками молекул межклеточной адгезии [4].

Ген *K-RAS* кодирует внутриклеточный белок (RAS-протеин), который обеспечивает передачу внешних сигналов ростовых факторов от клеточных мембранных рецепторов семейства ErbB в ядро клетки и является ключевым компонентом MAPK-сигнального каскада, регулирующего пролиферацию опухолевых клеток, устойчивость к апоптозу, метастазирование и ангиогенез в опухоли. [7]. Мутации гена *K-RAS*, обнаруживаемые в некоторых злокачественных опухолях, ассоциированы с повышенной активностью RAS-протеина, аномально активирующего Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) сигнальный каскад без воздействия внешних сигналов ростовых факторов через мембранные рецепторы клетки, в том числе – через рецепторы эпидермального фактора роста. Именно поэтому опухоли, в которых выявляются мутации гена *K-RAS*, нечувствительны к анти-EGFR таргетной терапии [5,8]. По данным современной научной литературы, частота мутаций гена *K-RAS* в РЖ колеблется в пределах 0–29 % с медианой 6,5 %, в то время как амплификация гена *K-RAS* наблюдается в 1–9 % случаев. В связи с низкой частотой генетических аномалий и относительно малыми объёмами исследованных выборок данные о взаимосвязях между *K-RAS*-статусом РЖ, его клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью больных пока имеют недостаточную статистическую мощь [8].

Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) являются продуктом протоонкогена *ErbB1* (*HER1*) и относятся к рецепторам тирозин-специфических протеинкиназ. Рецептор 2 типа к эпидермальному фактору роста HER2 кодируется протоонкогеном

*c-erbB-2* и является трансмембранным протеином с тирозинкиназной активностью, который вовлечён в MAPK-сигнальный каскад [7,9]. После связывания с лигандами EGFR формирует гетеродимеры с рецепторами HER2, передающими сигнал на внутриклеточный RAS-протеин, который переходит в активное (GTP-связанное) состояние, активируя тем самым MAPK-сигнальный каскад. Последний, в свою очередь, включает несколько путей передачи сигналов, которые, регулируя функции нескольких факторов транскрипции, оказывают влияние на процессы клеточной пролиферации, апоптоза, инвазии и метастазирования, а также тумор-ассоциированного ангиогенеза [7,9]. Таким образом, рецепторы эпидермального фактора роста влияют на биологическое поведение и злокачественный потенциал опухоли.

Однако вопрос о прогностической ценности *K-RAS*-статуса АКЖКТ, а также уровней экспрессии HER2/neu и EGFR опухолевыми клетками всё ещё остаётся открытым [3,8].

## Цель работы

Изучить особенности экспрессии мРНК гена *K-RAS*, а также ростовых рецепторов семейства ErbB (EGFR и HER2/neu) клетками аденокарциномы желудка кишечного типа и их взаимосвязь с уровнем клеточной пролиферации и апоптоза.

## Материалы и методы исследования

Проведено патогистологическое, иммуногистохимическое (ИГХ) и молекулярно-генетическое исследование аденокарциномы желудка кишечного типа (АКЖКТ) у 30 пациентов 49–86 лет. Группу контроля составили 10 образцов слизистой оболочки желудка обычной гистологической структуры. Среди исследованных АКЖКТ высокодифференцированные G1 карциномы составили 6,67 %, умеренно дифференцированные G2 – 26,66 %, низкодифференцированные G3 – 66,67 %. АКЖКТ, локализирующиеся в пределах слизистой оболочки и подслизистой основы (T1), составили 10 %; карциномы, прорастающие в мышечный слой (T2), – 30 %; прорастающие в подсерозную основу (T3) – 46,66 %; прорастающие в серозную оболочку (T4) – 13,34 %. АКЖКТ без метастазов в регионарных лимфатических узлах (N0) составили 60 %, карциномы с метастазами в 1–2 лимфатических узлах (N1) – 40 %.

Образцы опухоли и слизистой оболочки желудка фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Микроструктуру рака оценивали в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, в серийных парафиновых срезах проводили ИГХ исследование ростовых рецепторов по стандартной методике [10] с использованием моноклональных антител Po Rb A-Hu EGFR, *Clone SP9* (DBS, США) и Po Rb A-Hu *c-erbB-2* Oncoprotein, *Clone a0485* (DAKO, Дания) [синоним HER2/neu], а также системы визуализации EnVisionFLEX с диаминобензидином (DAKO, США). Результаты ИГХ исследования оценивали в микроскопе AXIOPLAN 2 (Carl Zeiss, ФРГ).

**Таблица 1.** Специфические пары праймеров, использованные для анализа исследуемого и референтного генов

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>K-RAS</i>	F = AAGACAGAGAGTGGAGGATGC	59,17	51	642/ 643
	R = TGTCGGATCTCCCTCACCAA	60,25		
<i>β-actin (ACTB)</i>	F = CCTTTGCCGATCCGCCG	61,30	59	78/79
	R = GATATCATCATCCATGGTGGAGCTGG	61,15		

Мембранную экспрессию рецепторов EGFR и HER2/neu оценивали в соответствии со шкалой, разработанной компанией DAKO и одобренной USFDA [11]: (-) – полное отсутствие экспрессии либо фрагментарная мембранная экспрессия менее чем в 10 % клеток опухоли; (+) – незначительная фрагментарная мембранная экспрессия более чем в 10 % клеток опухоли; (++) – умеренная экспрессия в базолатеральных отделах мембран или на всём протяжении мембран более чем в 10 % клеток опухоли, (+++) – значительная экспрессия в базолатеральных отделах мембран или на всём протяжении мембран более чем в 10 % клеток опухоли.

Молекулярно-генетические исследования проводили в материале, фиксированном в 10 % забуференном формалине и залитом в парафин. Для выделения тотальной РНК образцы ткани депарафинизировали в ксилоле и регидратировали в нисходящих концентрациях этанола (100 %, 96 %, 70 %), далее гомогенизировали и в пробирках «Ахуген» (USA) повторно депарафинизировали и регидратировали. Для выделения из ткани тотальной РНК использовали «Trizol RNA Prep 100» (Isogen Lab. Ltd, Российская Федерация), для получения кДНК – набор «OT-1» (Syntol, Российская Федерация). Реакционная смесь общим объёмом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H<sub>2</sub>O, очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси (2,5x) и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 минут при 92 °C.

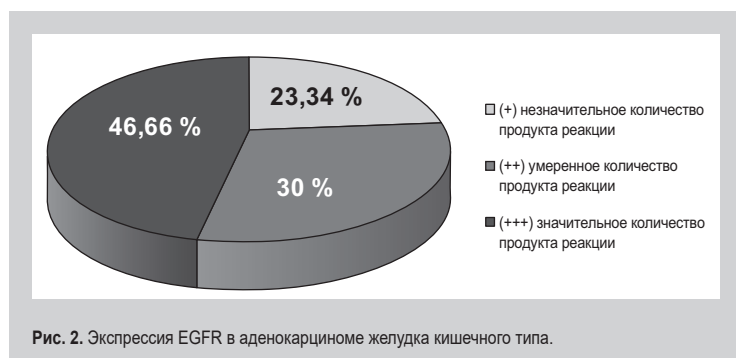
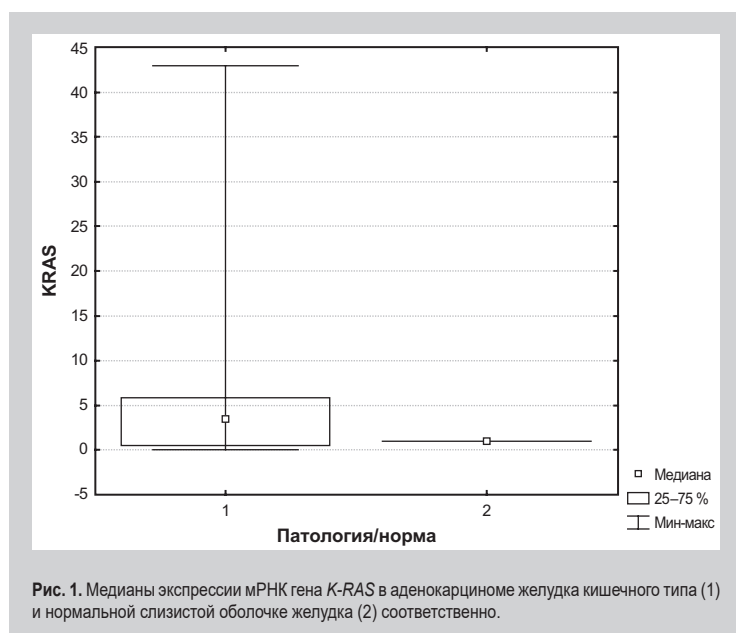
Для определения уровня экспрессии мРНК использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green R-402 (Syntol, Российская Федерация). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу SynTaq с ингибирующими активность фермента антителами, 0,2 мкл прямого и 0,2 мкл обратного специфического праймера, dNTP-дезоксинуклеозидтрифосфаты, 1 мкл матрицы (кДНК). Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемого (*KRAS*) и референтного (*ACTB*) генов фирмы Thermo Scientific (США) были подобраны в программе Primer Blast (НИН, США) (табл. 1).

Амплификация состояла из 45–50 циклов и проведена при следующих условиях: денатурация – 95 °C, 15 секунд; отжиг – 59–61 °C, 30–60 секунд; элонгация – 72 °C, 30 секунд. Относительное нормализованное количество кДНК целевого гена определяли методом  $\Delta\Delta C_t$ . Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения

**Таблица 2.** Корреляционные связи между экспрессией мРНК гена *K-RAS*, экспрессией Ki-67, p53, каспазы-3, EGFR, HER2/neu опухолевыми клетками, а также показателями G, T, N (pTNM) аденокарциномы желудка кишечного типа

	KRAS	Ki-67	p53	casp-3	EGFR	HER2/neu	G	T	N
KRAS	1,00	<b>0,73*</b>	0,25	0,21	<b>0,57*</b>	<b>0,68*</b>	<b>-0,36*</b>	-0,06	-0,14
Ki-67	<b>0,73*</b>	1,00	0,15	<b>0,98*</b>	<b>0,53*</b>	<b>0,61*</b>	-0,07	-0,09	-0,20
p53	0,25	0,15	1,00	<b>0,45*</b>	0,19	0,16	-0,28	-0,19	-0,19
casp-3	0,21	<b>0,98*</b>	<b>0,45*</b>	1,00	0,23	0,14	-0,17	-0,03	-0,11
EGFR	<b>0,57*</b>	<b>0,53*</b>	0,19	0,23	1,00	<b>0,80*</b>	0,01	0,27	0,22
HER2/neu	<b>0,68*</b>	<b>0,61*</b>	0,16	0,14	<b>0,80*</b>	1,00	-0,01	0,21	0,13
G	<b>-0,36*</b>	-0,07	-0,28	-0,17	0,01	-0,01	1,00	0,31	0,08
T	-0,06	-0,09	-0,19	-0,03	0,27	0,21	0,31	1,00	0,46
N	-0,14	-0,20	-0,19	-0,11	0,22	0,13	0,08	0,46	1,00

\*: наличие корреляции.



CFX Manager™ (Bio-Rad, USA). В эксперимент были включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Реакции амплификации выполняли на индивидуальных образцах в трёх повторах.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия №AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ); изучение связей между исследуемыми параметрами проводили с помощью коэффициента

ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ). Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического исследования установлено, что опухолевые клетки аденокарциномы желудка кишечного типа в сравнении с клетками слизистой оболочки желудка обычного гистологического строения характеризуется повышенным уровнем экспрессии мРНК гена *K-RAS* (рис. 1): медиана относительного нормализованного соотношения уровня экспрессии мРНК гена *K-RAS* клетками АКЖКТ составляет 3,62 (0,57; 5,87).

Согласно результатам статистического анализа, между уровнем экспрессии мРНК гена *K-RAS* опухолевыми клетками АКЖКТ и глубиной инвазии опухоли (pT), а также метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов (pN) корреляций не выявлено (табл. 2). При этом выявлена обратная слабая корреляционная связь между возрастанием уровня экспрессии мРНК гена *K-RAS* и снижением степени гистологической дифференцировки АКЖКТ (от G3 до G1) (табл. 2). Таким образом, более высокий уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* в большей мере характерен для высоко- и умеренно дифференцированных карцином.

При ИГХ исследовании установлено, что в 100 % АКЖКТ в опухолевых клетках имеет место мембранная экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста EGFR и HER2/neu. При этом низкий уровень экспрессии EGFR (+) зафиксирован в 23,4 % исследованных АКЖКТ, в 30 % аденокарцином имеет место умеренный уровень экспрессии маркера (++), в 46,66 % АКЖКТ – высокий уровень экспрессии EGFR (+++) опухолевыми клетками (рис. 2). Таким образом, выраженная экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (++/+++) имеет место в 76,66 % исследованных АКЖКТ (рис. 3).

Согласно научным литературным данным, экспрессия опухолевыми клетками EGF-рецепторов отмечается в 9–68 % всех гистологических вариантов РЖ, а выраженная экспрессия этого маркера выявляется в 20–25 % РЖ [12]. По данным Y. Bang et al. [2] экспрессия EGFR чаще выявляется в АКЖКТ, чем в РЖ диффузного типа. Определённая в нашем исследовании существенно большая частота экспрессии опухолевыми клетками EGF-рецепторов характеризует

именно АКЖКТ, а не все гистологические варианты рака желудка. Установлено, что высокий уровень экспрессии EGFR ассоциируется с повышенным риском инвазии и метастазирования опухоли, в то время как сниженный уровень его экспрессии ассоциируется с угнетением пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также с подавлением тумор-ассоциированного ангиогенеза [13]. M. Gao et al. (2013) установили наличие прямой корреляционной связи между уровнем экспрессии EGFR опухолевыми клетками и такими клинико-морфологическими характеристиками РЖ как размер опухоли >5 см, степень её гистологической дифференцировки, глубина инвазии РЖ, наличие регионарных и отдалённых метастазов [12]. M. Terashima et al. (2011) показали, что высокий уровень экспрессии EGFR опухолевыми клетками ассоциируется со сниженными показателями выживаемости больных РЖ [14]. В нашем исследовании не выявлено статистически значимых корреляционных связей между уровнем экспрессии EGFR клетками АКЖКТ и степенью гистологической дифференцировки опухоли (G), глубиной её инвазии (pT) и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (pN) (табл. 2).

При ИГХ исследовании АКЖКТ фрагментарная экспрессия HER2/neu на части мембран опухолевых клеток (+) выявлена в 13,34 % опухолей, умеренная экспрессия маркера (++) определена в 40 % АКЖКТ, а высокий уровень экспрессии HER2/neu (+++) – в 46,66 % опухолей (рис. 4).

В соответствии с международным консенсусом [11] HER2 негативному статусу РЖ соответствует (–) или (+) уровень экспрессии его клетками HER2/neu, сомнительному HER2 статусу опухоли – (++) уровень экспрессии маркера клетками, HER2 позитивному статусу РЖ – (+++) уровень экспрессии или гиперэкспрессия HER2/neu. Причиной гиперэкспрессии HER2/neu является амплификация 17q12–q21 региона ДНК. Считается, что наиболее достоверно наличие гиперэкспрессии HER2/neu (следовательно, и степень амплификации гена) можно установить лишь на основании FISH-исследований, в то время как в ИГХ-исследованиях о гиперэкспрессии HER2/neu свидетельствует только выраженное (+++) иммуноокрашивание мембран опухолевых клеток [11]. Таким образом, в наших наблюдениях АКЖКТ с HER2 позитивным статусом составили 46,66 %, а опухоли с HER2 негативным и HER2 сомнительным статусом – 43,34 % (рис. 4, 5).

Согласно научным литературным данным, HER2 позитивный РЖ составляет 4,4 % – 53,4 % всех случаев РЖ, при этом средний показатель составляет 17,9 % [9, 11]. По данным Y. Bang et al. (2010), R. Terragni et al. (2014) имеются корреляции между гистологическим типом РЖ и частотой гиперэкспрессии HER2/neu: гиперэкспрессия маркера чаще выявляется в АКЖКТ, чем в карциномах диффузного типа [2, 5]. Согласно результатам проведённого нами корреляционного анализа не установлено статистически значимых связей между уровнем экспрессии HER2/neu в АКЖКТ и степенью гистологической дифференцировки опухоли (G), глубиной её инвазии (pT), наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (pN) (табл. 2).

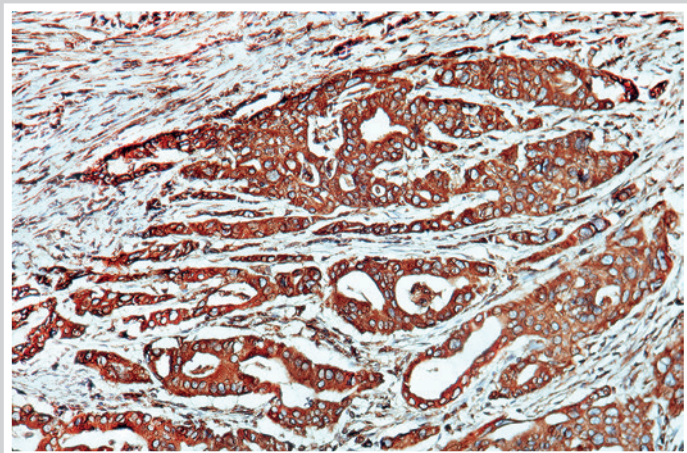


Рис. 3. Высокий уровень экспрессии EGFR опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа. x200.

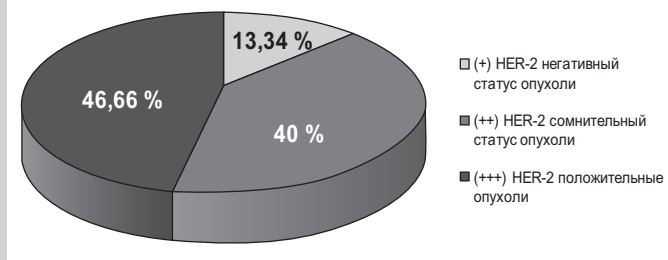


Рис. 4. Экспрессия HER2/neu в аденокарциноме желудка кишечного типа.

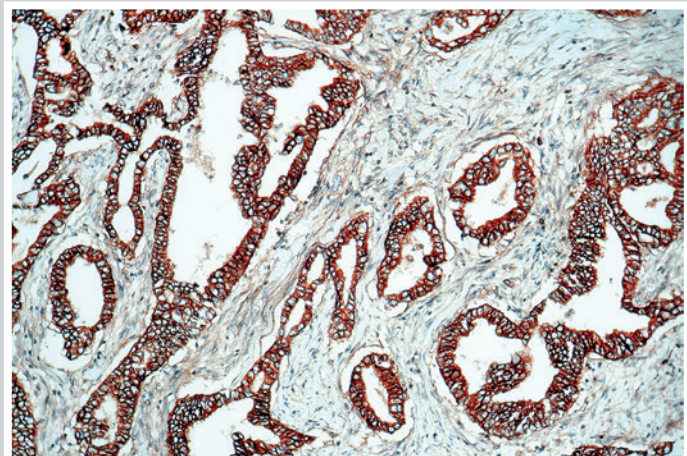


Рис. 5. Высокий уровень экспрессии HER2/neu опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа. x200.

Это соответствует данным S. Ling et al. (2013), не обнаружившим корреляции между уровнем экспрессии HER2/neu и глубиной инвазии РЖ, наличием регионарных и/или отдалённых метастазов [15]. В то же время эти исследователи установили наличие прямой корреляции между HER2 позитивным статусом РЖ и показателями его гистологической G1-G2

дифференцировки [15]. Известно также, что гиперэкспрессия HER2/neu опухолевыми клетками РЖ ассоциируется со снижением показателей выживаемости больных и является прогностически неблагоприятным фактором [9, 11]. По результатам международного рандомизированного исследования ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer) доказано увеличение показателей выживаемости больных HER2 позитивным РЖ при лечении таргетным препаратом Трастузумаб [2].

Нами в предыдущих работах [16, 17] было установлено, что АКЖКТ характеризуется средним уровнем пролиферации опухолевых клеток [медиана экспрессии Ki-67 составляет 45,10 % (30,58; 61,17)] и низким уровнем апоптоза [медиана экспрессии p53 = 18,81 % (6,56; 24,40), каспазы-3 – 66,23 (45,94; 86,16) УЕОП]. Выполненный в этом исследовании статистический анализ показал, что в АКЖКТ имеет место прямая сильная корреляционная связь между показателями экспрессии опухолевыми клетками рецепторов семейства ErbB (EGFR и HER2/neu), прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии EGFR и Ki-67, а также прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии EGFR и мПНК гена *K-RAS* (табл. 2). То есть возрастание экспрессии рецепторов семейства ErbB 1 типа (EGFR) ассоциировано с возрастанием экспрессии рецепторов семейства ErbB 2 типа (HER2/neu), что согласуется с приведённой выше информацией о гетеродимерном комплексе рецепторов EGFR [7]. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что возрастание экспрессии опухолевыми клетками EGFR ассоциируется с возрастанием транскрипционной активности гена *K-RAS* и с возрастанием индекса пролиферации раковых клеток АКЖКТ. Y. J. Bang et al. [2], G. Ming et al. [12], M. Terashima et al. [14] также выявили корреляции между экспрессией EGFR опухолевыми клетками РЖ и индексом их пролиферации. Вероятно, активация экспрессии опухолевыми клетками рецепторов EGFR приводит к компенсаторному возрастанию количества RAS-протеина в цитоплазме за счёт активации транскрипции и трансляции гена *K-RAS*. По данным J. P. Manzi [7], возрастание количества активных форм RAS-протеина в цитоплазме опухолевых клеток, в свою очередь, активирует сигнальный путь ERK (часть сигнального каскада MARK), отвечающий за пролиферативную активность клеток [7].

Не выявлено корреляций между уровнями экспрессии опухолевыми клетками АКЖКТ маркеров апоптоза (p53 и каспазы-3), экспрессии EGFR и HER2/neu, а также уровнем экспрессии мПНК гена *K-RAS* (табл. 2). Эти результаты свидетельствуют о том, что рецепторы EGFR и HER2/neu, вовлечённые в работу MARK-сигнального каскада, оказывают регуляторное влияние на пролиферативную активность опухолевых клеток, но при этом не влияют на интенсивность апоптоза клеток АКЖКТ.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что возрастание экспрессии рецепторов EGFR и HER2/neu клетками АКЖКТ приводит к активации транскрипции и трансляции гена *K-RAS* с последующей активацией ERK-сигнального пути, реализующего

пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Определение ErbB-рецепторного статуса АКЖКТ целесообразно учитывать при выборе индивидуализированной таргетной терапии.

## Выводы

1. Аденокарциному желудка кишечного типа отличает повышенный уровень транскрипционной активности гена *K-RAS*: медиана относительного нормализованного соотношения уровня экспрессии опухолевыми клетками мПНК гена *K-RAS* равняется 3,62 (0,57; 5,87).

2. Для аденокарциномы желудка кишечного типа характерна значимая экспрессия опухолевыми клетками ростовых рецепторов семейства ErbB: в 76,66 % опухолей выявляется выраженная экспрессия EGFR (++/+++); 46,66 % аденокарцином имеют (+++) иммунопозитивный HER2/neu статус.

3. В аденокарциноме желудка кишечного типа имеется тесная корреляционная взаимосвязь между возрастанием транскрипционной активности гена *K-RAS*, возрастанием уровня экспрессии опухолевыми клетками ростовых рецепторов EGFR и HER2/neu, а также возрастанием уровня пролиферативной активности опухолевых клеток.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность профессору А. М. Камышному и сотрудникам ПЦП-лаборатории учебного медико-лабораторного центра Запорожского государственного медицинского университета, с участием которых выполнены молекулярно-генетические исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госбюджетной НИР «Ранне молекулярно-генетичне та імуногістохімічне прогнозування схильності до прогресування раку легенів та органів травлення» (0117U002580) 2017–2019, которая финансируется МЗ Украины.

**Funding:** The research was carried out within the state budget scientific-research work “Early molecular genetic and immunohistochemical predicting of susceptibility to lung and digestive system cancer progression” (0117U002580), 2017–2019, funded by the Ministry of Health of Ukraine.

## Список литературы

- [1] Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al. // International Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 136. – №5. – P. E359–386.
- [2] Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial / Y. J. Bang, E. van Cutsem, A. Feyereislova et al. // Lancet. – 2010. – №376. – P. 687–697.
- [3] KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study / N. C. van Grieken, T. Aoyama, P. A. Chambers et al. // British Journal of Cancer. – 2013. – Vol. 108. – №7. – P. 1495–1501.
- [4] Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines / S. Heindl, E. Eggenstein, S. Keller et al. // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2012. – Vol. 138. – №5. – P. 843–858.
- [5] EGFR, HER-2 and KRAS in Canine Gastric Epithelial Tumors: A Potential Human Model? / R. Terragni, A. C. Gardini, S. Sabatini et al. // PLOS one. – 2014. – Vol. 9. – №1. – P. 1–7.

- [6] Lorenzen S. How will human epidermal growth factor receptor 2-neu data impact clinical management of gastric cancer? / S. Lorenzen, F. Lordick // *Current Opinion in Oncology*. – 2011. – №23. – P. 396–402.
- [7] Exploring cancer proliferative signaling pathways / ed. by J. P. Manzi. – Boston: ThermoFisher SCIENTIFIC, 2015. – 75 p.
- [8] KRAS, BRAF and gastric cancer / L. C. Hewitt, G. G. Hutchins, V. Melotte et al. // *Translational Gastrointestinal Cancer*. – 2015. – Vol. 4. – №6. – P. 429–447.
- [9] Abrahao-Machado L. F. HER2 testing in gastric cancer: An update / L. F. Abrahao-Machado, C. Scapulatempo-Neto // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22. – №19. – P. 4619–4625.
- [10] Diagnostic Immunohistochemistry / ed. by D. J. Dabbs. – 3rd ed. – Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. – 951 p.
- [11] HER2/neu Testing in Gastric Cancer by Immunohistochemistry / B. S. Sheffield, J. Garratt, S. E. Kalloger et al. // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2014. – Vol. 138. – P. 1495–1502.
- [12] Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features / M. Gao, X. Liang, Z. Zhang et al. // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. – 2013. – Vol. 6. – Issue 4. – P. 260–264.
- [13] Hypermethylated Epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter is associated with gastric cancer / X. Weng, H. Zhang, J. Ye et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 10154.
- [14] Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer / M. Terashima, K. Kitada, A. Ochiai et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18. – №21. – P. 5992–6000.
- [15] Shan L. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population / L. Shan, J. Ying, N. Lu // *Diagnostic Pathology*. – 2013. – Vol. 8. – P. 76.
- [16] Христенко Т. А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика экспрессии Ki-67, p53, каспазы-3 в гиперпластических полипах и неинвазивной аденокарциноме желудка кишечного типа / Т. А. Христенко // *Запорожский медицинский журнал*. – 2016. – №4(97). – С. 83–88.
- [17] Tumanskiy V. A. Comparative immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p53, caspase-3 in non-invasive and invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma / V. A. Tumanskiy, T. A. Khrystenko // *Патологія*. – 2016. – №2(37). – С. 70–75.
- [11] Sheffield, B. S., Garratt, J., Kalloger, S. E., Chang, H. H., Torlakovic, E. E., Gilks, C. B., & Schaeffer, D. F. (2014) HER2/neu Testing in Gastric Cancer by Immunohistochemistry. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138, 1495–1502. doi: 10.5858/arpa.2013-0604-OA.
- [12] Gao, M., Liang, X., Zhang, Z., Ma, W., Chang, Z. W., & Zhang, M. Z. (2013) Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(4), 260–264. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60054-1
- [13] Weng, X., Zhang, H., Ye, J., Kan, M., Liu, F., Wang, T., et al. (2015) Hypermethylated Epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter is associated with gastric cancer. *Scientific Reports*, 5, 10154. doi: 10.1038/srep10154.
- [14] Terashima, M., Kitada, K., Ochiai, A., Ichikawa, W., Kurahashi, I., Sakuramoto, S., et al. (2012) Impact of human epidermal growth factor receptor (EGFR) and ERBB2 (HER2) expressions on survival in patients with stage II/III gastric cancer, enrolled in the ACTSGC study. *Clinical Cancer Research*, 18(21), 5992–6000. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1318.
- [15] Shan, L., Ying, J., & Lu, N. (2013) HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. *Diagnostic Pathology*, 8, 76. doi: 10.1186/1746-1596-8-76.
- [16] Khrystenko, T. A. (2016) Sravnitel'naya immunogistokhimicheskaya kharakteristika e'kspresii Ki-67, p53, kaspazy-3 v giperplasticheskikh polipakh i neinvazivnoy adenokarcinome zheludka kishechnogo tipa [Comparative immunohistochemical characteristics of Ki-67, p53, caspase-3 expression in gastric hyperplastic polyps and non-invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma]. *Zaporozhye medical journal*, 4(97), 83–88 [in Russian]. doi: 10.14739/2310-1210.2016.4.79773.
- [17] Tumanskiy, V. A., & Khrystenko, T. A. (2016) Comparative immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p53, caspase-3 in non-invasive and invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Pathologia*, 2(37), 70–75. doi: 10.14739/2310-1237.2016.2.81333.

#### Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, проректор по научной работе, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный деятель науки и техники Украины.  
Христенко Т. А., аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

#### Відомості про авторів:

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, проректор із наукової роботи, Запорізький державний медичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.  
Христенко Т. О., аспірант каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

#### Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Pro-rector for Scientific Work, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Science and Engineering Worker of Ukraine.  
Khrystenko T. A., PhD student, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

#### Конфликт интересов: отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 02.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 25.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 02.06.2017

#### References

- [1] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] Bang, Y. J., van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., et al. (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 687–697. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [3] van Grieken, N. C., Aoyama, T., Chambers, P. A., Bottomley, D., Ward, L. C., Inam, I., et al. (2013) KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *British Journal of Cancer*, 108(7), 1495–1501. doi: 10.1038/bjc.2013.109.
- [4] Heindl, S., Eggenstein, E., Keller, S., Kneissl, J., Keller, G., Mutze, K., et al. (2012) Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(5), 843–858. doi: 10.1007/s00432-011-1128-4.
- [5] Terragni, R., Gardini, A. C., Sabattini, S., Bettini, G., Amadori, D., Talamonti, C., et al. (2014) EGFR, HER-2 and KRAS in Canine Gastric Epithelial Tumors: A Potential Human Model? *PLOS one*, 9(1), 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0085388.
- [6] Lorenzen, S., & Lordick, F. (2011) How will human epidermal growth factor receptor 2-neu data impact clinical management of gastric cancer? *Current Opinion in Oncology*, 23, 396–402. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283469567.
- [7] Manzi, J. P. (Ed.) (2015). Exploring cancer proliferative signaling pathways. Boston: ThermoFisher SCIENTIFIC.
- [8] Hewitt, L. C., Hutchins, G. G., Melotte, V., Saito, Y., & Grabsch, H. I. (2015) KRAS, BRAF and gastric cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 4(6), 429–447.
- [9] Abrahao-Machado, L. F., & Scapulatempo-Neto, C. (2016) HER2 testing in gastric cancer: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 22(19), 4619–4625. doi: 10.3748/wjg.v22.i19.4619.
- [10] Dabbs, D. J. (Ed.) (2010). Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

## Иммуногистохимическая характеристика иммуноклеточного микроокружения плоскоклеточного рака лёгкого

М. М. Баударбекова, А. В. Калмыкова

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

### Ключевые слова:

опухоль лёгкого, немелкоклеточный рак лёгкого, плоскоклеточный рак, иммуногистохимия.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 136–141

DOI: 10.14739/2310-1237.2017.2.109266

E-mail: Baudarbekova@gmail.com

Тумор-ассоциированные иммуноциты оказывают влияние на выживаемость опухолевых клеток, процессы пролиферации и апоптоза, а также принимают участие в реализации метастатического каскада.

**Цель работы** – изучение иммуногистохимических особенностей клеточного микроокружения неметастатического и метастатического плоскоклеточного рака лёгкого (ПРЛ).

**Материалы и методы.** Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала 20 больных ПРЛ 38–64 лет: I группу исследования составили 10 больных ПРЛ без метастазов в регионарных лимфатических узлах (РЛУ), II группу – 10 больных ПРЛ с метастазами в РЛУ.

**Результаты.** Выявлено, что для перитуморозных отделов стромы ПРЛ характерна максимальная плотность распределения (ПР) CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Более того, были выявлены статистически значимые различия между показателями ПР CD4+ лимфоцитов в строме ПРЛ случаев I и II группы: 401,2 (344,6; 511,3) vs. 622,4 (587,2; 793,9) кл/мм<sup>2</sup> в перитуморозных зонах стромы; 298,0 (246,1; 350,1) vs. 484,8 (479,3; 690,6) кл/мм<sup>2</sup> в интертуморозных зонах стромы. Максимальная ПР CD20+ лимфоцитов в ПРЛ случаев I группы выявляется в перитуморозных зонах стромы, случаев II группы – в интертуморозных зонах стромы, в то время как максимальная ПР р1с+ плазмоцитов наблюдается в интертуморозных зонах стромы. Максимальная ПР CD68+ макрофагов характерна для перитуморозных зон стромы ПРЛ. При этом имеются статистически значимые различия между ПР CD68+ макрофагов в интертуморозных зонах стромы ПРЛ случаев I и II групп: 259,5 (193,0; 325,2) vs. 507,1 (390,2; 617,8) кл/мм<sup>2</sup>.

**Выводы.** ПРЛ без метастазов в РЛУ характеризуется наличием преимущественно CD4+, CD8+ лимфоцитов и CD68+ макрофагов в перитуморозных зонах стромы, а также CD20+ лимфоцитов и р1с+ плазмоцитов в интертуморозных зонах опухолевой стромы. ПРЛ с метастазами в РЛУ отличается преобладанием CD20+ лимфоцитов в перитуморозных зонах стромы, а также значимо большей плотностью распределения CD4+ лимфоцитов в пери- и интертуморозных зонах стромы, а CD68+ макрофагов – в интертуморозных зонах опухолевой стромы.

### Ключові слова:

пухлини легень, недрібноклітинна карцинома легень, плоскоклітинна карцинома, імуногістохімія.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 136–141

## Імуногістохімічна характеристика імуноклітинного мікрооточення плоскоклітинного раку легень

М. М. Баударбекова, А. В. Калмыкова

Тумор-асоційовані імуніцити здатні впливати на виживаність пухлинних клітин, процеси проліферації та апоптозу, також імуніцити беруть участь у реалізації метастатичного каскаду.

**Мета роботи** – вивчення особливостей мікрооточення плоскоклітинного раку легень (ПРЛ).

**Матеріали та методи.** Виконали патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження операційного матеріалу 20 пацієнтів (38–64 років), які лікувалися в Запорізькому обласному клінічному онкологічному диспансері з приводу ПРЛ: I групу дослідження становили 10 пацієнтів без метастазів у регіональних лімфатичних вузлах (РЛВ), II групу – 10 пацієнтів із метастазами у РЛВ.

**Результати.** Виявили, що для перитуморозних відділів стромы ПРЛ характерна максимальна щільність розподілення (ЩР) CD4+ і CD8+ лімфоцитів. До того ж були виявлені статистично значущі відмінності між показниками ЩР CD4+ лімфоцитів у стромі ПРЛ випадків I та II груп: 401,2 (344,6; 511,3) vs. 622,4 (587,2; 793,9) кл/мм<sup>2</sup> у перитуморозних ділянках стромы, 298,0 (246,1; 350,1) vs. 484,8 (479,3; 690,6) кл/мм<sup>2</sup> в інтертуморозних ділянках стромы. Максимальна ЩР CD20+ лімфоцитів у ПРЛ випадків I групи виявляється в перитуморозних ділянках стромы, випадків II групи – в інтертуморозних ділянках стромы, водночас як максимальна ЩР р1с+ плазмоцитів є в інтертуморозних ділянках стромы. Максимальна ЩР CD68+ макрофагів характерна для перитуморозних ділянок стромы ПРЛ. При цьому наявні статистично значущі відмінності між ЩР CD68+ макрофагів в інтертуморозних ділянках стромы ПРЛ випадків I та II груп: 259,5 (193,0; 325,2) vs. 507,1 (390,2; 617,8) кл/мм<sup>2</sup>.

**Висновки.** ПРЛ без метастазів у РЛВ характеризується переважним розподілом CD4+, CD8+ лімфоцитів і CD68+ макрофагів у перитуморозних ділянках стромы, а також CD20+ лімфоцитів і р1с+ плазмоцитів в інтертуморозних ділянках пухлинної стромы. ПРЛ із метастазами у РЛВ відрізняється переважанням CD20+ лімфоцитів у перитуморозних ділянках стромы, а також значущо більшими показниками ЩР CD4+ лімфоцитів у пери- та інтертуморозних ділянках стромы, CD68+ макрофагів – в інтертуморозних ділянках пухлинної стромы.

## Immunohistochemical Characteristic of the Microenvironment in Squamous Cell Lung Cancer

М. М. Baudardekova, A. V. Kalmykova

Tumor-associated immunocytes can influence the survival of tumor cells, the processes of proliferation and apoptosis, these immunocytes also participate in the metastatic cascade.



**Aim.** The purpose of this study was to estimate the features of the squamous cell lung cancer (SCLC) microenvironment using the immunohistochemical technique.

**Materials and methods.** Pathomorphological and immunohistochemical studies of the surgical material from 20 patients, which were treated in ZRCOD because of SCLC, were conducted: 10 patients with SCLC without metastases in the regional lymph nodes (RLN) formed the I group and 10 patients with SCLC with metastases in the RLN formed the II group.

**Results.** It was revealed, that the maximums of the distribution density (DD) of CD4+ and CD8+ lymphocytes are typical for the peritumorous sections of the SCLC stroma. Moreover, the statistically significant differences between the CD4+ lymphocytes DD in the stroma of the I and the II groups cases were found: 401.2 (344.6, 511.3) vs. 622.4 (587.2, 793.9) cells/mm<sup>2</sup> in the peritumorous zones of the stroma; 298.0 (246.1, 350.1) vs. 484.8 (479.3, 690.6) cells/mm<sup>2</sup> in the intertumorous zones of the stroma. The maximum of the CD20+ lymphocytes DD in the I group cases was revealed in the peritumorous zones of the stroma, in the II group cases – in the intertumorous zones of the stroma, while the maximum of the plasmocytes DD was observed in the intertumorous zones of the stroma. The maximum of the macrophages DD is typical for the peritumorous zones of the stroma. Moreover, there are statistically significant differences between the macrophages DD in the intertumorous zones of the stroma in the I and the II groups cases: 259.5 (193.0, 325.2) vs. 507.1 (390.2; 617.8) cells/mm<sup>2</sup>.

**Conclusion.** SCLC without metastasis in the RLN is characterized by the predominant distribution of CD4+, CD8+ lymphocytes and CD68+ macrophages in the peritumorous zones of the stroma, as well as CD20+ lymphocytes and plasmocytes in the intertumorous zones of the tumor stroma. SCLC with metastases in the RLN differs by the predominance of CD20+ lymphocytes in the peritumorous zones of the stroma, as well as the significantly higher values of CD4+ lymphocytes in the peri- and intertumorous zones of the stroma, CD68+ macrophages in the intertumorous zones of the tumor stroma.

**Key words:**

lung neoplasms, non-small cell lung carcinoma, squamous cell carcinoma, immunohistochemistry.

**Pathologia**

2017; 14 (2), 136–141

Рак лёгкого (РЛ) является самым распространённым злокачественным новообразованием у мужчин во всём мире, при этом наибольшие показатели заболеваемости характерны для стран Центральной и Восточной Европы [1]. Согласно данным Национального канцер-реестра Украины, рак трахеи, бронха и лёгкого устойчиво занимает первое место в рейтингах заболеваемости и смертности мужчин от злокачественных новообразований [2].

Вероятность заболевания существенно возрастает при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды, способствующих развитию хронического воспаления в лёгких (курение, профессиональные вредности и другие) [3,4]. Особый интерес в настоящее время вызывает изучение особенностей опухолевого микроокружения РЛ, одним из основных компонентов которого является воспалительно-клеточный инфильтрат. В составе последнего: CD3+ Т-лимфоциты, CD4+ Т-хелперы, цитотоксические CD8+ Т-клетки, CD20+ В-клетки, р1с+ плазматические клетки, активированные MUM1+ В-клетки, CD68+ макрофаги, CD117+ тучные клетки. CD11с+ мононуклеары, PD1+ миелоидные клетки и нейтрофильные гранулоциты (myeloperoxidase+) [5]. Иммуноциты составляют отдельное звено онкогенеза и, формируя опухолевое микроокружение, реализуют новые функции. Доказано, что опухолеассоциированные иммуноциты оказывают влияние на выживаемость опухолевых клеток, процессы пролиферации и апоптоза, также принимают участие в реализации метастатического каскада [6].

В ряде исследований было показано, что увеличение количества Т-лимфоцитов в опухоли, а также в перитуморозной строме ассоциировано с лучшим прогнозом для пациентов с меланомой, раком молочной железы, предстательной железы, головы и шеи [7]. G. A. Vanat et al. (2015) установили, что количество CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцитов, а также CD68+ макрофагов и CD117+ тучных клеток в ткани РЛ значительно превышает таковое в нормальных лёгких, что связано с реализацией противоопухолевого ответа системой иммунного надзора [5]. Вопрос о значении

особенностей распределения иммунокомпетентных клеток в РЛ всё ещё остаётся открытым [8].

### Цель работы

Охарактеризовать иммуногистохимическими методиками особенности иммуноцитарного микроокружения неметастатического плоскоклеточного рака лёгкого и рака с метастазами в регионарных лимфатических узлах.

### Материалы и методы исследования

Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование операционного материала 20 больных плоскоклеточным раком лёгкого (ПРЛ). Пациенты были разделены на две группы: I группу сформировали 10 больных ПРЛ без метастазов в регионарных лимфатических узлах (РЛУ) (pT<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>G<sub>1-3</sub>), II группу – 10 больных ПРЛ с метастазами в РЛУ (pT<sub>1-2</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>G<sub>1-3</sub>). Критериями исключения служило наличие отдалённых метастазов, а также прорастание опухоли в смежные органы.

Микроскопические особенности ПРЛ и иммуноклеточной инфильтрации опухолевой стромы оценивали в микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. ИГХ-исследование проводилось с использованием моноклональных мышинных антител CD4, Clone MT310 (ДАКО, Дания), CD8 T-Cell, Clone C8/144B (ДАКО, Дания), CD20, Clone L26 (ДАКО, Дания), Plasma Cell Ab-1 Plas, Clone LIV3G11 (NeoMarkers, США), CD68 Macrophage, Clone PG-M1 (ДАКО, Дания), а также системы визуализации DAKO EnVision+ System с диаминобензидином (ДАКО, Дания).

Проведён количественный анализ распределения иммуноцитов в трёх зонах ПРЛ: в опухолевых комплексах, в перитуморозной и интертуморозной зоне опухолевой стромы. Разделение стромы опухоли на перитуморозную и интертуморозную зоны основано на литературных данных, согласно которым иммунные реакции более выражены в участках стромы, непосредственно прилежащих к опухолевым комплексам [7].

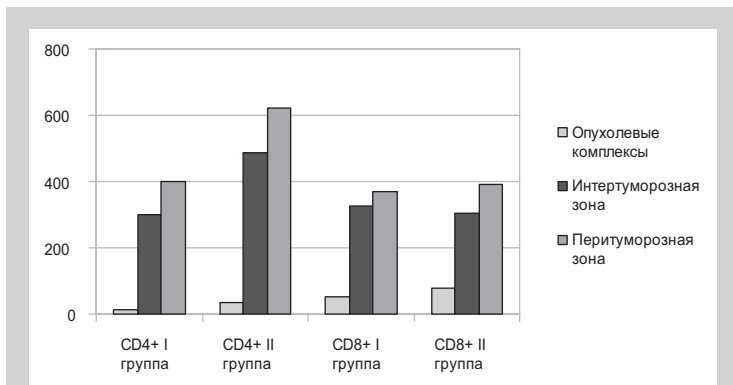


Рис. 1. Медианы плотности распределения CD4+ и CD8+ лимфоцитов в опухолевых комплексах, интертуморозной и перитуморозной зонах стромы плоскоклеточного рака лёгкого (I группа – неметастатический рак, II группа – рак с метастазами в регионарных лимфоузлах).

Перитуморозную зону толщиной 25 мкм составили участки стромы, располагающиеся по периметру опухолевых комплексов, а оставшиеся участки стромы составили интертуморозную зону. Срезы микропрепаратов фотографировали цифровой фотокамерой Canon EOS 1000D (Japan) в микроскопе AxioPlan 2 (Carl Zeiss, ФРГ) при увеличении в 200 раз; в каждом случае фотографировали 5 репрезентативных полей зрения. С целью проведения подсчётов был использован пакет Photoshop CC (2014), инструмент counter, исходя из известного размера эритроцита (7 мкм); программой Photoshop CC определялась площадь, равная квадратному миллиметру. Затем рассчитывалась плотность распределения иммуноцитов на квадратный миллиметр как количество клеток на данной площади.

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием пакетов анализа Excel Microsoft Office 2013 и Statistica for Windows 6.0 (StatSoft Inc., лицензия № АХХR712D833214FAN5). Плотность распределения (ПР) иммуноцитов рассчитывали на квадратный миллиметр. Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ), сравнение проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Разница между полученными данными расценивалась как статистически значимая при значении  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

При микроскопическом исследовании ПРЛ установлено, что опухоль состоит преимущественно из полей атипичных клеток с признаками плоскоклеточной дифференцировки. Десмопластическая строма ПРЛ представлена грубоволокнистой соединительной тканью с выраженной иммуноклеточной инфильтрацией. Проведённое ИГХ исследование показало, что клеточное микроокружение опухоли формируют CD4+ Т-лимфоциты, CD8+ Т-лимфоциты, CD20+ В-лимфоциты, p1c+ плазмциты и CD68+ макрофаги. Большинство иммунокомпетентных клеток распределено в опухолевой строме диффузно, за исключением CD20+ лимфоцитов, отличающихся тенденцией к формированию лимфоидных фолликулов. ИГХ-исследование позволило провести количественную оценку

иммуноклеточного инфильтрата: оценить плотность распределения (ПР) иммуноцитов в отдельных зонах ПРЛ, а также сравнить показатели распределения в неметастатическом и метастатическом ПРЛ.

Показатель медианы ПР CD4+ Т-лимфоцитов варьировал в широком диапазоне в зависимости от зоны опухоли. Медиана ПР CD4+ лимфоцитов в опухолевых комплексах неметастатического ПРЛ составила 13,5 (2,0; 26,9) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 34,8 (0,0; 52,3) кл/мм<sup>2</sup>. Аналогичный показатель существенно отличался в строме опухоли: в интертуморозной зоне неметастатического ПРЛ медиана ПР CD4+ Т-лимфоцитов составила 298,0 (246,1; 350,1) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 484,8 (479,3; 690,6) кл/мм<sup>2</sup>; в перитуморозной зоне неметастатического ПРЛ – 401,2 (344,6; 511,3) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 622,4 (587,2; 793,9) кл/мм<sup>2</sup>. Таким образом, выявлено, что наименьшая ПР CD4+ Т-лимфоцитов имеет место в опухолевых комплексах ПРЛ, а наибольшая – в перитуморозной зоне стромы опухоли (рис. 1). При использовании непараметрического U-критерия Манна–Уитни выявлены статистически значимые различия между медианами ПР CD4+ лимфоцитов в разных зонах стромы ПРЛ: для интертуморозной зоны U-критерий составил 16,0 ( $p = 0,011$ ), для перитуморозной зоны – 17,0 ( $p = 0,014$ ). Таким образом, установлено, что ПРЛ с метастазами в РЛУ характеризуется большей ПР CD4+ Т-лимфоцитов в строме в сравнении с ПРЛ без метастазов в РЛУ.

Выявлена аналогичная закономерность распределения CD8+ Т-лимфоцитов в опухолевых комплексах и в строме ПРЛ: минимальная ПР CD8+ лимфоцитов имеет место в опухолевых комплексах, а максимальная ПР – в перитуморозной зоне стромы опухоли (рис. 1). Медиана ПР CD8+ лимфоцитов в опухолевых комплексах неметастатического ПРЛ составила 52,7 (36,0; 126,9) кл/мм<sup>2</sup>, а в ПРЛ с метастазами в РЛУ – 77,0 (38,2; 110,7) кл/мм<sup>2</sup>. Медиана ПР CD8+ лимфоцитов в интертуморозной зоне стромы неметастатического ПРЛ составила 327,0 (294,9; 400,9) кл/мм<sup>2</sup>, а в ПРЛ с метастазами в РЛУ – 302,3 (193,8; 490,0) кл/мм<sup>2</sup>. Медиана ПР CD8+ лимфоцитов в перитуморозной зоне неметастатического ПРЛ составила 371,5 (283,7; 437,5) кл/мм<sup>2</sup>, в ПРЛ с метастазами в РЛУ – 391,123 (270,1; 452,9) кл/мм<sup>2</sup>. Несмотря на то, что имеется тенденция к увеличению показателей ПР CD8+ Т-лимфоцитов в ПРЛ с метастатическим поражением РЛУ, статистически значимых различий между вышеназванными показателями ПР CD8+ Т-лимфоцитов в обеих исследованных группах не выявлено (U-критерий для опухолевых комплексов ПРЛ составил 43,0 ( $p = 0,623$ ), для интертуморозной и перитуморозной зон стромы ПРЛ – 49,0 ( $p = 0,970$ )).

Известно, что CD4+ Т-лимфоциты играют важную роль в реализации противоопухолевого иммунного ответа: они активируют цитотоксические CD8+ клетки, а также ингибируют ангиогенез в опухоли [8]. CD8+ Т-лимфоциты, в свою очередь, в ответ на распознавание опухолеассоциированных антигенов вырабатывают цитотоксические медиаторы, воздействующие непосредственно на опухолевые комплексы [8]. Показатель ПР CD8+ лимфоцитов в опухолевых

комплексах значительно превысил таковой для других исследованных иммуноцитов, что объясняется особенностями функций этой популяции лимфоцитов. Однако, несмотря на значительное количество CD4+ и CD8+ иммуноцитов в опухолевом микроокружении, следует учесть возможность модификации их свойств. В ряде исследований было показано, что с прогрессированием РЛ возрастает интенсивность иммуноклеточной инфильтрации [5]. Вероятно, опухолеассоциированные цитокины также оказывают влияние на Т-лимфоциты, угнетая их противоопухолевые свойства. Допускается приобретение иммуноцитами новых свойств, способствующих опухолевой прогрессии [9].

Литературные данные, описывающие особенности распределения CD4+ и CD8+ иммуноцитов в ПРЛ, варьируют, однако согласуются с полученными нами данными по общему принципу: количество иммуноцитов в строме опухоли значительно превышает таковое в опухолевых комплексах [5,8]. Большой показатель ПР иммуноцитов в опухолевой строме, в сравнении с аналогичным показателем для опухолевых комплексов, свидетельствует о большей активности противоопухолевых цитокинов в стромальном компоненте опухоли. Полученные данные подтверждают информацию о том, что клеточные элементы опухолевого микроокружения взаимодействуют с собственно опухолевыми клетками.

Исследование CD20+ В-лимфоцитов в ПРЛ показало, что минимальная ПР этих клеток характерна для опухолевых комплексов, а максимальная ПР – для опухолевой стромы (рис. 2). Медиана ПР CD20+ лимфоцитов в опухолевых комплексах нематастатического ПРЛ составила 2,7 (0,000; 6,7) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 1,4 (0,0; 35,7) кл/мм<sup>2</sup>. Медиана ПР CD20+ лимфоцитов в разных зонах стромы ПРЛ составила: в интертуморозной зоне нематастатического ПРЛ – 359,136 (53,8; 678,8) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 168,2 (84,9; 299,1) кл/мм<sup>2</sup>; в перитуморозной зоне нематастатического ПРЛ – 129,2 (0,0; 444,8) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 186,3 (0,0; 330,4) кл/мм<sup>2</sup>. Примечательно, что медиана ПР CD20+ В-лимфоцитов в интертуморозной зоне стромы ПРЛ без метастазов в РЛУ значительно превышает таковую в ПРЛ с метастазами в РЛУ. Однако при статистическом анализе значимой разницы между полученными показателями ПР в двух группах исследования выявлено не было (U-критерий для опухолевых комплексов составил 46,5 (p = 0,809), для интертуморозной зоны – 34,0 (p = 0,241), для перитуморозной зоны – 48,5 (p = 0,939)).

Установлено, что plc+ плазмциты выявляются в строме ПРЛ, а также в опухолевых комплексах ПРЛ с метастазами в РЛУ. В ПРЛ без метастазов в РЛУ плазмцитарная инфильтрация опухолевых комплексов не выявляется. Примечательно также, что максимальные показатели ПР плазмцитов характерны для интертуморозной зоны стромы ПРЛ (рис. 2). Медиана ПР plc+ клеток в опухолевых комплексах ПРЛ с метастазами в РЛУ составила 15,1 (2,8; 25,5) кл/мм<sup>2</sup>. Медиана ПР plc+ плазмцитов в опухолевой строме составила: в интертуморозной зоне нематастатического ПРЛ – 572,609 (443,331; 760,336) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 907,2 (409,9; 1362,0) кл/мм<sup>2</sup>; в перитуморозной зоне

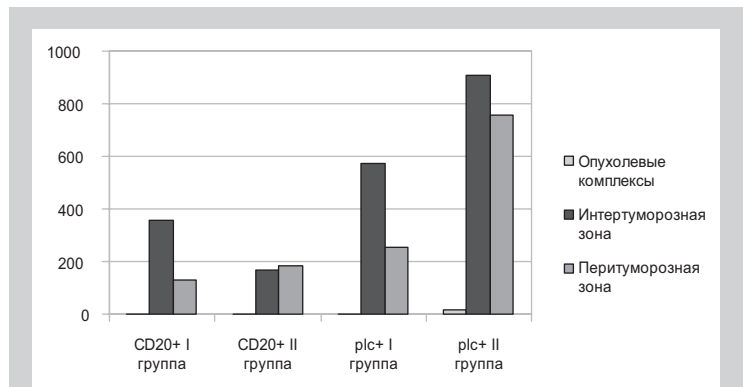


Рис. 2. Медианы плотности распределения CD20+ лимфоцитов и plc+ плазмцитов в опухолевых комплексах, интертуморозной и перитуморозной зонах стромы плоскоклеточного рака лёгкого (I группа – нематастатический рак, II группа – рак с метастазами в регионарных лимфоузлах).

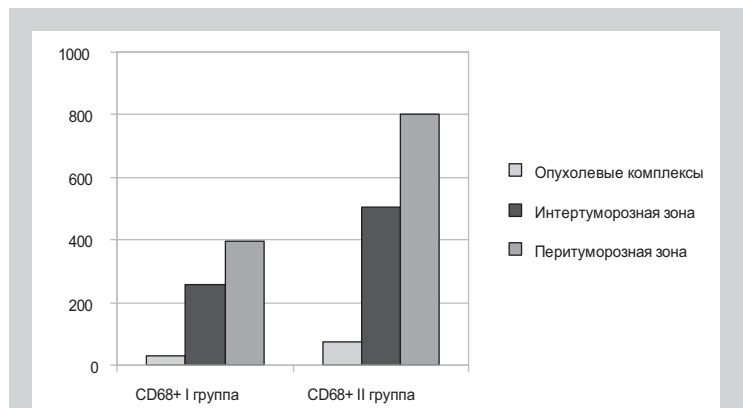


Рис. 3. Медианы плотности распределения CD68+ макрофагов в опухолевых комплексах, интертуморозной и перитуморозной зонах стромы плоскоклеточного рака лёгкого (I группа – нематастатический рак, II группа – рак с метастазами в регионарных лимфоузлах).

нематастатического ПРЛ – 252,3 (166,5; 414,7) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 754,2 (622,7; 928,6) кл/мм<sup>2</sup>. При статистическом анализе значимой разницы между показателями ПР плазмцитов в разных зонах опухолевой стромы исследования не выявлено (U-критерий для интертуморозной зоны стромы – 5,0 (p = 0,470), для перитуморозной зоны стромы – 1,0 (p = 0,061)).

В-лимфоциты отвечают за реализацию гуморального звена иммунного ответа. При распознавании антигенных детерминант опухоли эти клетки активируются, пролиферируют и дифференцируются в лимфатических узлах в плазмциты, которые синтезируют антитела к распознанным антигенам [10]. Исследования, посвящённые роли В-лимфоцитов и плазмцитов в РЛ, немногочисленны. Известно, что количество этих клеток в ткани РЛ больше такового в нормальном лёгком [5]. M. Lohr et al. (2013), M. Fujimoto et al. (2013) обнаружили наличие корреляций между возрастанием количества В-клеток и плазмцитов в микроокружении ПРЛ и большими показателями выживаемости пациентов [11,12]. Вероятно, В-клеточный и плазмклеточный компоненты микроокружения обеспечивают реализацию противоопухолевого иммунного ответа в РЛ, не изменяя коренным образом своих свойств.

Выяснено, что ПР CD68+ макрофагов в стромальном компоненте ПРЛ значительно выше, чем в опухолевых комплексах. Отмечена тенденция к возрастанию ПР макрофагов в ПРЛ с метастазами в РЛУ (рис. 3). Медиана ПР CD68+ клеток в опухолевых комплексах нематастатического ПРЛ составила 29,7 (20,0; 35,2) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 74,8 (50,3; 181,9) кл/мм<sup>2</sup>. Медиана ПР макрофагов в разных зонах стромы составила: в интертуморозной зоне нематастатического ПРЛ – 259,5 (193,0; 325,2) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 507,1 (390,2; 617,8) кл/мм<sup>2</sup>; в перитуморозной зоне нематастатического ПРЛ – 395,0 (285,0; 503,2) кл/мм<sup>2</sup>, ПРЛ с метастазами в РЛУ – 802,2 (377,7; 979,1) кл/мм<sup>2</sup>. Применение непараметрического U-критерия Манна-Уитни позволило выявить достоверные отличия между медианами ПР CD4+ макрофагов в интертуморозной строме нематастатического и метастатического ПРЛ: U-критерий составил 11,0 (p = 0,004). Таким образом, было выявлено, что ПРЛ с метастазами в РЛУ характеризуется большей ПР макрофагов в интертуморозной зоне стромы в сравнении с ПРЛ без метастазов в ПРЛ.

Тумор-ассоциированные макрофаги обладают двойственными свойствами, на основании чего они были разделены на две субпопуляции: M1 – макрофаги, эффекторные молекулы которых препятствуют росту опухоли (TNF $\alpha$ , активные формы кислорода и другие); M2 – макрофаги, продуцирующие матриксные металлопротеиназы, факторы ангиогенеза и иммуносупрессивные цитокины, способствующие опухолевой прогрессии [13]. В то же время R. Zaynagetdinov et al. [14] утверждают, что в условиях канцерогенеза обе субпопуляции макрофагов реализуют проопухолевый потенциал. G. A. Banat et al. (2015) установили: количество макрофагов в строме РЛ позитивно коррелирует с клинической стадией заболевания, что согласуется с полученными нами данными. Увеличение ПР макрофагов в строме ПРЛ с метастазами в РЛУ может свидетельствовать как об активации противоопухолевого иммунного ответа, так и о реализации макрофагами проопухолевых свойств.

## Выводы

1. Плоскоклеточный рак лёгкого без метастазов в регионарных лимфатических узлах характеризуется преобладанием CD4+, CD8+ лимфоцитов и CD68+ макрофагов в перитуморозных зонах стромы опухоли, а также преобладанием CD20+ лимфоцитов и р1с+ плазмочитов в интертуморозных зонах опухолевой стромы.

2. Для плоскоклеточного рака лёгкого с метастазами в регионарных лимфатических узлах характерно преобладание CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцитов и CD68+ макрофагов в перитуморозных зонах стромы опухоли, а р1с+ плазмочитов – в интертуморозных зонах опухолевой стромы.

3. Плоскоклеточный рак лёгкого с метастазами в регионарных лимфатических узлах отличается большей плотностью распределения CD4+ лимфоцитов в пери- и интертуморозных зонах опухолевой стромы [401,2 (344,6; 511,3) vs. 622,4 (587,2; 793,9) кл/мм<sup>2</sup>; 298,0 (246,1; 350,1) vs. 484,8 (479,3; 690,6) кл/мм<sup>2</sup>],

а также CD68+ макрофагов в интертуморозных зонах стромы опухоли [259,5 (193,0; 325,2) vs. 507,1 (390,2; 617,8) кл/мм<sup>2</sup>].

## Перспективы дальнейших исследований.

Большой интерес представляет выяснение роли M1 и M2 субпопуляций макрофагов в опухолевом микроокружении ПРЛ.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госбюджетной НИР «Дослідження інвазивно-метастатичних властивостей пухлин і їх раннє прогнозування в біоптатах хворих» (0114U000967) 2014–2016, которая финансировалась МЗ Украины.

**Funding.** The research was carried out within the state budget scientific-research work “Research of invasive-metastatic properties of tumors and their early prognosis in biopsies of patients” (0114U000967), 2014–2016, funded by the Ministry of Health of Ukraine.

## Список литературы

- [1] Torre L. Global Cancer Facts & Figures / L. Torre, R. Siegel, A. Jemal. – Atlanta: American Cancer Society, 2015. – 64 p.
- [2] Рак в Україні, 2015–2016 / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. Й. Михайлович та ін. // Бюлетень Національного канцер-реєстру України. – 2017. – №18. – С. 37.
- [3] Emerging roles of T helper 17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis / E. A. Marshall, K. W. Ng, S. H. Kung et al. // *Molecular Cancer*. – 2016. – Vol. 15. – №1. – P. 67–74.
- [4] Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer / T. Kinoshita, R. Muramatsu, T. Fujita et al. // *Annals of Oncology*. – 2016. – Vol. 27. – №11. – P. 2117–2123.
- [5] Immune and Inflammatory Cell Composition of Human Lung Cancer Stroma / G. A. Banat, A. Tretny, S. S. Pullamsetti et al. // *PLOS one*. – 2015. – Vol. 10. – Issue. 9. – e0139073.
- [6] Tumor-associated immune factors are associated with recurrence and metastasis in non-small cell lung cancer / X. Yan, S. C. Jiao, G. Q. Zhang et al. // *Cancer Gene Therapy*. – 2017. – Vol. 24. – №2. – P. 57–63.
- [7] Lo Presti E. Tumor-Infiltrating  $\gamma\delta$  T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programming in the Tumor Microenvironment / E. Lo Presti, F. Dieli, S. Meraviglia // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 608–616.
- [8] Jackutéa J. Distribution of CD4+ and CD8+ T cells in tumor islets and stroma from patients with non-small cell lung cancer in association with COPD and smoking / J. Jackutéa, M. Žemaitisa, D. Pranysb // *Medicina*. – 2015. – №51. – P. 263–271.
- [9] Tumor-Induced CD8+ T-Cell Dysfunction in Lung Cancer Patients / H. Prado-Garcia, S. Romero-Garcia, D. Aguilar-Cazares et al. // *Journal of Immunology Research*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 741741.
- [10] Nelson B. H. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes / B. H. Nelson // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 185. – №9. – P. 4977–4982.
- [11] The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer / M. Lohr, K. Edlund, J. Botting et al. // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 333. – №2. – P. 222–228.
- [12] Stromal plasma cells expressing immunoglobulin G4 subclass in non-small cell lung cancer / M. Fujimoto, A. Yoshizawa, S. Sumiyoshi et al. // *Human Pathology*. – 2013. – Vol. 44. – №8. – P. 1569–1576.
- [13] The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time / J. Ma, L. Liu, G. Che et al. // *BMC Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – P. 112–120.
- [14] A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis / R. Zaynagetdinov, T. P. Sherrill, V. V. Polosukhin et al. // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187. – №11. – P. 5703–5711.

## References

- [1] Torre, L., Siegel, R., & Jemal, A. (2015) Global Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society.
- [2] Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Yu. I., Horokh, E. L., Ryzhov, A. U., Sumkina, O. V., & Kutsenko, L. B. (2017). Rak v Ukraini, 2015–2016 [Cancer in Ukraine, 2015–2016]. *Biulleten natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy*, 18, 37. [in Ukrainian].
- [3] Marshall, E. A., Ng, K. W., Kung, S. H., Conway, E. M., Martinez, V. D., Halvorsen, E. C., et al. (2016) Emerging roles of T helper 17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis. *Molecular Cancer*, 15(1), 67–74. doi: 10.1186/s12943-016-0551-1.

- [4] Kinoshita, T., Muramatsu, R., Fujita, T., Nagumo, H., Sakurai, T., Noji, S., et al. (2016) Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 27(11), 2117–2123. doi: 10.1093/annonc/mdw319.
- [5] Banat, G. A., Tretyn, A., Pullamsetti, S. S., Wilhelm, J., Weigert, A., Olesch, C., et al. (2015) Immune and Inflammatory Cell Composition of Human Lung Cancer Stroma. *PLoS one*, 10(9), e0139073. doi: 10.1371/journal.pone.0139073.
- [6] Yan, X., Jiao, S. C., Zhang, G. Q., Guan, Y., & Wang, J. L. (2017) Tumor-associated immune factors are associated with recurrence and metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Therapy*, 24(2), 57–63. doi: 10.1038/cgt.2016.40.
- [7] Lo Presti, E., Dieli, F., & Meraviglia, S. (2014) Tumor-Infiltrating  $\gamma\delta$  T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programming in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 5, 608–616. doi: 10.3389/fimmu.2014.00607.
- [8] Jackutė, J., Žemaitis, M., & Pranysb, D. (2015) Distribution of CD4+ and CD8+ T cells in tumor islets and stroma from patients with non-small cell lung cancer in association with COPD and smoking. *Medicina*, 51(5), 263–271. doi: 10.1016/j.medic.2015.08.002.
- [9] Prado-García, H., Romero-García, S., Aguilar-Cazares, D., Menezes-Flores, M., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2012) Tumor-Induced CD8+ T-Cell Dysfunction in Lung Cancer Patients. *Journal of Immunology Research*, 2012, 741741. doi: 10.1155/2012/741741.
- [10] Nelson, B. H. (2010) CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. / Nelson. *The Journal of Immunology*, 185(9), 4977–4982. doi: 10.4049/jimmunol.1001323.
- [11] Lohr, M., Edlund, K., Botling, J., Hammad, S., Hellwig, B., Othman, A., et al. (2013) The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 333(2), 222–228. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.036.
- [12] Fujimoto, M., Yoshizawa, A., Sumiyoshi, S., Sonobe, M., Kobayashi, M., Koyanagi, I., et al. (2013) Stromal plasma cells expressing immunoglobulin G4 subclass in non-small cell lung cancer. *Human Pathology*, 44(8), 1569–1576. doi: 10.1016/j.humpath.2013.01.002.
- [13] Ma, J., Liu, L., Che, G., Yu, N., Dai, F., & You, Z. (2010) The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer*, 10, 112–120. doi: 10.1186/1471-2407-10-112.
- [14] Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Polosukhin, V. V., Han, W., Ausborn, J. A., McLoed, A. G., et al. (2011) A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. *The Journal of Immunology*, 187(11), 5703–5711. doi: 10.4049/jimmunol.1100558.

#### Сведения об авторах:

Баударбекова М. М., канд. мед. наук, доцент  
каф. патологической анатомии и судебной медицины,  
Запорожский государственный медицинский университет,  
Украина.

Калмыкова А. В., магистр каф. патологической анатомии  
и судебной медицины, Запорожский государственный  
медицинский университет, Украина.

#### Відомості про авторів:

Баударбекова М. М., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної  
анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний  
університет, Україна.

Калмыкова А. В., магистр каф. патологічної анатомії і судової  
медицини, Запорізький державний медичний університет,  
Україна.

#### Information about authors:

Vaudarbekova M. M., MD, PhD, Associate Professor  
of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine,  
Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Kalmykova A. V., Master of the Department of Pathological  
Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical  
University, Ukraine.

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 19.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 30.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 06.06.2017

# Dynamics of structural, functional and vegetative changes of heart under the influence of combined therapy with the use of ursodeoxycholic acid and L-arginine in patients with coronary heart disease associated with nonalcoholic fatty liver disease

N. S. Mykhailovska, L. Ye. Miniailenko

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

## Key words:

coronary artery disease, nonalcoholic fatty liver disease, hemodynamics, autonomic nervous system, ursodeoxycholic acid, arginine.

## Pathologia

2017; 14 (2), 142–148

## DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109268

## E-mail:

luba89@gmail.com

**Objective:** to study the effect of the ursodeoxycholic acid and L-arginine combination on the background of basic therapy on the structural and functional state of the heart and indicators of the autonomic nervous system in patients with coronary heart disease combined with the non-alcoholic fatty liver disease.

**Methods:** The study involved 56 patients with coronary heart disease (CHD) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Patients were randomized into two groups. Patients in the 1<sup>st</sup> group (n = 30) received only basic therapy of coronary heart disease, patients in the 2<sup>nd</sup> group (n = 26) in addition to basic therapy were prescribed with UDCA and L-arginine.

All patients underwent daily ECG monitoring and two-dimensional echocardiography. Statistical data processing was carried out using the program package Statistica 6.0.

**Results:** In the 2<sup>nd</sup> group after 3 months of treatment there were observed decrease in indicators: myocardial stiffness index by 45 %,  $V_a$  by 7.4 %, mean heart rate in both the active (11.72 %) and the passive (8 %) periods, the number (80 %) and duration (85 %) of tachycardia episodes, total number of ventricular (84 %) and supraventricular (63 %) extrasystoles per day, duration of the ST depression (by 55 %) and the duration of its maximum episode (by 75 %) and LF/HF ratio to 24 % in the active and 27 % in the passive period along with an increase of indicators:  $V_e$  by 7.4 %, SDNNi in both active (18 %) and passive (20 %) periods ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** The positive effects of adding UDCA and L-arginine to basic therapy in patients with coronary artery disease and NAFLD include improved diastolic function, decreased myocardial ischemia, decreased myocardial stiffness and the number of ventricular and supraventricular extrasystoles, as well as increased total VPS, normalization of the sympathetic-parasympathetic balance by increasing the parasympathetic component of the cardiovascular system.

## Ключові слова:

ішемічна хвороба серця, неалкогольна жирова хвороба печінки, гемодинаміка, вегетативна нервова система, урсодезоксихолева кислота, аргінін.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 142–148

## Динаміка структурно-функціональних і вегетативних змін серця під впливом комбінованої терапії урсодезоксихолевою кислотою та L-аргініном у хворих на ішемічну хворобу серця, асоційовану з неалкогольною жировою хворобою печінки

Н. С. Михайловська, Л. Є. Міняйленко

**Мета роботи** – вивчити вплив комбінації урсодезоксихолевої кислоти та L-аргініну на тлі базисної терапії на структурно-функціональний стан серця та показники вегетативної нервової системи у хворих на ішемічну хворобу серця, що поєднана з неалкогольною жировою хворобою печінки.

**Матеріали та методи.** У дослідженні взяли участь 56 пацієнтів з ІХС і НАЖХП. Пацієнти рандомізовані у дві групи. Пацієнти 1 групи (n = 30) отримували тільки базисну терапію ішемічної хвороби серця, пацієнтам 2 групи (n = 26) додатково до базисної терапії призначались УДХК і L-аргінін.

Усім пацієнтам проведені добовий моніторинг ЕКГ за Холтером і двовимірну ехокардіографія з імпульсно-хвильовою доплерографією. Статистичні дані опрацьовані за допомогою пакета програм Statistica 6.0.

**Результати.** У 2 групі після 3 місяців лікування спостерігали вірогідне зниження показників: індексу жорсткості міокарда – на 45 %,  $V_a$  – на 7,4 %, середньої частоти серцевих скорочень як в активному (11,7 %) , так і в пасивному (8 %) періодах, кількості (80 %) і тривалості (85 %) епізодів тахікардії, загальної кількості шлуночкових (84 %) та суправентрикулярних (63 %) екстрасистол за добу, тривалості депресії сегмента ST (на 55 %) і тривалості її максимального епізоду (на 75 %) і співвідношення LF/HF на 24 % в активному та 27 % у пасивному періодах, поряд із вірогідним збільшенням показників:  $V_e$  – на 7,4 %, SDNNi як в активному (на 18 %), так і в пасивному (на 20 %) періодах ( $p < 0,05$ ).

**Висновки.** Серед позитивних ефектів додавання УДХК і L-аргініну до базисної терапії у хворих на ІХС і НАЖХП – поліпшення показників діастолічної функції, зменшення проявів ішемії міокарда, зниження жорсткості міокарда та кількості шлуночкових і суправентрикулярних екстрасистол, а також збільшення загальної потужності ВНС, нормалізація симпато-парасимпатичного балансу шляхом збільшення впливу парасимпатичної складової на серцево-судинну систему.

## Динамика структурно-функциональных и вегетативных изменений сердца под влиянием комбинированной терапии урсодезоксихолевой кислотой и L-аргинином у больных ишемической болезнью сердца, ассоциированной с неалкогольной жировой болезнью печени

Н. С. Михайловская, Л. Е. Миняйленко

**Цель работы** – изучить влияние комбинации урсодезоксихолевой кислоты и L-аргинина на фоне базисной терапии на структурно-функциональное состояние сердца и показатели вегетативной нервной системы у больных ишемической болезнью сердца, совмещённой с неалкогольной жировой болезнью печени.

**Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 56 пациентов с ИБС и НАЖБП. Пациенты были рандомизированы в две группы. Пациенты 1 группы (n = 30) получали только базисную терапию ишемической болезни сердца, пациентам 2 группы (n = 26) дополнительно к базисной терапии назначались УДХК и L-аргинин. Всем пациентам проведены суточный мониторинг ЭКГ по Холтеру и двухмерная эхокардиография с импульсно-волновой доплерографией. Обработка статистических данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 6.0.

**Результаты.** Во 2 группе после 3 месяцев лечения наблюдали достоверное снижение показателей: индекса жёсткости миокарда – на 45 %,  $V_a$  – на 7,4 %, средней частоты сердечных сокращений как в активном (11,7 %), так и в пассивном (8 %) периодах, количества (80 %) и продолжительности (85 %) эпизодов тахикардии, общего количества желудочковых (84 %) и суправентрикулярных (63 %) экстрасистол в сутки, продолжительности депрессии сегмента ST (на 55 %) и продолжительности её максимального эпизода (на 75 %) и соотношения LF/HF на 24 % в активном и 27 % в пассивном периодах наряду с достоверным увеличением показателей:  $V_e$  – на 7,4 %, SDNNi как в активном (на 18 %), так и в пассивном (на 20 %) периодах ( $p < 0,05$ ).

**Выводы.** Среди положительных эффектов добавления УДХК и L-аргинина к базисной терапии у больных ИБС и НАЖБП – улучшение показателей диастолической функции, уменьшение проявлений ишемии миокарда, снижение жёсткости миокарда и количества желудочковых и суправентрикулярных экстрасистол, а также увеличение общей мощности ВНС, нормализация симпато-парасимпатического баланса за счёт увеличения влияния парасимпатической составляющей на сердечно-сосудистую систему.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, неалкогольная жировая болезнь печени, гемодинамика, вегетативная нервная система, урсодезоксихолевая кислота, аргинин.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 142–148

### Introduction

Coronary heart disease (CHD) continues to occupy the principal place in the structure of morbidity and is one of the leading causes of mortality and population disability [1]. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered as one, associated with the metabolic syndrome states, thus significantly increasing the risk of cardiovascular diseases [2]. The combination of CHD with NAFLD leads to a number of structural and neurohumoral disorders that affect the course of both diseases through the common pathogenic mechanisms [3].

Structural remodeling of the heart in these comorbid diseases aggravates the cardiovascular prognosis and determines the strategy of patient management [4]. For today, there are convincing shreds of evidence of the liver morphofunctional disorders negative influence on the structural and functional state of the heart in people without cardiac pathology. They chiefly relate to the study of cardio hemodynamics in patients with alcoholic steatohepatitis and liver cirrhosis [5]. It was established that the presence of NAFLD affects the cardiac remodeling due to neurohumoral activation, vegetative changes, volume overload, endothelial dysfunction, insulin resistance, oxidative stress and systemic inflammation [6].

One of the leading roles in the pathogenesis of both coronary heart disease and NAFLD is played by the autonomic dysfunction syndrome, which is based on dysregulation at the level of suprasedgmental and segmental structures with the imbalance in the functioning of the sympathetic and parasympathetic parts of the autonomic nervous system [7].

Therefore, the improvement of treatment approaches to correct the structural and functional state of the heart

and the autonomic nervous system' violations in patients with coronary heart disease comorbid with the nonalcoholic fatty liver disease is an actual task of modern internal diseases' clinic. It is viewed promising to use the combination of ursodeoxycholic acid (UDCA) and exogenous L-arginine for this purpose against the background of basic therapy in this category of patients.

UDCA is a drug with choleric, hypolipidemic, anti-inflammatory, as well as vasodilating effects. These properties can be used in the treatment of patients with coronary heart disease with the concomitant nonalcoholic fatty liver disease [8].

L-arginine is a provisionally irreplaceable amino acid that is a substrate for NO synthase [9]. This amino acid has antioxidant, cytoprotective, anti-hypoxic, membrane stabilizing effects. Evidence available at present suggests that the administration of L-arginine improves the endothelial function in patients with angina, heart failure, hypercholesterolemia [10]. In experimental studies, the positive influence of L-arginine on the autonomic nervous system state [11] has been proven.

However, the question of the effectiveness and appropriateness of the administration of UDCA and L-arginine combination against the background of basic therapy in patients with coronary heart disease with the nonalcoholic fatty liver disease requires comprehensive research, thus the direction of our work has been determined.

**Purpose:** to study the effect of the ursodeoxycholic acid and L-arginine combination on the background of basic therapy on the structural and functional state of the heart and indicators of the autonomic nervous system in patients with coronary heart disease combined with the nonalcoholic fatty liver disease.

## Materials and methods of research

The research was conducted in the "Zavodsky District Central Clinical Hospital № 4" in Zaporizhzhia, which is the clinical base of the Department of General Practice – Family Medicine.

The perspective study in the parallel groups admitted 56 CHD associated with NAFLD patients, age median 56 (48; 60). Patients were divided into two groups by the method of block randomization using the table of random numbers of CHD and NAFLD patients (n = 56). Patients in the 1<sup>st</sup> group (n = 30) received only basic coronary heart disease therapy, patients in the 2<sup>nd</sup> group (n = 26) in addition to basic therapy were prescribed UDCA at a dose of 20 mg/kg of body weight per day and 4.2 % solution of L-arginine hydrochloride by intravenous infusion of 100 ml 1 time per day for 5 days followed by an oral application of 5 ml (1 g) three times a day. Duration of treatment was 3 months.

Angina pectoris was diagnosed according to the classification of the Canadian Association of Cardiologists. The presence of morpho-functional signs of non-alcoholic fatty liver disease was established by the ultrasound data according to the standard method.

Criteria for inclusion into the study: informed consent of the patient, presence of documented (verified) CHD and NAFLD. Exclusion criteria: alcoholic or liver cirrhosis, autoimmune and viral hepatitis, decompensated heart failure, acute coronary syndrome, or acute cerebrovascular accidents less than 3 months before the study, congenital or acquired heart defects, systemic, oncological, and autoimmune pathologies.

The studies were conducted in accordance with the Good Clinical Practice and the principles of the Helsinki Declaration. The protocol was approved by the Commission on Bioethics of Zaporizhzhia State Medical University, all the patients involved in the study gave written informed consent to participate in the study.

All patients were given general clinic, anthropometric research, daily ECG monitoring with the definition of myocardial ischemia manifestations, heart rate variability (HRV) with the help of portable cardiovascular system "CardiosensK" (Kharkiv). In the evaluation of HRV indices, the recommendations of the European Society of Cardiology, the North American Society for Cardiac Stimulation and Electrophysiology, the Ukrainian Association of Cardiologists, which describe measurement standards, physiological interpretation, and clinical use of HRV were used. The evaluation of the results was performed on the basis of the summation curves of the ST segment, heart rate deviations, and rhythm disturbance tables.

The following time indices were evaluated: SDNNi, ms – standard deviation of normal NN intervals for 24 hours; RMSSD, ms – standard deviation of the difference between sequential intervals NN; PNN50 % is the percentage of the successive NN intervals, the difference between which exceeds 50 ms. The following parameters were used for spectral HRV analysis: HF is a high-frequency spectrum component (0.15–0.4 Hz); LF – low-frequency spectrum component (0.04–1.5 Hz); LF/HF is the coefficient of sympathetic and parasympathetic balance, which reflects the balance of activity of the sympathetic and parasympathetic autonomic system units; LFn % – relative activity level of the vasomotor center; HFn % – relative

level of parasympathetic control activity; TP – total power of the spectrum; ULF – Ultra Low-Frequency Wave Power (up to 0.0033 Hz); VLF is the power of very low-frequency waves (0.0033–0.04 Hz).

Two-dimensional echocardiography and pulse-wave dopplerography were performed using the Esaote ultrasound scanner «Mylab 40» (Italy) according to the recommendations of the American Society of Echocardiography and the European Association for Echocardiography (2005).

The following parameters were determined (cm): the size of the right ventricle in the diastole (RVd., cm) and the right atrium in the diastole (RAD, cm), the left atrium (LA, cm) and the aorta, the end-diastolic (LVd, cm) and the end-systolic size (LVs, cm) of the left ventricle (LV), the thickness of the posterior wall (LVPW, cm), the thickness of the interventricular membrane (IVS). The end-diastolic volume (LV EDV, ml), the end-systolic volume (LV ESV, ml) were calculated by the Simpson method (1991), the left ventricular ejection fraction (LVEF, %), the mass of the myocardium (LVM, g) its indexation to the surface area of the body (IMM LV, g/m<sup>2</sup>). Left ventricular myocardial stiffness index (LV MSI) was calculated using the equation: left ventricular end-diastolic pressure (LV EDP) / left ventricular end-diastolic volume (LV EDV).

The relative thickness of the walls of the left ventricular (RWT) was calculated using the formula:  $RWT = (LVPW + IVS) / LVs$ , where: LVPW – the thickness of the LV posterior wall in the diastole, IVS – the thickness of the interventricular wall in diastole. For the study of transmitral diastolic blood flow, the maximum velocity of the early ( $V_e$ , cm/sec) and the late ( $V_a$ , cm/sec) of the filling of the LV, their ratio ( $V_e/V_a$ , units), and the isovolumic relaxation time (IVRT, ms) were determined.

The evaluation of the LV remodeling types was carried out according to the classification of A. Ganau et al. (1992). From the parasternal position on the short axis at the level of the main vessels for indirect evaluation of the presence of pulmonary hypertension, the pulsed-wave Doppler spectrum of the systolic blood flow through the pulmonary valve (PV) was obtained to calculate the mean pulmonary artery pressure (PAP) using the formula:

$$PAP = 80 - 0.5 \times T,$$

where T – time of systolic flow acceleration on the PV.

Statistical data processing was carried out using the program package Statistica 6.0 (StatSoft Inc., № AXX-R712D833214FAN5) according to the generally accepted methodology. The normal distribution was evaluated according to Shapiro–Wilk test. Since all of the analyzed data were different from the normal distribution, to compare the indices in two independent samples the Mann–Whitney U-criterion was used, and Wilcoxon's – in the dependent ones. All data are presented in the form of Median and Quaternary Distribution Me (Q25; Q75). The differences were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

## Research results

The dynamics of structural and functional heart parameters in patients with coronary heart disease with concomitant NAFLD under the influence of combination therapy with the addition of UDCA and L-arginine is presented in *Table 1*.



**Table 1.** Dynamics of structural and functional heart parameters under the influence of treatment in patients with coronary heart disease comorbid with NAFLD

Index, Unit (of measurement)	The 1 <sup>st</sup> subgroup Basic therapy (n = 30)		The 2 <sup>nd</sup> subgroup Basic therapy with the addition of UDCA and L-arginine (n = 26)	
	Before treatment	In 3 months	Before treatment	In 3 months
LV RWT, un.	0.52 (0.42; 0.56)	0.51 (0.42; 0.56)	0.52 (0.50; 0.54)	0.47 (0.43; 0.48)
Aorta, cm	3.20 (3.10; 3.60)	3.20 (3.11; 3.60)	3.30 (2.98; 3.40)	3.02 (2.71; 3.30)
LAd, cm	3.80 (3.30; 4.20)	3.70 (3.45; 4.20)	3.70 (3.50; 3.90)	3.84 (3.51; 3.93)
LVd, cm	4.84 (4.70; 5.02)	4.82 (4.70; 5.00)	4.70 (4.60; 5.00)	4.85 (4.5; 5.1)
LV EDV, ml	120.14 (104.8; 127.4)	109.62 (102.6; 118.2)	102.36 (97.33; 118.4)	101.2 (106.9; 178.6)
LVs, cm	3.30 (3.20; 3.70)	3.25 (3.00; 3.47)	3.20 (3.00; 3.40)	3.52 (3.38; 3.82)
LV ESV, ml	44.13 (40.96; 58.12)	42.54 (35.0; 49.82)	42.96 (35.00; 47.43)	43.43 (43.09; 52.73)
LV EDP, mmHg	20.36 (15.98; 23.30)	20.26 (15.98; 22.5)	19.45 (18.21; 23.93)	18.82 (14.72; 24.47)
LV MSI, mmHg/ml	0.15 (0.12; 0.19)	0.17 (0.14; 0.19)	0.20 (0.13; 0.23)	0.11* (0.08; 0.16)
IVS, cm	1.20 (1.10; 1.30)	1.20 (1.05; 1.30)	1.20 (1.20; 1.24)	1.21 (1.13; 1.31)
LVPW, cm	1.30 (1.12; 1.30)	1.25 (1.12; 1.30)	1.23 (1.20; 1.30)	1.24 (1.11; 1.29)
LVEF, %	50.00 (44.00; 55.00)	50.00 (45.00; 55.00)	51.00 (47.00; 57.00)	54.00 (50.00; 59.50)
LVM, g	217 (200; 226)	213 (198; 226)	222 (200; 266)	232 (217; 235)
IMM LV, g/m <sup>2</sup>	112 (106; 125)	109 (101; 122)	111 (106; 121)	112 (106; 115)
RVd, cm	1.80 (1.70; 2.00)	1.80 (1.70; 2.00)	1.7250 (1.70; 1.80)	2.0 (1.8; 2.1)
RAd, cm	3.6 (3.5; 3.7)	3.6 (3.5; 3.8)	3.7 (3.4; 3.8)	3.9 (3.5; 4.0)
RVWd, cm	0.33 (0.26; 0.40)	0.28 (0.26; 0.40)	0.31 (0.30; 0.42)	0.30 (0.28; 0.40)
Ve, m/s	53.00 (47.00; 68.00)	50.50 (47.50; 62.00)	50.00 (40.00; 55.00)	54.00* (50.00; 73.00)
Va, m/s	68.00 (64.00; 71.00)	67.50 (63.50; 70.00)	69.00 (60.00; 87.00)	66.00* (50.00; 83.00)
Ve/Va	0.79 (0.68; 1.01)	0.84 (0.70; 1.03)	0.81 (0.67; 0.88)	0.78 (0.64; 1.27)
IVRT	104.0 (100.0; 111.0)	100.0 (100.0; 104.0)	108.0 (100.0; 117.0)	100.50 (95.5; 115.5)
PAP, mmHg	12.00 (12.00; 15.00)	12.00 (12.00; 17.00)	12.00 (12.00; 15.00)	12.00 (13.00; 15.00)

\*: the probability of indicators difference compared to the initial level is statistically significant;

#: the probability of difference in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups in three months of treatment is statistically significant.

In the dynamics of observation in 3 months of treatment in patients with CHD combined with NAFLD, the LV MSI decreased by 45 % ( $p < 0.05$ ). There was also a tendency towards a decrease of LV EDV, LV EDP, and an increase of LV EF. Changes in other parameters of structural adjustment of heart in patients of both groups during treatment did not reach the level of statistical probability.

In the analysis of transmitral blood flow rates, a significant decrease in the maximum rate of LV filling in the left atrium systole by 10.45 % was observed and an increase in the maximum speed of early diastolic filling by 7.40 % ( $p < 0.05$ ) was estimated. At the same time, there was a tendency to the decrease of the Ve/Va ratio and the time of isovolumetric relaxation of the left ventricle. The obtained data reflect the UDCA and L-arginine positive effect on the diastolic function of the left ventricle.

In patients of the 1<sup>st</sup> group, in 3 months of treatment, no reliable changes in the studied parameters were found. Only a tendency towards a decrease in the LV EDV, LVs and IVRT was noted. After 3 months of treatment in the patients of the 2<sup>nd</sup> group, compared with patients in the 1<sup>st</sup> group, the lower LV MSI levels by 35 %, LV EDV by 8 %, LV EDP by 7 % and the 8 % higher LV EF ( $p < 0.05$ ) were observed.

The results of daily ECG monitoring in the dynamics of observation in 3 months are shown in *Table 2*.

According to the results of daily ECG monitoring in patients receiving supplemental therapy with UDCA and L-arginine against the baseline therapy, there was a decrease in the mean heart rate in both the active (11 %) and the passive (8 %) periods in the dynamics of treatment. The number (by 80 %) and duration (by 85 %)

**Table 2.** Dynamics of indicators of ectopic cardiac activity in patients with coronary heart disease comorbid with NAFLD against the background of baseline therapy with the addition of UDCA and L-arginine

Index, Unit (of measurement)	The 1 <sup>st</sup> subgroup Basic therapy (n = 30)		The 2 <sup>nd</sup> subgroup Basic therapy With the addition of UDCA and L-arginine (n = 26)	
	Before treatment	In 3 months	Before treatment	In 3 months
Average heart rate over the entire period, beats per min.	70.5 (61.0; 75.0)	70.0 (67.0; 77.0)	68.5 (60.5; 74.0)	61 (60; 65)*
The average heart rate during the day, beats per min.	74.5 (62.0; 80.0)	75.5 (68.0; 83.0)	72.5 (63.0; 79.5)	64 (63; 72)**
Average heart rate at night, beats per min.	64.0 (55.5; 66.5)	60.0 (58.0; 69.0)	60.5 (60; 64)	56 (53; 59)*
Circadian Index	1.16 (1.13; 1.22)	1.20 (1.1; 1.24)	1.20 (1.07; 1.26)	1.19 (1.12; 1.21)
Minimum heart rate throughout the period, beats per min.	50.0 (47.0; 55.0)	49.0 (46.0; 62.0)	47 (44.5; 48.5)	48 (45; 64)
Maximum heart rate throughout the period, beats per min.	109.0 (97.0; 126.0)	99.0 (89.0; 120)	129 (97.5; 143)	97 (88; 101)*
Number of tachycardia episodes, episodes per 24 hours	24.5 (13.0; 90.0)	14.0 (11.0; 68.0)	60 (3; 173)	12 (3; 17)*
Tachycardia, minutes	39.0 (2.0; 163.0)	22.5 (16.0; 118)	83.5 (3.25; 266.5)	13 (1; 23)**
Ventricular extrasystoles, episodes per 24 hours	63 (20; 326)	54.5 (13; 248)	55 (2; 331)	8 (1; 54)**
Supraventricular extrasystole, episodes per 24 hours	119 (35; 173)	124 (60.0; 233)	94.5 (75; 223)	63.5 (39; 119)**
The duration of ST depression, minutes per 24 hours	16 (6; 18)	12 (7; 16)	13.5 (7.75; 23)	6.0 (3.5; 8.0)**
ST depression, uV	169 (142; 184)	175 (139; 225)	167 (120; 225)	150 (125; 185)
Episode of maximum ST depression duration, minutes	8 (4; 13)	5.75 (4; 10.5)	8 (4; 8)	2 (2; 4)**
Maximum ST depression, uV	97 (81; 110)	101 (85; 112)	88 (87; 112)	90 (85; 115)

\*: the probability of indicators difference compared to the initial level is statistically significant;

#: the probability of difference in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups in three months of treatment is statistically significant.

of episodes of tachycardia have significantly decreased. A significant decrease in the total number of ventricular (84 %) and supraventricular (63 %) extrasystoles per day was revealed. Also, in this category of patients, the decrease in the duration of depression of the ST segment (by 55 %) and the duration of its maximum episode (by 75 %) was noted.

In 3 months of follow-up in patients of Group 1, a significantly lower number and duration of tachycardia episodes were observed by 43 % and 42 % respectively ( $p < 0.05$ ). There was also a tendency to the reduction of depression duration of the ST segment per day. There were no significant changes in the number of supraventricular and ventricular extrasystoles after treatment in this group. In patients of the 2<sup>nd</sup> group, compared with patients of the 1<sup>st</sup> group, after treatment, the heart rate was below the heart rate for the entire observation period by 13 % and heart rate in the active period by 15 % ( $p < 0.05$ ). The number of episodes in the group of tachycardia did not differ significantly, however, the duration of episodes of tachycardia ( $p < 0.05$ ) was significantly lower (by 42 %). Also, in patients of the 2<sup>nd</sup> group, fewer episodes of ventricular and supraventricular extrasystoles were noted in 6.75 and 1.95 times, respectively, compared to patients in group 1 ( $p < 0.05$ ). In patients who received additional UDCA and L-arginine in 3 months of treatment, the total duration of ST-segment depression was 2 times lower and the duration of its maximum episode was 2.87 times ( $p < 0.05$ ).

The dynamics of indicators of heart rate variability in patients with coronary heart disease comorbid with NAFLD is given in *Table 3*.

After 3 months of treatment, patients with additional UDCA and L-arginine experienced an increase in SDNNi in both active (18 %) and passive (20 %) periods ( $p < 0.05$ ). There was a decrease in the LF/HF ratio by 24 % in the active and 27 % in the passive period ( $p < 0.05$ ) due to a possible decrease in the contribution of the sympathetic component and an increase in the activity of the parasympathetic component.

Patients receiving only baseline therapy observed a significant increase only in the HF index of active period (by 17 %). Patients in the 2<sup>nd</sup> group compared with patients in group 1 after 3 months of treatment had higher SDNNi values in the active period by 10 % and in the passive period by 12 %; HF in the active period by 20 % ( $p < 0.05$ ). Also, the LF/HF ratio was lower by 16 % in the daytime and by 39 % in the night period ( $p < 0.05$ ).

The obtained data coincide with the results of other researchers [12–14]. The study of M. Kielar et al. (2004) shows that the regular use of L-arginine improves the general state of patients with coronary heart disease, reduces the frequency of angina attacks, decreases the dose of nitrates, and increases the tolerance to physical activity [15]. In the work of O.V. Kraydashenko et al. (2012) data are obtained on the reduction of duration and severity of episodes of myocardial ischemia, correlated

with the restoration of the functional state of the vascular endothelium, in patients receiving L-arginine in the integrated therapy of coronary artery disease [16]. M.A. Tereshchinskaya (2012) noted that for now there is evidence that the pathway L-arginine-NO-cGMP plays an important neuro-modulating role in the functioning of the autonomic nervous system – increases the vagal effect and inhibits its sympathetic component [17].

A. Ya. Bazilevich et al. (2011) showed that the use of ursodeoxycholic acid in patients with coronary heart disease and post-infarction atherosclerosis in combination with nonalcoholic fatty liver disease leads to a significant improvement in the left ventricular myocardial function and improvement of remodeling of the left heart and central hemodynamics during the year of treatment [14]. In an experimental study by M. Miragoli et al. (2011), the cardioprotective role of UDCA and its anti-arrhythmogenic effect was studied. The researchers found that UDCA protects against ICP-induced arrhythmias (arrhythmias due to intrahepatic cholestasis of pregnancy), directly by hyperpolarization of myofibroblasts [18].

Thus, the positive effects of adding UDCA and L-arginine to baseline therapy in patients with coronary artery disease and NAFLD include improved diastolic function, decreased myocardial ischemia, decreased myocardial stiffness and the number of ventricular and supraventricular extrasystoles, as well as increased total VPS, normalization of the sympathetic-parasympathetic balance by increasing the parasympathetic component of the cardiovascular system.

## Conclusions:

1. The addition of ursodeoxycholic acid and L-arginine to basic therapy in patients with coronary heart disease comorbid with the nonalcoholic fatty liver disease is accompanied by a decrease in the left ventricular myocardium stiffness index and an improvement in the diastolic function.

2. Under the influence of basic therapy with the addition of ursodeoxycholic acid and L-arginine in patients with ischemic heart disease and non-alcoholic fatty liver disease, there is a decrease in the severity of manifestations of myocardial ischemia and the number of ventricular and supraventricular extrasystoles against the normalization of the sympathetic and parasympathetic balance of the autonomic nervous system.

**Prospects for further research:** to study the effects of combined therapy of UDCA and L-arginine on the state of endothelial dysfunction and vascular remodeling in patients with coronary artery disease and NAFLD.

## References

- [1] Kovalenko, V. M., & Kornatskiy, V. M. (2016). *Problemy zdorovia i medychnoi dopomohy ta model pokrashchennia v suchasnykh umovakh [Problems of health and medical care and the model of improvement in modern conditions]*. Kyiv. [in Ukrainian].
- [2] Babak, O. Ya., Kolesnikova, Ye. V., Shut, I. V., Kurinnaya, Ye. G., & Sytnic, K. A. (2013). Vliyanie geneticheskogo polimorfizma na formirovanie nealkogol'noj zhirovoy bolezni pečeni [Effect of genetic polymorphism on the formation of non-alcoholic fatty liver disease]. *Hastroenterolohiia*, 1(47), 54–59. [in Russian].
- [3] Kolesnikova, O. V. (2014). Sovremennyy paciyent s zabolevaniem i patologiej serdechno-sosudistoj sistemy: kakoj vybor sdelat'? [The modern

**Table 3.** Dynamics of cardiac rhythm variability in patients with coronary heart disease comorbid with NAFLD, against the background of baseline therapy with the addition of UDCA and L-arginine

Index, Unit (of measurement)	The 1 <sup>st</sup> subgroup Basic therapy (n = 30)		The 2 <sup>nd</sup> subgroup Basic therapy with the addition of UDCA and L-arginine (n = 26)	
	Before treatment	In 3 months	Before treatment	In 3 months
<b>Active period</b>				
mRR, ms	839 (751; 967)	947 (837; 966)	810 (752; 878)	834 (775; 966)
SDNNi, ms	47.15 (39.05; 69.45)	46.30 (36.90; 57.90)	41.40 (32.95; 43.40)	50.60 (44.30; 58.90)*#
RMSSD, ms	26.5 (18; 44)	20 (17; 21)	16.0 (12; 20.5)	26 (19; 28)
pNN50, %	2.6 (1.4; 3.75)	2.1 (1.7; 4.5)	1.0 (0.15; 1.65)	1.65 (1.1; 2.85)
TP, ms <sup>2</sup>	3114.5 (2361; 4781)	2111 (1337; 3308)	1697 (1255; 1863)	2544 (1931; 3367)
ULF, ms <sup>2</sup>	799 (624.5; 1155)	781 (499; 905)	606 (331; 763)	793 (613; 1023)
VLF, ms <sup>2</sup>	1362 (1121.5; 1937.5)	947 (598; 1483)	701 (414.5; 829.5)	1149 (900; 1714)
LF, ms <sup>2</sup>	335 (216; 440)	360 (226; 436)	231 (155; 344)	344 (294; 761)
LFn, %	74.9 (56.45; 82.2)	73.8 (67.8; 79.7)	75.4 (65; 84.5)	72.6 (62.7; 80.4)
HF, ms <sup>2</sup>	105 (90.5; 197)	123 (90; 139)*	79.0 (36.5; 121.5)	147.0 (92; 304)*#
HFn, %	25.1 (17.8; 43.55)	26.2 (20.3; 32.2)	24.6 (15.45; 35)	20.1 (15.6; 35.3)
LF/HF	3.0 (1.3; 4.7)	2.8 (2.1; 3.9)	3.1 (1.9; 5.5)	2.3 (1.7; 4.1)*#
<b>Passive period</b>				
mRR, ms	991.5 (937; 1002)	1070 (1010; 1137)	932.0 (865.5; 1053.5)	915.0 (951; 1116)
SDNNi, ms	43 (41.85; 50)	46.5 (42.2; 45)	42.000 (29.5; 52.4)	52.400 (50; 70)*#
RMSSD, ms	28.5 (24; 59.5)	24 (22; 32)	22.0 (18; 28.5)	24.0 (16; 27)
pNN50, %	3.65 (3.2; 12.45)	3.3 (3; 12.9)	3.7 (1.5; 4.6)	4.25 (1.8; 6.3)
TP, ms <sup>2</sup>	2322 (1649.5; 3884.5)	2672 (1999; 3467)	1726 (831; 2589)	1757 (1055; 3425)
ULF, ms <sup>2</sup>	447 (330; 628)	310 (301; 496)	308 (191.5; 369.5)	340 (189; 595)
VLF, ms <sup>2</sup>	623 (338; 747)	877 (522; 960)	850 (433.5; 1177)	993 (401; 1156)
LF, ms <sup>2</sup>	610 (413.5; 892)	668 (319; 823)	401 (160.5; 649.5)	426 (310; 733)
LFn, %	62.9 (52.1; 78.15)	78.8 (69.5; 80.7)	69.4 (57.35; 80.45)	62.1 (54.4; 72.8)
HF, ms <sup>2</sup>	244.5 (177; 357.5)	216 (130; 362)	140 (75; 240)	148 (91; 320)
HFn, %	22.65 (15.7; 32.5)	21.2 (19.3; 30.5)	28.2 (19.55; 42.65)	26.1 (20.2; 45.6)
LF/HF	3.5 (2.1; 5.4)	3.7 (2.3; 4.2)	3.1 (1.35; 4.25)	2.25 (1.2; 3.5)*#

\*: the probability of indicators difference compared to the initial level is statistically significant;

#: the probability of difference in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups in three months of treatment is statistically significant.

patient with liver disease and pathology of cardiovascular system: what choice to make?]. *Suchasna gastroenterolohiia*, 2(76), 85–94. [in Russian].

[4] Zaitzev, D. N., & Govorin, A. V. (2013). Vegetativnaya disfunkciya u bol'nykh khronicheskim prostatitom [Vegetative dysfunction in patients with chronic prostatitis]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 1(45), 80–83. [in Russian].

[5] Krahmalova, E. O., & Kozlov, A. P. (2010). Nealkogol'naya zhyrovaya bolezni pečeni i serdechno- sosudistaya patologiya. Sovremennyy vzglyad na problemu [Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular pathology. The modern view on the problem]. *Ukrainskiy terapevtichnyi zhurnal*, 4, 82–85. [in Russian].

- [6] Mykhailovska, N. S., & Miniaienko, L. E. (2016). Osoblyvosti remodeliuvannya miokarda u khvorykh na ishemichnu khvorobu sertsia, komorbidnu z nealkoholnoiu zhyrovoiu khvoroboiu pechinky [Myocardial remodeling features in patients with coronary heart disease comorbid with nonalcoholic fatty liver disease]. *ScienceRise: MedicalScience*, 2(3(19)), 9–14. [in Ukrainian]. doi: 10.15587/2313-8416.2016.60797.
- [7] Vejn, A. M. (2003). *Vegetativnye rasstrojstva. Klinika, diagnostika, lechenie [Autonomic dysfunction. Clinic, diagnosis, treatment]*. Moscow: MIA. [in Russian].
- [8] Radchenko, O. M. (2012). Nealkoholna zhyrova khvoroba pechinky: problemy likuvannya [Non-alcoholic fatty liver disease: treatment problems]. *Racional'naya farmakoterapiya*, 3, 9–13. [in Ukrainian].
- [9] Lee, C., Li, D., Channon, K., & Paterson, D. (2009). L-arginine supplementation reduces cardiac noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(1), 149–155. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.023.
- [10] Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J., Cottin, Y., Vergely, C., & Rochette, L. (2014). Arginine and nitric oxide synthase: Regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(1), 101–116. doi: 10.1002/mnfr.201300033.
- [11] Khara, M. R., & Golovach, N. A. (2013). Vplyv L-argininu na biokhimichni protsesy v miokardi shchuriv riznoi staty pry streptozototsynovomu tsukrovomu diabeti [Effect of L-arginine on biochemical processes in the myocardium of rats of different gender in streptozotocin-induced diabetes mellitus]. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiia*, 1(43), 161–165. [in Ukrainian].
- [12] Mykhailovska, N. S., & Kulynych, T. O. (2017). Vplyv ekzogenoho L-argininu na stan kardiohemodynamiky ta variabelnist sertsievoho rytmu u khvorykh na ishemichnu khvorobu sertsia pislia perenesenoj nehospitalnoi pnevmonii [Influence of exogenous L-arginine on the state of cardiodynamics and heart rate variability in patients with coronary heart disease after postpartum pneumonia]. *ScienceRise: MedicalScience*, 3(11), 27–34. [in Ukrainian]. doi: 10.15587/2519-4798.2017.97083.
- [13] Smuglov, Ye. P., Kuznecov, N. S., Shadchneva, N. A., & Sakhaltuev, A. D. (2015). Klinicheskie aspekty ispol'zovaniya L-arginina v kompleksnoj terapii stabil'noj IBS [Clinical aspects of the use of L-arginine in the integrated therapy of stable coronary heart disease]. *Krymskij zhurnal eksperimental'noj i klinicheskoy medicyny*, 5, 2(18), 60–64. [in Russian].
- [14] Bazylevych, A. Ya., & Potashev, S. V. (2011). Vplyv ursodeoxykholovoi kysloty na stan tsentralnoi hemodynamiky, miokardialnoi funktsii ta remodeliuvannya livoho shlunochka u khvorykh iz postinfarktym kardiosklerozom kombinovanim iz nealkoholnoiu zhyrovoiu khvoroboiu pechinky [Effect of ursodeoxycholic acid on the state of central hemodynamics, myocardial function and remodeling of the left ventricle in patients with postinfarction cardiosclerosis combined with nonalcoholic fatty liver disease]. *Klinichna farmatsiia, farmakoterapiia ta medychna standartyzatsiia*, 1–2, 47–56. [in Ukrainian].
- [15] Kielar, M., Myrcha, P., & Pleban, E. (2004). New possibilities in treatment of atherosclerosis—increase of nitric oxide synthesis by L-arginine supplementation. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 17(102), 656–660.
- [16] Kraidashenko, O. V., & Shalmina, M. A. (2012). E'ndotelij oposredovannyj antiishemicheskij e'ffekt tivortina v bol'nykh s ishemicheskoy bolezn'yu serdca pozhilogo i starcheskogo vozrasta [Endothelium derived antiischemic effect of tyvortin in elderly patients with ischemic heart disease]. *Visnyk problem biologii i medytsyny*, 2(2), 105–109. [in Russian].
- [17] Treschinskaya, M. A. (2012). Antie'jdzhingovyj e'ffekt L-arginina [Anti-aging Effect of L-arginine]. *Medicina neotlozhnyh sostoyanij*, 3(42), 50–54. [in Russian].
- [18] Miragoli, M., Kadir, S., Sheppard, M., Salvarani, N., Virta, M., Wells, S., et al. (2011). A protective antiarrhythmic role of ursodeoxycholic acid in an in vitro rat model of the cholestatic fetal heart. *Hepatology*, 54(4), 1282–1292. doi: 10.1002/hep.24492.

**Information about authors:**

Mykhailovska N. S., MD, PhD, DSc, Professor,  
Head of the Department of General Practice – Family Medicine,  
Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Miniaienko L. Ye., PhD Student at the Department of General  
Practice – Family Medicine, Zaporizhzhia State Medical University,  
Ukraine.

**Відомості про авторів:**

Михайловська Н. С., д-р мед. наук, професор, зав. каф. загальної  
практики – сімейної медицини, Запорізький державний  
медичний університет, Україна.  
Міняйленко Л. Є., аспірант каф. загальної практики – сімейної  
медицини, Запорізький державний медичний університет,  
Україна.

**Сведения об авторах:**

Михайловская Н. С., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. общей  
практики – семейной медицины, Запорожский государственный  
медицинский университет, Украина.  
Миняйленко Л. Е., аспирант каф. общей практики – семейной  
медицины, Запорожский государственный медицинский  
университет, Украина.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 05.06.2017

Після доопрацювання / Revised: 07.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 12.06.2017

# Effect of experimental gestational diabetes and administration of glibenclamide on mRNA level of NLRP3-inflammasome and distribution of NLRP3<sup>+</sup>-cells in mesenteric lymph nodes in progeny

T. M. Prozorova, V. A. Kamyshna, O. M. Kamyshnyi

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

A number of dysfunctions of congenital and adaptive components of the immune system are observed in progeny of rats with experimental gestational diabetes (EGD). The key link in pathogenesis of EGD and other diseases is the activation of NLRP3-inflammasome. Therefore, it is an attractive target for pharmaceutical effects. Among the numerous inhibitors of the inflammasome, glibenclamide is the most promising drug, which can effectively correct hyperglycemia in pregnant women.

**The aim** of the study was to determine the level of mRNA expression of NLRP3-inflammasome and the distribution of NLRP3<sup>+</sup>-cells in mesenteric lymph nodes in progeny of rats with experimental gestational diabetes and after administration of glibenclamide to pregnant Wistar rats.

**Materials and methods.** A molecular-genetic study was carried out using polymerase chain reaction with real-time reverse transcription (RT-PCR) of mRNA expression level of the *Nlrp3* gene. The distribution of NLRP3<sup>+</sup>-cells in MLN of experimental animals was investigated by immunofluorescence and immunohistochemical methods.

**Results.** The development of EGD is accompanied by transcriptional induction of the *Nlrp3* gene in MLN in descendants, whose mRNA level increased five-fold ( $p < 0.05$ ) in 1-month and 3-fold ( $p < 0.05$ ) in 6-month-old animals. The administration of glibenclamide to pregnant rats inhibited the transcription of the *Nlrp3* gene only at the age of 1 month (5.3 times,  $p < 0.05$ ) and did not change it in the older age group. In the progeny of rats with EGD, the density of the NLRP3<sup>+</sup>-lymphocyte population in the MLN increased, more clearly at early observation times. The intake of glibenclamide reduced the number of NLRP3<sup>+</sup>-lymphocytes only at the age of 1 month (by 33 %, the cortex plateau), whereas their number in the medullary cords of 6-month-old progeny even increased.

**Conclusion.** The increased mRNA expression of NLRP3-inflammasome and density of NLRP3<sup>+</sup>-cells in MLN in descendants of rats with EGD indicates activation of pro-inflammatory signaling. Glibenclamide, as an inhibitor of the activation of the NLRP3-inflammasome, demonstrated its effectiveness only at early observation times.

## Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламіду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків

T. M. Prozorova, V. A. Kamiшна, O. M. Kamiшний

У нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД) спостерігається ціла низка порушень функціонування вроджених й адаптивних компонентів імунної системи. При ЕГД важливою ланкою патогенезу є активація NLRP3-інфламасоми. Саме тому вона – привабливий об'єкт для фармацевтичного впливу. Серед інгібіторів інфламасоми перспективним є глібенкламід, який до того ж може ефективно коригувати гіперглікемію у вагітних.

**Мета роботи** – з'ясувати рівень експресії мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів у брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і після введення глібенкламіду вагітним щурам лінії Вістар.

**Матеріали та методи.** Здійснили молекулярно-генетичне дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) рівня експресії мРНК гена *Nlrp3*, імунофлуоресцентне та імуногістохімічне дослідження розподілу NLRP3<sup>+</sup>-клітин у БЛВ у експериментальних тварин.

**Результати.** Розвиток ЕГД супроводжується транскрипційною індукцією гена *Nlrp3* в БЛВ у нащадків, рівень мРНК котрого зростав у 5 разів ( $p < 0,05$ ) в 1-місячних і в 3 рази – ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних тварин. Введення глібенкламіду під час вагітності інгібує транскрипцію гена *Nlrp3* тільки у віці 1 місяць (у 5,3 рази,  $p < 0,05$ ) і не змінюється у старшій віковій групі. У нащадків щурів з ЕГД зростає щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів у БЛВ, виразніше – на ранніх термінах спостереження. Приймання глібенкламіду знижує кількість NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів тільки у віці 1 місяць (на 33 %, коркове плато), тоді як у 6-місячних нащадків їхня чисельність у м'якотних тяжках навіть зростає.

**Висновки.** Підвищення рівня експресії мРНК NLRP3-інфламасоми та щільності NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів у БЛВ у нащадків щурів з ЕГД свідчить про активацію прозапальної сигналізації. Глібенкламід як інгібітор активації NLRP3 продемонстрував свою ефективність лише на ранніх термінах спостереження.

### Key words:

EGD, MLN, NLRP3-inflammasome, glibenclamide.

### Pathologia

2017; 14 (2), 149–155

### DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109269

### E-mail:

alexkamyshnyi@gmail.com

### Ключові слова:

ЕГД, БЛВ, NLRP3-інфламасома, глібенкламід.

### Патологія. – 2017. –

Т. 14, № 2(40). – С. 149–155

**Ключевые слова:**

ЭГД, БЛУ,  
NLRP3-  
инфламмоса,  
глибенкламид.

**Патология.** – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 149–155

## **Влияние экспериментального гестационного диабета и введения глибенкламида на уровень мРНК NLRP3-инфламмосы и распределение NLRP3<sup>+</sup>-клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства**

**Т. М. Прозорова, В. А. Камышная, А. М. Камышный**

У потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) наблюдается целый ряд нарушений функционирования врождённых и адаптивных компонентов иммунной системы. При ЭГД важным звеном патогенеза является активация NLRP3-инфламмосы. Именно поэтому она является привлекательным объектом для фармацевтического воздействия. Среди ингибиторов инфламмосы перспективным является глибенкламид, который к тому же может эффективно корректировать гипергликемию у беременных.

**Цель работы** – выявить уровень экспрессии мРНК NLRP3-инфламмосы и распределение NLRP3<sup>+</sup>-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом и после введения глибенкламида беременным крысам линии Вистар.

**Материалы и методы.** Осуществлено молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) уровня экспрессии мРНК гена *Nlrp3*, иммунофлуоресцентное и иммуногистохимическое исследование распределения NLRP3<sup>+</sup>-клеток в БЛУ у экспериментальных животных.

**Результаты.** Развитие ЭГД сопровождается транскрипционной индукцией гена *Nlrp3* в БЛУ у потомков, уровень мРНК которого увеличился в 5 раз ( $p < 0,05$ ) у 1-месячных и в 3 раза – ( $p < 0,05$ ) у 6-месячных животных. Введение глибенкламида при беременности ингибирует транскрипцию гена *Nlrp3* только в возрасте 1 месяц (в 5,3 раза,  $p < 0,05$ ) и не меняется в старшей возрастной группе. У потомков крыс с ЭГД возрастает плотность популяции NLRP3<sup>+</sup>-лимфоцитов в БЛУ, более выражено – на ранних сроках наблюдения. Приём глибенкламида снижает количество NLRP3<sup>+</sup>-лимфоцитов только в возрасте 1 месяц (на 33 %, корковое плато), тогда как у 6-месячных потомков их численность в мягкотных тяхах даже возрастает.

**Выводы.** Повышение уровня экспрессии мРНК NLRP3-инфламмосы и плотности NLRP3<sup>+</sup>-лимфоцитов в БЛУ у потомков крыс с ЭГД свидетельствует об активации провоспалительной сигнализации. Глибенкламид как ингибитор активации NLRP3 продемонстрировал свою эффективность только на ранних сроках наблюдения.

Our findings show that progeny of experimental gestational diabetes mellitus (EGD) rats have such immune violations of immunological tolerance as AIRE gene repression, reduced mRNA levels of *Deaf1*, transcription factor *Foxp3*, the latter being confirmed by decrease in Treg cells [1] and inhibition of gene expression suppressor cytokine IL-10 and negative costimulatory molecules *Ctla4* [2]. However, gestational diabetes (GD) increases the genes expression of immune response in pregnant [3] and leads to violations of innate and adaptive components of immune system in progeny. Thus, Li Q. et al. (2016) showed that gestational diabetes mellitus increased interleukin-1 $\beta$  in progeny spleen cells [4]. This indicates activation of NLRP3-inflammasome – protein that belongs to the family of nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors, NLRs [5]. Activation of NLRP3-inflammasome in GD showed in other experiments [6], and the extensive involvement of the NLRP3-inflammasome in such a range of diseases makes it a highly desirable drug target. Recently, numerous promising inhibitors of NLRP3-inflammasome activation have been described [7–9], but we turned our attention to glibenclamide, which along with metformin and insulin can effectively correct hyperglycemia for pregnant women. Glibenclamide was the first oral hypoglycemic drug prospectively tested and used to manage GD [10]. A lot of meta-analysis showed that adequate glycemic control could be achieved with glibenclamide in many women with GD, and this treatment reduced hyperglycemia-associated outcomes [11,12]. But the most interesting was the ability of glibenclamide to inhibit the formation of NLRP3-inflammasome that was first detected in 2009 [13]. These results were later confirmed by other studies [14,15]. Therefore, the aim of the work was to study the expression level of mRNA

NLRP3-inflammasome and distribution of NLRP3<sup>+</sup>-cells in mesenteric lymph nodes in progeny of rats with experimental gestational diabetes and after glibenclamide administration to pregnant.

### **Materials and methods**

The studied animals were divided into 6 experimental groups, each group contains 12 rats. Descendants of intact Wistar rats (males) were 1 month of age (group 1) and 6 months of age (group 2). Their mothers were administered 0.5 ml 0.1 M citrate buffer (pH = 4.5) on the 15<sup>th</sup> day of pregnancy once intraperitoneally. In descendants of Wistar rats (males) with experimental gestational diabetes (EGD) of 1 month of age (group 3) and 6 months (group 4), mothers were administered 45 mg/kg of streptozotocin once intraperitoneally on the 15<sup>th</sup> day of pregnancy. In descendants of rats with EGD of 1 month of age (group 5) and 6 month of age (group 6), mothers were administered 45 mg/kg of streptozotocin once intraperitoneally on the 15<sup>th</sup> day of pregnancy with simultaneous administration of oral intragastric Glibenclamide (Farmak, Ukraine) at a dose of 5 mg/kg for 7 days.

The objects for molecular genetic studies with using of the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were MLN of experimental animals. They were placed in the Bouin's fluid, dehydrated with graded concentrations of ethanol and embedded in paraffin. Molecular genetic studies were performed on archival material of 2 years old. RNA was extracted from histology sections of 15  $\mu$ m thick. They were dewaxed in xylene and rehydrated with descending concentrations of ethanol (100 %, 96 %, 70 %). Total RNA was procured from sam-

ples by use of “NucleoZOL” (Macherey-Nagel, Germany). For reverse transcription and obtaining cDNA, we used RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, USA). Reverse transcription was conducted at 42 °C for 60 min then at 70 °C for 5 min. To determine the level of mRNA *Nlrp3* (NM\_001191642.1), we used thermocycler CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, USA) and set of reagents Luminaris HiGreen Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific, USA). The final reaction mixture for amplification includes 10 µl MasterMix (2X), 0.6 µl of direct and reverse specific primers, 1 µl cDNA. The reaction mixture was brought to total volume of 20 µl by adding deionized H<sub>2</sub>O. Specific primer pairs (5′–3′) for analysis of target and reference genes were selected by the software PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) and produced by Metabion (Germany) (Table 1). After initial denaturation at 95 °C for 10 min amplification consisted of 45 cycles and was conducted under the following conditions: denaturation – 95 °C for 15 sec, annealing at 59–61 °C for 30–60 sec, elongation at 72 °C for 30 sec. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene was used as a reference gene to determine the relative value of changes in the expression level of target genes. Normalized relative quantity of cDNA target genes was determined by the method  $\Delta\Delta Ct$ . Statistical data analysis of PCR were conducted using available software CFX Manager™ (Bio-Rad, USA).

Structure of *Nlrp3*<sup>+</sup>-cells population was studied using analysis of serial histological sections of MLN and their morphometric and densitometric characteristics. For this study, serial sections of 5 µm thick were made on a rotary microtome MICROM HR-360 (Microm, Germany), then they were dewaxed in xylene and rehydrated with descending concentrations of ethanol (100 %, 96 %, 70 %), washed with 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) and colored with *Nlrp3* rabbit polyclonal antibodies (Cryopyrin, H-66) (Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-66846) for 18 hours in a humid chamber at T = 4 °C. After washing with 0.1 M phosphate buffer, sections were incubated for 60 min at T = 37 °C with secondary antibody solution to whole molecule of rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA), conjugated with FITC. After incubation, all sections were washed with 0.1 M phosphate buffer and placed in a mixture of glycerol phosphate buffer (1:9) for subsequent fluorescent microscopy. Prepared histological sections were studied using a computer program Image J (NIH, USA), and the morphometric and densitometric characteristics of immunopositive cells were measured. We determined the absolute (number of cells per 1 mm<sup>2</sup>) and relative (%) density of different subsets of *Nlrp3*<sup>+</sup>-lymphocytes in cortex and medullary cords of MLN. For additional visualization of *Nlrp3*<sup>+</sup>-cells, we also performed an immunohistochemical reaction with secondary rabbit antibodies ImmunoCruz™ Staining system (Santa Cruz Biotechnology, USA), conjugated to horseradish peroxidase.

## Results and discussion

Investigation of *Nlrp3* gene expression in MLN showed that in the progeny of EGD rats there was a significant five-fold growth of mRNA of this protein in the 1-month-old rat ( $p < 0.05$ ), and threefold growth ( $p < 0.05$ ) in the 6-month-

**Table 1.** Specific primer pairs for RT-PCR

Gene	Primer	T <sub>m</sub> , °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>Nlrp3</i>	F = AGCTAAGAAGGACCAGCCAG	59	40	713/
	R = CGTGCATGCATCATTCCACTC	60		714
GAPDH	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG	61	52	825/
	R = GCCTGCTTACCACCTTCT	60		826

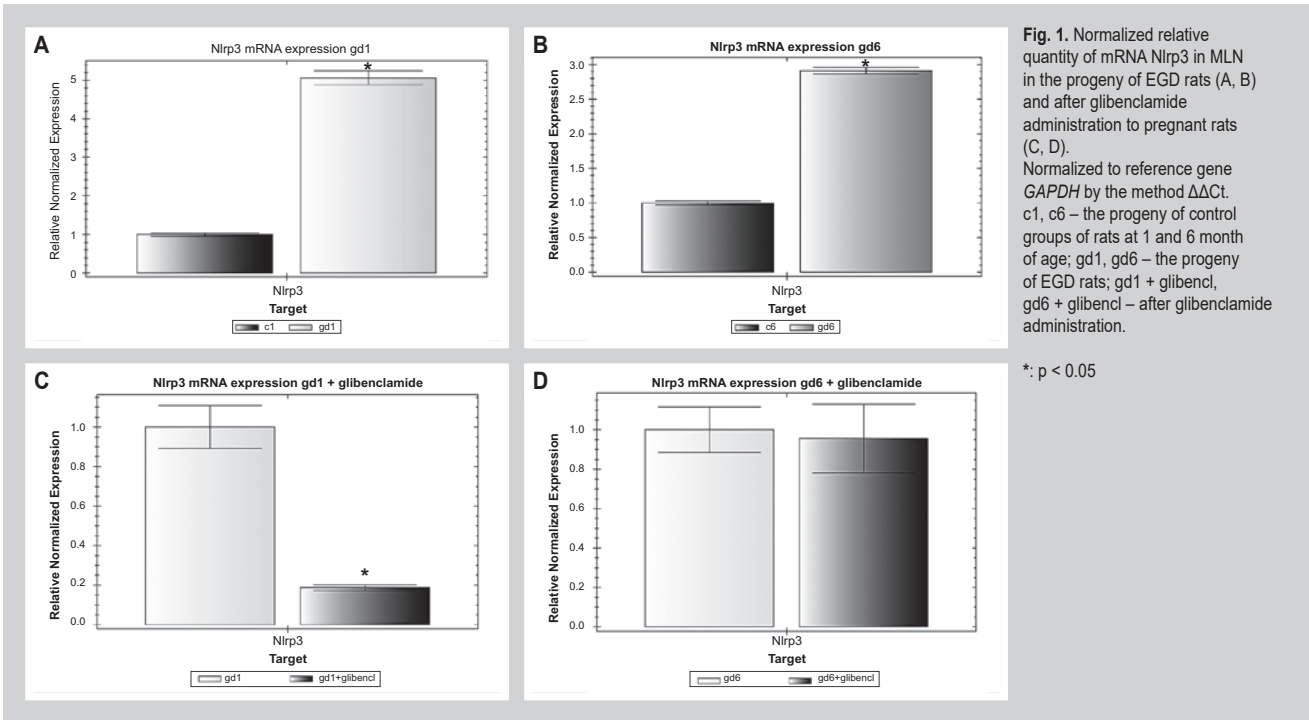
old animals compared with control groups (Fig. 1A, B). The study of rats whose mothers were treated during pregnancy with glibenclamide showed that the animals aged 1 month had a significant 5.3 times decrease of *Nlrp3* gene expression ( $p < 0.05$ ), but these changes were not detected in the older age group (Fig. 1C, D).

Studying the distribution of specific subpopulations of *Nlrp3*<sup>+</sup>-cells gave the following results. Total density of immunopositive cells in MLN cortical plateau of 1-month-old EGD rats increased by 49 % compared with control group ( $p < 0.05$ ). In the next age group comparative analysis revealed no significant changes. Total number of *Nlrp3*<sup>+</sup>-cells in MLN medullary cords of 1-month-old EGD rats was significantly increased by 44 % ( $p < 0.05$ ) in comparison with control group. The study of materials taken from the 6-month-old animal showed an increase in the total density by 69 % ( $p < 0.05$ ) (Fig 2A, B, Fig. 3A–D).

Analysis of MLN sections in EGD progeny of rats treated with glibenclamide during pregnancy gave the following results. In cortical plateau of MLN at 1 month of age we obtained reducing of the total number of *Nlrp3*<sup>+</sup>-cells by 33 % ( $p < 0.05$ ) in comparison with EGD1. At 6 months of age there were no significant changes in the number of immunopositive cells. As for medullary cords of mesenteric lymph nodes, total density of *Nlrp3*<sup>+</sup>-cells remained unchanged at 1 months of age. And at the age of 6 months, it increased by 29 % ( $p < 0.05$ ) (Fig 2A, B).

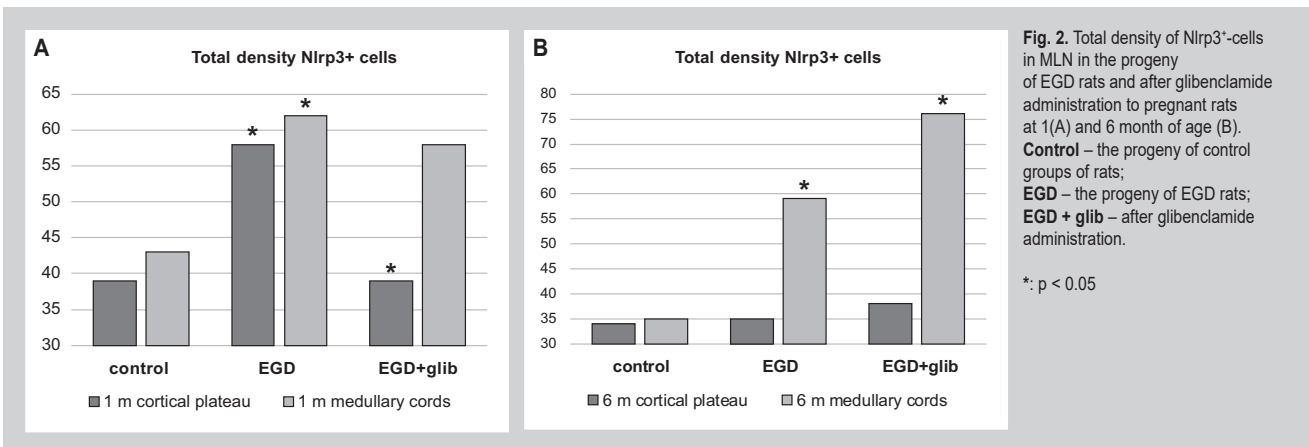
There are three main models that describe the mechanism of NLRP3-inflammasome activation. They were shown by K. Schroder et al. (2010) [16]. In the first model, extracellular adenosine triphosphate (ATP) is regarded as initiator of NLRP3 inflammasome activation and assembly with K<sup>+</sup> efflux through a purinergic P2X7-dependent pore. The second model, special activators trigger the generation of reactive oxygen species (ROS), which in turn induce assembly of the NLRP3 inflammasome [17]. In the last model, these processes are triggered by some external irritants such as silica or alum, which are taken over by phagocytes. These aggregates induce lysosomal rupture and release of lysosomal contents via a mechanism mediated by cathepsin B [18]. Other factors can also activate the NLRP3 inflammasome such as mitochondrial damage or dysfunction caused by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload, autophagic dysfunction and the activity of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) [19].

The inflammasomes and the complement system are traditionally viewed as quintessential components of innate immunity required for the detection and elimination of pathogens. But a direct role for NLRP3 in human adaptive immune cells has not been described yet. In recent years, evidence suggested that NLRP3 could be expressed by mouse and human lymphocytes [20] and has an ability to adjust the differentiation of Th1, Th2 Th17-cells. Recently, G. Arbore et al. (2016) have shown



**Fig. 1.** Normalized relative quantity of mRNA Nlrp3 in MLN in the progeny of EGD rats (A, B) and after glibenclamide administration to pregnant rats (C, D). Normalized to reference gene *GAPDH* by the method  $\Delta\Delta Ct$ . c1, c6 – the progeny of control groups of rats at 1 and 6 month of age; gd1, gd6 – the progeny of EGD rats; gd1 + glibencl, gd6 + glibencl – after glibenclamide administration.

\*:  $p < 0.05$



**Fig. 2.** Total density of Nlrp3<sup>+</sup>-cells in MLN in the progeny of EGD rats and after glibenclamide administration to pregnant rats at 1 (A) and 6 month of age (B). **Control** – the progeny of control groups of rats; **EGD** – the progeny of EGD rats; **EGD + glib** – after glibenclamide administration.

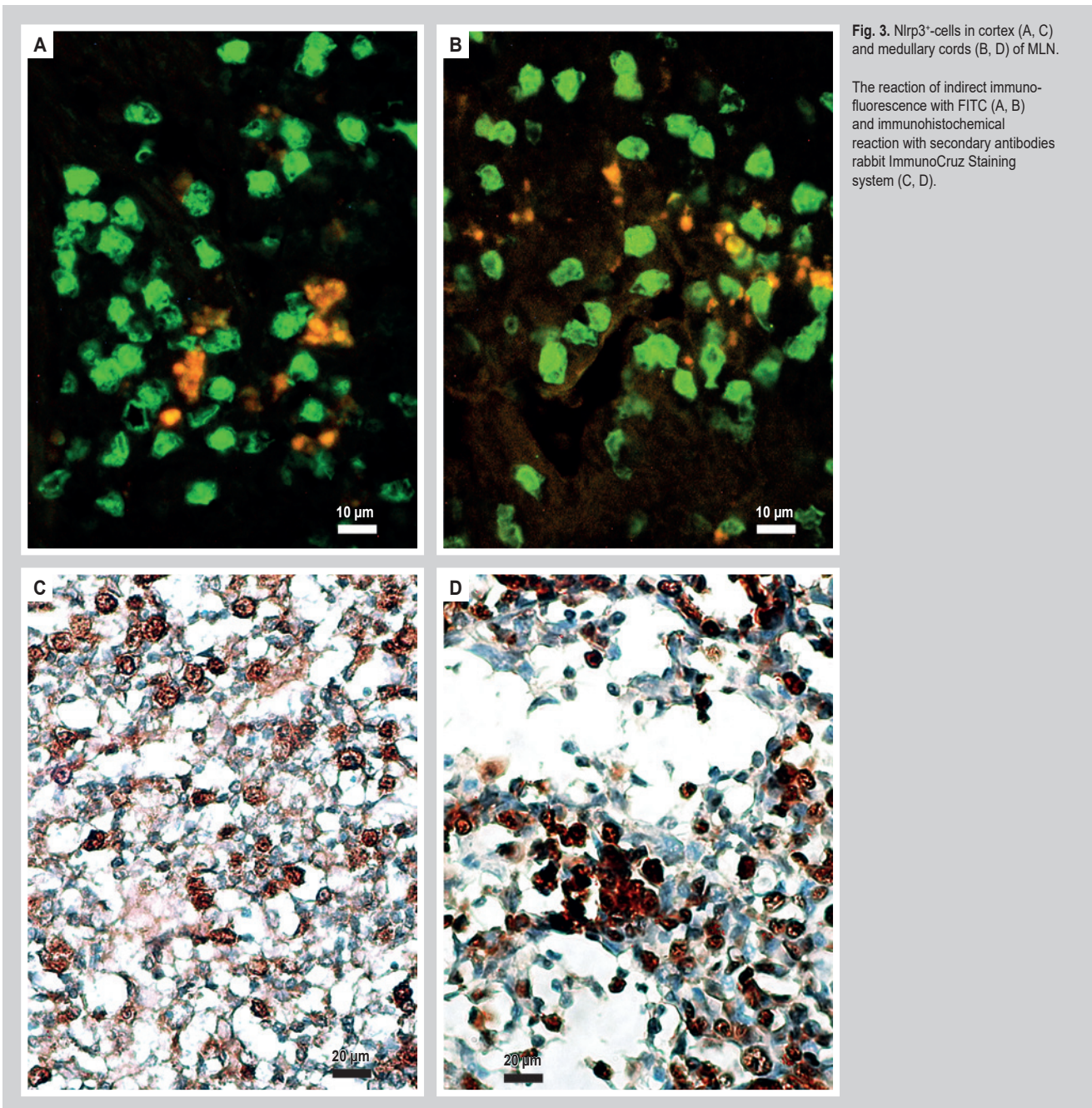
\*:  $p < 0.05$

that NLRP3 inflammasome assembles in human CD4<sup>+</sup> T cells and initiates caspase-1–dependent interleukin-1 $\beta$  secretion, thereby promoting interferon- $\gamma$  production and T helper 1 (TH1) differentiation in an autocrine fashion. [21]. Abnormal activity of NLRP3- inflammasome in T-cells affects the development of inflammatory and autoimmune diseases in humans and in mice experimental models. Obviously, NLRP3-inflammasome activity is not limited to «innate immune cells» and is an integral part of normal Th-adaptive responses. Violation of NLRP3 activity in CD4<sup>+</sup> T cells in experimental models of colitis causes uncontrolled infiltration of Th17 cells and aggravation of bowel disease. Thus, autocrine activity of NLRP3-inflammasomes in lymphocytes controls Th1-Th17 balance in terms of experimental inflammatory bowel disease. Furthermore, M. Bruchard et al. (2015) recently showed the ability of NLRP3 to act as a key transcription factor that controls the Th2-differentiation [22]. In Th2 cells NLRP3 binds to promoter IL4 and activates it in conjunction with transcription factor IRF4 [22]. In contrast to Th1,

where NLRP3 is detected mainly in the cytoplasm by methods of immunofluorescence microscopy, in the Th2-cells it is localized mainly in the nucleus. It is possible that such a nuclear localization function can promote inflammasome transcription. This work showed that NLRP3 should be seen not only as a key inflammasome component, but as a transcription factor in cells CD4<sup>+</sup> Th2. Finally, the mechanisms of IL-1 $\beta$ -induced Th17 differentiation are related to the ability of TGF- $\beta$  to induce expression ROR $\gamma$ t in naive T cells [23]. Studies *in vitro* have shown that IL-1 $\beta$  induces the expression of IRF-4, positively regulates IL-21-mediated expression of transcription factors STAT-3 and ROR $\gamma$ t [24]. In addition, the role of IL-1 in the induction of Th17 phenotype was attributed to alternative splicing of Foxp3 [25].

At the same time, NLRP3-inflammasome is one of the sensors of metabolic stress developing diabetes [26]. NLRP3-deficient NOD-mice are protected from developing diabetes by reducing migration of diabetogenic lymphocytes in the pancreatic islets, they have reduced





**Fig. 3.** Nlrp3<sup>+</sup>-cells in cortex (A, C) and medullary cords (B, D) of MLN.

The reaction of indirect immunofluorescence with FITC (A, B) and immunohistochemical reaction with secondary antibodies rabbit ImmunoCruz Staining system (C, D).

the number of CD4<sup>+</sup> T cells, CD19<sup>+</sup> B-cells and CD11b<sup>+</sup> APC in spleen and PLN, but not in the thymus [27]. The study has found two single-nucleotide polymorphism in NLRP3, associated with DM type 1 [28], and D. Carlos et al. (2017) showed growth of NLRP3 expression in PLN in NOD mice [29]. A similar increase of NLRP3 gene expression was observed in STZ-induced diabetes in mice C57BL/6. Furthermore, diabetic mice C57BL/6 also showed a decrease in IL-17-producing CD4 and CD8 T cells (Th17 and Tc17) and IFN $\gamma$ -producing CD4 and CD8 T cells (Th1 and Tc1) in PLN. Interestingly, diabetic mice showed an increase in the expression of genes associated with mitochondrial DNA, such as cytochrome b and cytochrome c. Mitochondrial DNA (mDNA) of diabetic mice induced production of IL-1 $\beta$  and activation of caspase-1 with macrophages, but was reduced in NLRP3<sup>-/-</sup>-mac-

rophages. Finally, the administration of mDNA *in vivo* increased the number prodiabetic Th17/Tc17/Th1 cells in the PLN, but it was also canceled in NLRP3<sup>-/-</sup>-mice [29].

NLRP3-inflammasome is an important pharmacological target for blocking a number of diabetes complications [30], and the ability of glibenclamide to inhibit the formation of NLRP3 can affect the risk of inflammatory and autoimmune diseases in the progeny of mothers with GD. Recent research by S. Lamprianou et al. (2016) demonstrated that glibenclamide protects NOD mice from progressing hyperglycemia and loss of insulin-producing  $\beta$ -cells. Although the administration of glibenclamide does not stop the development of insulinitis, but induces a shift of the phenotype of immune cells and protects cells of insulinoma MIN6 from apoptosis and loss of connexin Cx36 [31].

## Conclusions

1. The development of EGD is accompanied by transcriptional induction of the *Nlrp3* gene in MLN in descendants, whose mRNA level increased five-fold ( $p < 0.05$ ) in 1-month and 3-fold ( $p < 0.05$ ) in 6-month-old animals. The administration of glibenclamide to pregnant rats inhibited the transcription of the *Nlrp3* gene only at the age of 1 month (5.3 times,  $p < 0.05$ ) and did not change it in the older age group.

2. In the progeny of rats with EGD, the density of the NLRP3<sup>+</sup>-lymphocyte population in the MLN increased, more clearly at early observation times. The intake of glibenclamide reduced the number of NLRP3<sup>+</sup>-lymphocytes only at the age of 1 month (by 33 %, the cortex plateau), whereas their number in the medullary cords of 6-month-old progeny even increased.

## References

- Kamyshny, A. M., Prozorova, T. M., & Kamyshna, V. A. (2015). Vliyanie e'ksperimental'nogo gestacionnogo diabeta na uroven' e'kspressii mRNK AIRE i kharakter differencirovki FOXP3+ kletok v bryzhechnykh limfaticheskikh uzlakh [The influence of experimental gestational diabetes on expression of Aire mRNA and character of differentiation of Foxp3+ - cells in mesenteric lymph nodes in the offspring]. *Morfologiya*, 9(2), 29–35. [in Russian].
- Prozorova, T. M., & Kamyshny, O. M. (2016). Zminy rinvia ekspresii mRNK heniv AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 i IL10 v bryzhovyykh limfatichnykh vuzlakh u nashchadkiv shchuriv z eksperimentalnym hesitatsiynym diabetom i v umovakh formuvannya orolnoi tolerantnosti do insulinu [Changes of mRNA gene expression level of AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 and IL-10 in the offspring of rats with experimental gestational diabetes and in conditions of insulin oral tolerance formation]. *Problemy endokrynnoi patolohii*, 3, 50–59. [in Ukrainian].
- Wojcik, M., Zieleniak, A., Zurawska-Klis, M., Cypryk, K., & Wozniak, L. (2016). Increased expression of immune-related genes in leukocytes of patients with diagnosed gestational diabetes mellitus (GDM). *Experimental Biology And Medicine*, 241(5), 457–465. doi: 10.1177/1535370215615699.
- Li, Q., Pereira, T., Moyce, B., Mahood, T., Doucette, C., Rempel, J., & Dolinsky, V. (2016). In utero exposure to gestational diabetes mellitus conditions TLR4 and TLR2 activated IL-1beta responses in spleen cells from rat progeny. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis Of Disease*, 1862(11), 2137–2146. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.08.004.
- Jo, E., Kim, J., Shin, D., & Sasakawa, C. (2015). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular And Molecular Immunology*, 13(2), 148–159. doi: 10.1038/cmi.2015.95.
- Lappas, M. (2014). Activation of inflammasomes in adipose tissue of women with gestational diabetes. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 382(1), 74–83. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.011.
- Coll, R., Robertson, A., Chae, J., Higgins, S., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M. et al. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine*, 21(3), 248–255. doi: 10.1038/nm.3806.
- Netea, M., & Joosten, L. (2015). Inflammasome Inhibition: Putting Out the Fire. *Cell Metabolism*, 21(4), 513–514. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.012.
- Shao, B., Xu, Z., Han, B., Su, D., & Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers In Pharmacology*, 6, 262. doi: 10.3389/fphar.2015.00262.
- Berggren, E. K., & Boggess, K. A. (2013). Oral Agents for the Management of Gestational Diabetes. *Clinical Obstetrics And Gynecology*, 56(4), 827–836. doi: 10.1097/GRF.0b013e3182a8e0a5.
- Bimson, B., Rosenn, B., Morris, S., Sasso, E., Schwartz, R., & Brustman, L. (2016). Current trends in the diagnosis and management of gestational diabetes mellitus in the United States. *The Journal Of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1–6. doi: 10.1080/14767058.2016.1257603.
- Koren, R., Ashwal, E., Hod, M., & Toledano, Y. (2016). Insulin detemir versus glyburide in women with gestational diabetes mellitus. *Gynecological Endocrinology*, 32(11), 916–919. doi: 10.1080/09513590.2016.1209479.
- Lamkanfi, M., Mueller, J., Vitari, A., Misaghi, S., Fedorova, A., Deshayes, K. et al. (2009). Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *The Journal Of Cell Biology*, 187(1), 61–70. doi: 10.1083/jcb.200903124.
- Masters, S., Dunne, A., Subramanian, S., Hull, R., Tannahill, G., & Sharp, F. et al. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1β in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, 11(10), 897–904. doi: 10.1038/ni.1935.
- Hughes, F. M. Jr., Kennis, J. G., Youssef, M. N., Lowe, D. W., Shaner, B. E., & Purves, J. T. (2016). The NACHT, LRR and PYD Domains-Containing protein 3 (NLRP3) Inflammasome Mediates Inflammation and Voiding Dysfunction in a Lipopolysaccharide-Induced Rat Model of Cystitis. *Journal Of Clinical & Cellular Immunology*, 07(01). doi: 10.4172/2155-9899.1000396.
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
- Lawlor, K., & Vince, J. (2014). Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: Is there a role for mitochondria? *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), 1433–1440. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.08.014.
- Patel, M., Carroll, R., Galván-Peña, S., Mills, E., Olden, R., Triantafyllou, M. et al. (2017). Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends In Molecular Medicine*, 23(2), 165–180. doi: 10.1016/j.molmed.2016.12.007.
- Pellegrini, C., Antonioli, L., Lopez-Castejon, G., Blandizzi, C., & Fornai, M. (2017). Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Frontiers In Immunology*, 8, 36. doi: 10.3389/fimmu.2017.00036.
- Doitsh, G., Galloway, N., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K., Zepeda, O., et al. (2013). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 505(7484), 509–514. doi: 10.1038/nature12940.
- Arbore, G., West, E., Spolski, R., Robertson, A., Klos, A., Rheinhelmer, C., et al. (2016). T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4+ T cells. *Science*, 352(6292), aad1210. doi: 10.1126/science.aad1210.
- Bruchard, M., Rebé, C., Derangère, V., Togbé, D., Ryffel, B., Boidot, R., et al. (2015). The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of Th2 differentiation. *Nature Immunology*, 16(8), 859–70. doi: 10.1038/ni.3202.
- Kumar, P., & Subramaniam, G. (2015). Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes. *Cytokine*, 71(2), 366–376. doi: 10.1016/j.cyto.2014.10.010.
- Chung, Y., Chang, S., Martinez, G., Yang, X., Nurieva, R., Kang, H., et al. (2009). Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity*, 30(4), 576–587. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.007.
- Maier, R., Joly, A., Liu, S., Elias, S., Tegner, J., & Andersson, J. (2015). IL-1β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific Reports*, 5, 14674. doi: 10.1038/srep14674.
- Schroder, K., Zhou, R., & Tschopp, J. (2010). The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger? *Science*, 327(5963), 296–300. doi: 10.1126/science.1184003.
- Hu, C., Ding, H., Li, Y., Pearson, J., Zhang, X., Flavell, R., et al. (2015). NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(36), 11318–11323. doi: 10.1073/pnas.1513509112.
- Pontillo, A., Brandao, L., Guimaraes, R., Segat, L., Araujo, J., & Crovella, S. (2010). Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity*, 43(8), 583–589. doi: 10.3109/08916930903540432.
- Carlos, D., Costa, F., Pereira, C., Rocha, F., Yaochite, J., Oliveira, G., et al. (2017). Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome and Predisposes to Type 1 Diabetes in Murine Model. *Frontiers In Immunology*, 8, 164. doi: 10.3389/fimmu.2017.00164.
- Volpe, C., Anjos, P., & Nogueira-Machado, J. (2016). Inflammasome as a New Therapeutic Target for Diabetic Complications. *Recent Patents On Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 10(1), 56–62. doi: 10.2174/1872214810666160219163314.
- Lamprinou, S., Gysemans, C., Bou Saab, J., Pontes, H., Mathieu, C., & Meda, P. (2016). Glibenclamide Prevents Diabetes in NOD Mice. *PLoS One*, 11(12), e0168839. doi: 10.1371/journal.pone.0168839.

## Information about authors:

Prozorova T. M., MD, Assistant of the Department of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
 Kamyshna V. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
 Kamyshnyi O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

**Відомості про авторів:**

Прозорова Т. М., асистент каф. нормальної фізіології,  
Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Камишна В. А., канд. мед. наук, доцент каф. анатомії людини,  
оперативної хірургії та топографічної анатомії, Запорізький  
державний медичний університет, Україна.  
Камишний О. М., д-р мед. наук, професор,  
зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький  
державний медичний університет, Україна.

**Сведения об авторах:**

Прозорова Т. М., ассистент каф. нормальной физиологии,  
Запорожский государственный медицинский университет,  
Украина.  
Камышная В. А., канд. мед. наук, доцент каф. анатомии  
человека, оперативной хирургии и топографической анатомии,  
Запорожский государственный медицинский университет,  
Украина.  
Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор,  
зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии,  
Запорожский государственный медицинский университет,  
Украина.

---

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

---

Надійшло до редакції / Received: 25.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 06.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 08.06.2017

## Особенности экспрессии HIF-1 $\alpha$ и HIF-3 $\alpha$ в гипоталамусе у крыс линии Вистар под влиянием прерывистой гипобарической гипоксии

А. В. Абрамов, В. А. Шаменко

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

### Ключевые слова:

прерывистая гипоксия, гипоталамус, фактор, индуцибельный гипоксией.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 156–162

### DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109291

### E-mail:

abramov@zsmu.pp.ua

**Цель работы** – установить особенности экспрессии генов *hif-1 $\alpha$*  и *hif-3 $\alpha$* , накопления белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в нейронах паравентрикулярного (ПВЯ) и супраоптического (СОЯ) ядер гипоталамуса в условиях действия прерывистой гипоксии и в постгипоксический период.

**Материалы и методы.** Прерывистую гипоксию моделировали ежедневным 6-часовым пребыванием крыс на высоте 6000 м ( $pO_2 = 9,8\%$ ) в течение 15 дней, постгипоксический период составлял 10 дней. Распределение белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в гипоталамусе изучали с помощью иммунофлуоресцентного метода. Уровни экспрессии мРНК генов *hif-1 $\alpha$*  и *hif-3 $\alpha$*  в гипоталамусе определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.

**Результаты.** Установлено, что прерывистая гипоксия приводила к нарастанию в медиобазальном гипоталамусе уровня мРНК к HIF-1 $\alpha$  в 13 раз, а к HIF-3 $\alpha$  – в 8,6 раза. При этом в нейронах медиального мелкоклеточного (ммПВЯ) и задне-латерального крупноклеточного (злкПВЯ) субъядер ПВЯ наблюдалось увеличение площади иммунореактивности к HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , а также нарастание содержания белка HIF-1 $\alpha$  в 2,5 (ммПВЯ) и 3,4 (злкПВЯ) раза, а белка HIF-3 $\alpha$  – в 1,7 и 3,0 раза соответственно. В постгипоксический период уровни мРНК к HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в гипоталамусе снижались, но концентрация мРНК к HIF-1 $\alpha$  оставалась в 2,5 раза выше, чем в контроле. При этом содержание белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  сохранялось повышенным в мелкоклеточных нейронах ПВЯ и снижалось на 50–60 % в крупноклеточных нейронах ПВЯ. Реакция нейронов СОЯ на гипоксию характеризовалась снижением экспрессии белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , что проявлялось снижением площади иммунореактивности в нейронах с частичным восстановлением в постгипоксический период.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что прерывистая гипоксия приводит к усилению экспрессии генов семейства *hif*, повышению синтеза белков HIF в нейронах ПВЯ и сохранению данного эффекта в постгипоксический период.

### Ключові слова:

переривчаста гіпоксія, гіпоталамус, фактор, що індукується гіпоксією.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 156–162

## Особенности экспрессии HIF-1 $\alpha$ та HIF-3 $\alpha$ в гіпоталамусі щурів лінії Вистар за умов переривчастої гіпобаричної гіпоксії

А. В. Абрамов, В. О. Шаменко

**Мета роботи** – встановити особливості експресії генів *hif-1 $\alpha$*  та *hif-3 $\alpha$* , накопичення білків HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$  в нейронах паравентрикулярного (ПВЯ) та супраоптичного (СОЯ) ядер гіпоталамуса в умовах дії переривчастої гіпоксії та в постгіпоксичний період.

**Матеріали та методи.** Переривчасту гіпоксію моделювали щоденним 6-годинним перебуванням щурів на висоті 6000 м ( $pO_2 = 9,8\%$ ) протягом 15 днів, постгіпоксичний період становив 10 днів. Розподіл білків HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$  в гіпоталамусі досліджували імунофлуоресцентним методом. Рівень експресії мРНК генів *hif-1 $\alpha$*  та *hif-3 $\alpha$*  в гіпоталамусі визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі.

**Результати.** Встановили, що переривчаста гіпоксія призводила до зростання в медиобазальному гіпоталамусі рівня мРНК до HIF-1 $\alpha$  у 13 разів, а до HIF-3 $\alpha$  – у 8,6 раза. При цьому в нейронах медіального дрібноклітинного (ммПВЯ) та задньолатерального крупноклітинного (злкПВЯ) суб'ядер ПВЯ спостерігалось збільшення площі імунореактивності до HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ , а також зростання вмісту білка HIF-1 $\alpha$  у 2,5 (ммПВЯ) та 3,4 (злкПВЯ) раза, а білка HIF-3 $\alpha$  – в 1,7 і 3,0 раза відповідно. У постгіпоксичний період рівень мРНК до HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$  в гіпоталамусі знижувався, але концентрація мРНК до HIF-1 $\alpha$  залишалась у 2,5 раза вищою, ніж у контролі. При цьому вміст білків HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$  зберігався підвищеним у дрібноклітинних нейронах ПВЯ та знижувався на 50–60 % у крупноклітинних нейронах ПВЯ. Реакція нейронів СОЯ на гіпоксію характеризувалась зниженням експресії білків HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ , що проявлялось зниженням площі імунореактивності в нейронах із частковим відновленням у постгіпоксичний період. Результати свідчать, що переривчаста гіпоксія призводить до посилення експресії генів сімейства *hif*, підвищення синтезу білків HIF у нейронах ПВЯ та збереження цього ефекту в постгіпоксичний період.

### Key words:

hypoxia, hypothalamus, hypoxia-inducible factor.

### Pathologia

2017; 14 (2), 156–162

## Peculiarities of expression of HIF-1A and HIF-3A in hypothalamus of Wistar rats under the influence of intermittent hypobaric hypoxia

A.V. Abramov, V.A. Shamenko

**The purpose** of this study was to establish the features of the expression of *hif-1 $\alpha$*  and *hif-3 $\alpha$*  genes and the accumulation of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  proteins in the paraventricular (PVH) and supraoptic (SO) nuclei of the hypothalamus under the conditions of intermittent hypoxia and in post-hypoxic periods.

**Materials and methods.** Intermittent hypoxia was modeled by a daily 6 hour stay of rats at an altitude of 6000 m ( $pO_2 = 9,8 \%$ ) for 15 days, the posthypoxic period was 10 days. The distribution of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  proteins in the hypothalamus was investigated by immunofluorescence methods. A molecular-genetic study was carried out using polymerase chain reaction with real-time reverse transcription of mRNA expression level of the *hif-1 $\alpha$*  and the *hif-3 $\alpha$*  gene.

**Results.** It was established that intermittent hypoxia led to a 13-fold increase in the mRNA level in the mediobasal hypothalamus to HIF-1 $\alpha$ , and 8,6-fold to HIF-3 $\alpha$ . In neurons of medial parvocellular (PVHmp) and posterior lateral magnocellular subnuclei (PVHpm) of PVH, an increase in the area of immunoreactivity to HIF-1 $\alpha$  and to HIF-3 $\alpha$  was observed, as well as an increase in the HIF-1 $\alpha$  protein content of 2,5 (PVHmp) and 3,4 (PVHpm) times, and the HIF-3 $\alpha$  protein in 1,7 and 3,0 times, respectively. In the posthypoxic period, the level of mRNA to HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  in the hypothalamus decreased, but for HIF-1 $\alpha$  remained 2.5 times higher than in the control. At the same time, the content of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  proteins remained increased in parvocellular neurons of PVH and decreased by 50-60% in magnocellular neurons of PVH. The reaction of neurons of SO to hypoxia was characterized by a decrease in the expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF 3 $\alpha$  proteins, which was manifested by a decrease in the area of immunoreactivity in neurons partially restored in the post-hypoxic period.

**Conclusion.** The results show that intermittent hypoxia leads to an increase in the expression of the *hif* gene family and to an increase in the synthesis of HIF proteins in PVH neurons and its preservation in the post-hypoxic period.

Факторы, индуцибельные гипоксией (HIF), представлены тремя изоформами белков – HIF-1, HIF-2 и HIF-3, экспрессия которых в клетках увеличивается при действии гипоксии. У человека и животных белки семейства HIF играют роль транскрипционных факторов и регулируют экспрессию более 600 генов, кодирующих синтез ключевых белков, вовлечённых в физиологический ответ на гипоксию [1–5]. Баланс между различными формами белка HIF определяет уровень физиологических реакций органов и тканей на гипоксию, интенсивность эритропоэза, ангиогенеза, вазомоторных реакций, функциональной активности эндокринных желёз и метаболических процессов [2,6–9].

Одно из важных звеньев адаптации организма к гипоксии связано с участием нейросекреторных ядер гипоталамуса в механизмах нейроэндокринного ответа на недостаток кислорода. В частности, нейроны медиального мелкоклеточного субъядра ПВЯ (ммПВЯ) синтезируют кортикотропин-рилизинг гормон (CRH) и определяют реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГТАКС) в ответ на действие стрессора любой природы [10–12], обеспечивают развитие адаптационных реакций и формирование резистентности организма к стрессовому фактору [13,14].

Адаптивным действием обладает и другой гормон гипоталамуса – вазопрессин (AVP), который синтезируется в нейронах заднего латерального крупноклеточного субъядра ПВЯ (злкПВЯ), супраоптического ядра (СОЯ), а также как ко-трансмиссер в нейронах ммПВЯ [6,10,12,15]. Ранее нами было показано повышение функциональной активности нейронов ПВЯ при адаптации к гипоксической гипоксии [16–18]. Однако особенности экспрессии белков семейства HIF в гипоталамических ядрах при действии прерывистой гипоксии до настоящего времени не изучены.

## Цель работы

Установить особенности экспрессии генов *hif-1 $\alpha$*  и *hif-3 $\alpha$* , накопления белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в нейронах паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса в условиях действия прерывистой гипоксии и в постгипоксический период.

## Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 48 половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 220–250 г, которые были разделены на 3 группы по 16 животных в каждой: контрольная, с 15-дневными гипоксическими тренировками (ГТ), с ГТ и 10-дневным постгипоксическим периодом. Прерывистую гипоксию (ГТ) моделировали ежедневным 6-часовым пребыванием крыс в вентилируемой барокамере (объём – 1,0 м<sup>3</sup>) с постепенным повышением высоты с 1000 м до 6000 м с 1 по 6 день эксперимента (по 1000 м в день) и последующим пребыванием на высоте 6000 м ( $pO_2 = 9,8 \%$ ) до 15 дня исследований.

Мозг экспериментальных животных быстро извлекали после одномоментной декапитации под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг) через 24 часа после окончания эксперимента. Для определения белков HIF и экспрессии генов *hif* мозг фиксировали в жидкости Буэна (20 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парапласт (MkCormick, США). Объектом изучения были медиальное мелкоклеточное (ммПВЯ) и заднелатеральное крупноклеточное (злкПВЯ) субъядра паравентрикулярного ядра гипоталамуса, а также супраоптическое ядро гипоталамуса (СОЯ) [10,15].

Для иммунофлюоресцентного выявления белков HIF серийные фронтальные срезы гипоталамуса толщиной 14 мкм депарафинировали и демаскировали в цитратном РТ-буфере (pH = 6,0) в РТ-модуле (Thermo Scientific, США), инкубировали (24 часа, T = +4 °C) с мышиными моноклональными антителами (IgG) к HIF-1 $\alpha$  или HIF-3 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, США) (разведение 1:200), затем – с козыми антителами к IgG мыши, конъюгированными с FITC (Santa Cruz Biotechnology, США) (разведение 1:64, 45 мин, T = +36 °C) и заключали в смесь глицерин/фосфатный буфер (9:1). Изучение иммунофлюоресцентной реакции проводили на микроскопе Axiomager-M2 (Carl Zeiss, ФРГ), оснащённом камерой AxioCam-HRm (Carl Zeiss, ФРГ), с применением высокоэмиссионного светофильтра 38HE (lex = 470/40 нм, lem = 525/50 нм) (Carl Zeiss, ФРГ). Количественный анализ иммунофлюоресцентной реакции проводили с помощью системы цифрового анализа изображения AxioVision-4.8.2 (Carl Zeiss, ФРГ): определяли площадь иммунореактивного материала

(мкм<sup>2</sup>) и содержание белков HIF (усл. ед. иммунофлюоресценции – Еиф) в области субъядер ПВЯ и СОЯ.

Для оценки относительного уровня мРНК к HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в медиобазальном гипоталамусе использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР). Ткань гипоталамуса депарафинировали, гомогенизировали и с помощью набора «Trizol RNA Prep 100» (Изоген, Российская Федерация) выделяли РНК, концентрацию и качество которой оценивали на спектрофотометре Libra S32PC (Biochrom Ltd., Великобритания). Обратную транскрипцию (синтез кДНК) проводили с использованием набора реагентов «ОТ» (Синтол, Российская Федерация). Специфические пары праймеров для анализа исследуемого и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения Primer-BLAST (NIH, США) и синтезированы фирмой Invitrogen (Thermo Scientific, США): для HIF-1 $\alpha$  использовали прямой праймер GGC GAG AAC GAG AAG AAA AAT AGG, обратный праймер TCG ACG TTC GGA ACT CAT CC; для HIF-3 $\alpha$  использовали прямой праймер CAC GCT TTG GAC TCT GAT GC и обратный праймер GCT CAG CAA AGT GTG GAT GC; в качестве референс-гена был использован ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Определение уровня экспрессии исследуемых генов *hif* проводили с использованием набора Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США) на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Для выражения относительного уровня экспрессии генов использовали сравнительный  $\Delta\Delta C_t$  метод. Анализ данных ПЦР проводили с помощью программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad, США).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили пакетом программ для статистического анализа EXCEL 2003 (Microsoft Corp.) с интегрированной программой надстройкой AtteStat [19]. Для оценки достоверности различий в группах применяли *t*-критерий Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

Гипоксические тренировки (ГТ) приводили к повышению иммунореактивности к HIF-1 $\alpha$  в области ПВЯ более чем на 50 %: в ммПВЯ площадь иммунореактивности увеличивалась на 58,7 % ( $p < 0,001$ ), а в злкПВЯ – на 55,1 % ( $p < 0,005$ ) (табл. 1). Это сопровождалось нарастанием содержания белка HIF-1 $\alpha$  в структурах: в ммПВЯ – в 2,5 раза ( $p < 0,001$ ), а в злкПВЯ – в 3,4 раза ( $p < 0,001$ ). На этом фоне в медиобазальном гипоталамусе отмечалось 13-кратное нарастание уровня мРНК к HIF-1 $\alpha$ , что свидетельствовало об активации гена *hif-1 $\alpha$*  под влиянием ГТ. Вместе с тем в области крупноклеточных нейронов СОЯ ГТ приводили к ограничению площади иммунореактивности к HIF-1 $\alpha$  в нейронах на 46 % ( $p < 0,001$ ) без изменения содержания белка ( $p > 0,5$ ).

В отличие от HIF-1 $\alpha$ , увеличение экспрессии белка HIF-3 $\alpha$  в ответ на ГТ в большей степени проявлялось в крупноклеточном злкПВЯ, в котором площадь иммунореактивности к HIF-3 $\alpha$  увеличивалась в 2 раза ( $p < 0,001$ ), а содержание самого белка – в 3

раза ( $p < 0,001$ ) (табл. 2). В мелкоклеточном ммПВЯ площадь иммунореактивности к белку HIF-3 $\alpha$  не изменялась ( $p > 0,1$ ), а его содержание увеличивалось на 73,5 % ( $p < 0,001$ ). В области крупноклеточных нейронов СОЯ гипоксические тренировки приводили к умеренному ограничению площади иммунореактивности к HIF-3 $\alpha$  в нейронах на 13,5 % ( $p < 0,05$ ) без статистически значимых изменений содержания белка ( $p > 0,1$ ). На этом фоне в медиобазальном гипоталамусе отмечалось нарастание уровня мРНК к HIF-3 $\alpha$  в 8,6 раза, что указывало на общую для нейросекреторных нейронов активацию гена *hif-3 $\alpha$*  в ответ на гипоксический стимул.

Полученные данные свидетельствуют о том, что прерывистая гипоксия повышает экспрессию генов семейства *hif* и усиливает синтез белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в пептидергических нейронах ПВЯ. Вероятно, что повышение экспрессии генов *hif* в данном случае можно рассматривать как сигнальный механизм активации пептидергических нейронов ПВЯ в ответ на гипоксический стимул. Действительно, ранее нами было установлено повышение уровня образования CRH и AVP в ПВЯ при действии гипоксической гипоксии [16–18]. Эти нейропептиды реализуют механизмы стероидогенеза и адаптации организма к действию стрессоров различного генеза [14,20]. В то же время угнетение синтеза белков семейства HIF в СОЯ свидетельствует о том, что AVP-синтезирующие нейроны СОЯ, по-видимому, не участвуют в механизмах адаптационного ответа на гипоксию. Это согласуется с ранее установленным фактом, что многодневная гипоксическая гипоксия приводит к дистрофическим измерениям в СОЯ [16,21]. Таким образом, мы полагаем, что активация генов семейства *hif* при многодневном действии гипоксической гипоксии может являться одним из молекулярных маркеров активации пептидергических нейронов нейросекреторных ядер гипоталамуса, участвующих в механизмах нейроэндокринного ответа на стресс. В этой связи эффективность гипоталамических механизмов адаптации к гипоксии, опосредованных HIF, была нами оценена через 10 дней после окончания ГТ.

Было установлено, что в постгипоксическом периоде уровень мРНК к HIF-1 $\alpha$  в медиобазальном гипоталамусе снижался в 5 раз ( $p < 0,001$ ) по сравнению со сроком окончания ГТ, но оставался при этом в 2,5 раза ( $p < 0,001$ ) выше, чем в контроле (табл. 1). В CRH/AVP-синтезирующих мелкоклеточных нейронах ммПВЯ сохранялись высокие показатели иммунореактивности к белку HIF-1 $\alpha$ , а его содержание составляло 80 % ( $p < 0,05$ ) от показателя окончания ГТ, что было в 2 раза выше, чем в контроле. Сохранялись высокие параметры синтеза белка HIF-1 $\alpha$  в AVP-синтезирующих крупноклеточных нейронах злкПВЯ, в которых содержание белка хотя и снижалось на 45 % ( $p < 0,002$ ) по сравнению с окончанием ГТ, но сохранялось на 85 % ( $p < 0,001$ ) выше, чем в контроле. В крупноклеточных нейронах СОЯ в постгипоксический период содержание белка HIF-1 $\alpha$  не изменялось, хотя отмечалось некоторое восстановление параметров иммунореактивности к HIF-1 $\alpha$ , площадь которой возрастала на 20 % ( $p < 0,002$ ) по отношению ко времени окончания ГТ.

**Таблица 1.** Показатели экспрессии HIF-1 $\alpha$  в медиобазальном гипоталамусе при действии прерывистой гипоксии (M  $\pm$  m)

Показатели	Группы животных		
	Контрольная	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-1 $\alpha$ , в СОЯ (мкм <sup>2</sup> )	4,835 $\pm$ 0,357	2,601 $\pm$ 0,113*	3,125 $\pm$ 0,113**
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-1 $\alpha$ , в злкПВЯ (мкм <sup>2</sup> )	4,117 $\pm$ 0,392	6,385 $\pm$ 0,652*	5,116 $\pm$ 0,584
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-1 $\alpha$ , в ммПВЯ (мкм <sup>2</sup> )	2,670 $\pm$ 0,099	4,237 $\pm$ 0,375*	4,553 $\pm$ 0,312*
Содержание HIF-1 $\alpha$ в СОЯ (ЕиФ)	0,044 $\pm$ 0,002	0,043 $\pm$ 0,003	0,045 $\pm$ 0,002
Содержание HIF-1 $\alpha$ в злкПВЯ (ЕиФ)	0,039 $\pm$ 0,003	0,134 $\pm$ 0,016*	0,073 $\pm$ 0,008**
Содержание HIF-1 $\alpha$ в ммПВЯ (ЕиФ)	0,200 $\pm$ 0,011	0,493 $\pm$ 0,032*	0,396 $\pm$ 0,033**
Содержание мРНК к HIF-1 $\alpha$ в медиобазальном гипоталамусе (y. e.)	1,000 $\pm$ 0,431	12,805 $\pm$ 1,527*	2,498 $\pm$ 0,613**

\*: достоверность отличий  $p < 0,05$  по отношению к показателям контрольной группы; \*\*: после гипоксических тренировок.

**Таблица 2.** Показатели экспрессии HIF-3 $\alpha$  в медиобазальном гипоталамусе при действии прерывистой гипоксии (M  $\pm$  m)

Показатели	Группы животных		
	Контрольная	Гипоксические тренировки	Постгипоксический период
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-3 $\alpha$ в СОЯ (мкм <sup>2</sup> )	2,865 $\pm$ 0,164	2,476 $\pm$ 0,108*	2,859 $\pm$ 0,126*
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-3 $\alpha$ в злкПВЯ (мкм <sup>2</sup> )	2,882 $\pm$ 0,169	5,859 $\pm$ 0,548*	3,607 $\pm$ 0,259**
Площадь материала, иммунореактивного к HIF-3 $\alpha$ в ммПВЯ (мкм <sup>2</sup> )	2,351 $\pm$ 0,077	2,615 $\pm$ 0,152	3,309 $\pm$ 0,140**
Содержание HIF-3 $\alpha$ в СОЯ (ЕиФ)	0,028 $\pm$ 0,002	0,033 $\pm$ 0,003	0,033 $\pm$ 0,002*
Содержание HIF-3 $\alpha$ в злкПВЯ (ЕиФ)	0,030 $\pm$ 0,002	0,090 $\pm$ 0,009*	0,036 $\pm$ 0,002**
Содержание HIF-3 $\alpha$ в ммПВЯ (ЕиФ)	0,146 $\pm$ 0,008	0,253 $\pm$ 0,017 *	0,264 $\pm$ 0,016*
Содержание мРНК к HIF-3 $\alpha$ в медиобазальном гипоталамусе (y. e.)	1,000 $\pm$ 0,258	8,565 $\pm$ 0,838*	1,246 $\pm$ 0,328

\*: достоверность отличий  $p < 0,05$  по отношению к показателям контрольной группы; \*\*: после гипоксических тренировок.

В то же время концентрация мРНК к HIF-3 $\alpha$  в медиобазальном гипоталамусе в постгипоксический период снижалась до контрольных значений (табл. 2). При этом существенно уменьшалась площадь иммунореактивности к белку HIF-3 $\alpha$  и содержание самого белка в крупноклеточных нейронах злкПВЯ, хотя эти показатели оставались на 20–25 % выше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ). В СОЯ показатели площади иммунореактивности к белку HIF-3 $\alpha$  восстанавливались до контрольных значений, однако содержание самого белка в структуре не изменялось. В противоположность реакции крупноклеточных AVP-синтезирующих нейронов, в CRH/AVP-синтезирующих мелкоклеточных нейронах ммПВЯ площадь иммунореактивности к белку HIF-3 $\alpha$  продолжала увеличиваться на 26,5 % ( $p < 0,001$ ) при сохранении показателей содержания белка на уровне значений, соответствующих окончанию ГТ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что многодневное действие гипоксической гипоксии приводит к повышению экспрессии генов *hif-1 $\alpha$*  и *hif-3 $\alpha$*  и усилению синтеза белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в пептидергических нейронах ПВЯ, но не в крупноклеточных нейронах СОЯ. Важно, что данный эффект в значительной мере сохранялся через 10 дней после окончания ГТ, а наиболее интенсивное увеличение содержания белков семейства HIF в ответ на гипоксию отмечалось в ммПВЯ. Как уже говорилось ранее, его мелкоклеточные нейроны ммПВЯ являются основным источником синтеза CRH в гипоталамусе и одновременно синтезируют AVP ко-пептид в CRH-ергических нейронах. Многие исследователи полагают, что уровень функциональной активности ПВЯ в значительной мере определяет успешность стратегии адаптации организма к стрессорам различного генеза, в том числе и к гипоксии [6, 12, 14, 17, 18]. Хотя доказательства прямого влияния HIF-1 $\alpha$  на синтез CRH в гипоталамусе

в открытом литературном доступе мы не обнаружили, но известно, что HIF-1 $\alpha$  активирует ген POMC в гипоталамических нейронах при гипоксии [22,23] так же, как и CRH – в гипоталамусе и аденогипофизе при стрессе [6,12]. При этом блокирование синтеза HIF-1 $\alpha$  в гипоталамических нейронах, синтезирующих POMC, приводит к дисбалансу энергического обмена в организме и способствует развитию ожирения гипоталамического генеза [23], а фармакологическая стимуляция образования HIF-1 $\alpha$ , напротив, повышает эффективность активации ГГАС в ответ на острый стресс умеренной интенсивности [24].

Следует обратить внимание на тот факт, что умеренная гипоксическая нагрузка приводит к активации оксидативного и нитрозирующего стресса в нейронах [25], а тяжёлая гипоксия вызывает воспалительный процесс и апоптоз нейроцитов [26,27]. Однако даже кратковременная экспозиция в воздушной среде с 10 % содержанием O<sub>2</sub> повышает в нейронах концентрацию белков HIF-1 $\alpha$  [28] и HIF-3 $\alpha$  [29]. Считается, что продукция белка HIF-1 $\alpha$  является критически важной для адаптации клеток к гипоксии [4,8,9] и обеспечивает молекулярные механизмы адаптации мозга к гипоксии [28,30]. При этом HIF-1 $\alpha$  оказывает нейропротекторный эффект и стимулирует репарацию нервной ткани, повышая в ней пул сквенджеров свободных радикалов (гем-гидроксилазы-1, гем-оксигеназы-1) и факторов ангиогенеза (VEGF, VEGFR1, ангиопоэтин) [1,30–32]. В условиях гипоксии HIF-1 $\alpha$  является важным регулятором метаболизма глюкозы, активатором генов трансмембранных транспортёров глюкозы и ключевых ферментов гликолиза, что приводит к увеличению пула АТФ в нервных клетках [1]. При умеренной гипоксической нагрузке HIF-1 $\alpha$  оказывает мощный антиапоптотический эффект и уменьшает клеточную гибель при ишемии мозга [28,33].

Для клеток млекопитающих характерна ко-локализация обеих изоформ белка HIF [34], однако при гипоксии концентрация HIF-1 $\alpha$  повышается в основном в цитоплазме нейронов [28], а уровень HIF-3 $\alpha$  увеличивается главным образом в клеточном ядре [34]. Данная особенность может быть обусловлена спецификой взаимного участия обеих изоформ HIF в молекулярных механизмах адаптации к гипоксии по принципу отрицательной обратной связи. Так, белок HIF-1 $\alpha$  может влиять на экспрессию гена *hif-3 $\alpha$* , а белок HIF-3 $\alpha$ , как правило, тормозит синтез HIF-1 $\alpha$  [4,8,9]. Однако ген *hif-1 $\alpha$*  – всего лишь одна из мишеней для белка HIF-3 $\alpha$ . Помимо регулирования транскрипции специфичных для HIF-3 $\alpha$  целевых генов, существует большая группа генов, однонаправленная регуляция которых характерна для обеих изоформ белка HIF. В частности, это гены, регулирующие катаболизм моносахаридов, р53-опосредованные процессы клеточного апоптоза, механизмы индукции оксидативного стресса и антиоксидантной защиты [3,5]. В настоящем исследовании установлено, что гипоксические тренировки приводили к более интенсивному накоплению белка HIF-1 $\alpha$  в нейронах ПВЯ, содержание которого в 2 раза превышало соответствующие значения HIF-3 $\alpha$  в мПВЯ и на 50 % – в злПВЯ. Следовательно, повышение концентрации белка HIF-3 $\alpha$  в гипоталамусе не обязательно должно приводить к торможению активности гена *hif-1 $\alpha$*  и, значит, к выключению активности генов, регулируемых белком HIF-1 $\alpha$ .

Таким образом, проведенные исследования показали, что белки HIF могут играть важную роль в молекулярных механизмах регуляции физиологической функции пептидергических нейронов гипоталамуса в ответ на гипоксический стимул. Вероятно, что изменение экспрессии генов *hif* и соотношения пула белков семейства HIF в нейронах может модулировать интенсивность синтеза тех ключевых гипоталамических нейропептидов, которые определяют функциональную активность гипоталамуса и периферических эндокринных желез, и, соответственно, адаптивную возможность организма к гипоксии. В то же время сохранение высоких показателей экспрессии гена *hif-1 $\alpha$*  в паравентрикулярном ядре гипоталамуса в постгипоксический период свидетельствует о формировании системного структурного следа адаптации к гипоксии и, следовательно, эффективности предложенного режима гипоксических тренировок с целью повышения общей резистентности организма.

## Выводы

1. Прерывистая гипобарическая гипоксия приводит к повышению синтеза мРНК к HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , а также самих белков в котриколиберин- и вазопресинергических нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса.

2. Гипоксические тренировки снижают уровень образования белков HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в крупноклеточных нейронах супраоптического ядра.

3. Основные показатели повышения функциональной активности нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса сохраняются на протяжении 10 дней после окончания действия прерывистой гипоксии.

## Список литературы

- [1] Zagórska A. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing / A. Zagórska, J. Dulak // Acta Biochimica Polonica. – 2004. – Vol. 51. – №3. – P. 563–585.
- [2] Majmundar A. J. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress / A. J. Majmundar, W. J. Wong, M. C. Simon // Mol Cell. – 2010. – Vol. 40. – P. 294–309.
- [3] Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia / P. Zhang, Q. Yao, L. Lu, et al. // Cell Reports. – 2014. – Vol. 6. – P. 1110–1121.
- [4] Yang H.-L. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function / H.-L. Yang, W. Chao, Z.-F. Xiong, X. Fang // Mol. Med. Reports. – 2015. – Vol. 12. – P. 2411–2416.
- [5] Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes / C. Duan // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2016. – Vol. 310. – P. C260–C269.
- [6] Charmandari E. Endocrinology of the stress response / E. Charmandari, C. Tsigos, G. Chrousos // Annu. Rev. Physiol. – 2005. – Vol. 67. – P. 259–284.
- [7] Prabhakar N. R. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 / N. R. Prabhakar, G. L. Semenza // Physiol Rev. – 2012. – Vol. 92. – P. 967–1003.
- [8] Pugh C. W. Modulation of the Hypoxic Response / C. W. Pugh // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 903. – P. 259–271.
- [9] Lee H.-C. Endocrine targets of hypoxia-inducible factors / H.-C. Lee, S.-J. Tsai // J. Endocrinology. – 2017. – Vol. 234. – P. R53–R65.
- [10] Swanson L. W. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei / L. W. Swanson, P. E. Sawchenko // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – Vol. 6. – P. 269–324.
- [11] The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved / J. J. Bonfiglio, C. Inda, D. Refojo, et al. // Neuroendocrinology. – 2011. – Vol. 94. – P. 12–20.
- [12] Kovacs K. J. CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress / K. J. Kovacs // J. Chem. Neuroanat. – 2013. – Vol. 54. – P. 25–33.
- [13] Меерсон Ф. Адаптация, стресс и профилактика / Ф. Меерсон. – М.: Наука, 1981. – 279 с.
- [14] McEwen B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain / B. S. McEwen // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87. – P. 873–904.
- [15] Silverman A. J. Magnocellular neurosecretory system / A. J. Silverman, E. A. Zimmerman // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – Vol. 6. – P. 357–380.
- [16] Абрамов А. В. Влияние гипоксии на функциональное состояние нейросекреторной системы гипоталамуса крыс / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник // Физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1992. – Т. 78. – №7. – С. 21–27.
- [17] Абрамов А. В. Влияние интервальных гипоксических тренировок на функциональное состояние пептидергических нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса и нейронов ствола мозга крыс / А. В. Абрамов // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1998. – Т. 84. – №3. – С. 173–181.
- [18] Kolesnik Yu. M. Effect of Intermittent Hypoxia Trainings on the Functional State of Corticotropin releasing hormone- and  $\beta$ -Endorphin-Synthesizing Neurons of the Rat Paraventricular Nucleus of Hypothalamus / Yu. M. Kolesnik, E. V. Kadzharyan, A. V. Abramov // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2014. – Vol. 5. – Issue 4. – P. 291–297.
- [19] Гайдышев И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++ / И. П. Гайдышев. – СПб.: БХВ-Петербург, 2004. – 504 с.
- [20] Tsigos C. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress / C. Tsigos, G. P. Chrousos // J. Psychosomatic Res. – 2002. – Vol. 53. – P. 865–871.
- [21] Шаменко В. А. Морфогистохимическая характеристика нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс при действии прерывистой гипоксии / В. А. Шаменко // Ежемесячный научный журнал Фонда «Биолог». – 2014. – №4. – С. 29–32.
- [22] Virtue S. Nothing Iffy about HIF in the Hypothalamus / S. Virtue, A. Vidal-Puig // PLoS Biol. – 2011. – Vol. 9. – №7. – P. e1001116.
- [23] Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation / H. Zhang, G. Zhang, F. J. Gonzalez, et al. // PLoS Biol. – 2011. – Vol. 9. – №7. – P. e1001112.
- [24] Harrell C. S. Pharmacological stimulation of Hypoxia Inducible Factor-1  $\alpha$  facilitates the corticosterone response to a mild acute stressor / C. S. Harrell, S. A. Rowson, G. N. Neigh // Neurosci. Lett. – 2015. – Vol. 600. – P. 75–79.
- [25] Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain / P. Maiti, S. B. Singh, A. K. Sharma, et al. // Neurochemistry International. – 2006. – Vol. 49. – P. 709–716.



- [26] Doyle K. P. Mechanisms of ischemic brain damage / K. P. Doyle, R. P. Simon, M. P. Stenzel-Poore // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol. 55. – №3. – P. 310–318.
- [27] Pathogenic mechanisms following ischemic stroke / S. E. Khoshnam, W. Winlow, M. Farzaneh, et al. // *Neurol. Sci.* – 2017. – Vol. 38. – №7. – P. 1167–1186.
- [28] Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice / L. Terraneo, R. Paroni, P. Bianciardi, et al. // *Redox Biology*. – 2017. – Vol. 11. – P. 12–20.
- [29] Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells. Characterization and comparison with HIF-1alpha / Q. F. Li, X. R. Wang, Y. W. Yang, H. Lin // *Cell Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 548–558.
- [30] Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury / M. Khan, H. Khan, I. Singh, A. K. Singh // *Neural Regen. Res.* – 2017. – Vol. 12. – №5. – P. 696–701.
- [31] Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ / L. Li, K. M. Candelario, K. Thomas, et al. // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34. – P. 16713–16719.
- [32] Sun Y. Neuroprotective mechanism of HIF-1 $\alpha$  overexpression in the early stage of acute cerebral infarction in rats / Y. Sun, W. He, L. Geng // *Exp. Therapeutic Medicine*. – 2016. – Vol. 12. – P. 391–395.
- [33] Is HIF-1  $\alpha$  a pro- or an anti-apoptotic protein? / J. P. Piret, D. Mottet, M. Raes, C. Michiels // *Biochem. Pharmacology*. – 2002. – Vol. 64. – Issue 5–6. – P. 889–892.
- [34] The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction / T. Tanaka, M. Wiesener, W. Bernhardt, et al. // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 424. – P. 143–151.

## References

- [1] Zagórska, A., & Dulak, J. (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 563–585. doi: 045103563.
- [2] Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40, 294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
- [3] Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P. J., & Duan, C. (2014) Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Reports*, 6, 1110–1121. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.011.
- [4] Yang, H. -L., Chao, W., Xiong, Z. -F., & Fang, X. (2015) Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function. *Mol. Med. Reports*, 12, 2411–2416. doi: 10.3892/mmr.2015.3689.
- [5] Duan, C. (2016) Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 310, C260–C269. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2015.
- [6] Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259–284. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.
- [7] Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012) Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev.*, 92, 967–1003. doi: 10.1152/physrev.00030.2011.
- [8] Pugh, C. W. (2016) Modulation of the Hypoxic Response. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 903, 259–271. doi: 10.1007/978-1-4899-7678-9\_18.
- [9] Lee, H. -C., & Tsai, S. -J. (2017) Endocrine targets of hypoxia-inducible factors. *J. Endocrinology*, 234, R53–R65. doi: 10.1530/JOE-16-0653.
- [10] Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6, 269–324. doi: 10.1146/annurev.ne.06.030183.001413.
- [11] Bonfiglio, J. J., Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E., & Silberstein, S. (2011) The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology*, 94, 12–20. doi: 10.1159/000328226.
- [12] Kovacs, K. J. (2013) CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J. Chem. Neuroanatomy*, 54, 25–33. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.05.003.
- [13] Meerson, F. Z. (1981) *Adaptacija, stress i profilaktika [Adaptation, stress and prevention]*. Moscow: Nauka. [in Russian].
- [14] McEwen, B. S. (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.*, 87, 873–904. doi: 10.1152/physrev.00041.2006.
- [15] Silverman, A. J., & Zimmerman, E. A. (1983) Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6, 357–380. doi: 10.1146/annurev.ne.06.030183.002041.
- [16] Abramov, A. V., & Kolesnik, Yu. M. (1992) Vliyanie gipoksii na funkcionálnoe sostoyanie neyrosekretornoj sistemy gipotalamusa krysa [Influence of hypoxia on the functional state of peptidergic neurons of the neurosecretory system of the rat hypothalamus]. *Fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, 78(7), 21–27. [in Russian].
- [17] Abramov, A. V. (1998) Vliyanie interval'nykh gipoksicheskikh trenirovok na funkcionálnoe sostoyanie peptidergicheskikh neyronov paraventriculjarnogo yadra gipotalamusa i neyronov stvola mozga krysa [Influence of interval hypoxic training on the functional state of peptidergic neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and neurons of the rat brain stem]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, 84(3), 173–181. [in Russian].
- [18] Kolesnik Yu.M., Kadzharyan E.V., Abramov A.V. (2014) Effect of Intermittent Hypoxia Trainings on the Functional State of Corticotropin releasing hormone- and  $\beta$ -Endorphin-Synthesizing Neurons of the Rat Paraventricular Nucleus of Hypothalamus. *Int. J. Physiol. Pathophysiology*, 5(4), 291–297. doi: 10.1615/IntJPhysPathophys.v5.i4.20.
- [19] Gajdyshev, I. P. (2004) *Reshenie nauchnykh i inzhenernykh zadach sredstvami Excel, VBA i C/C++*. [Solution of scientific and engineering problems by means of Excel, VBA and C/C++]. Saint Petersburg [in Russian].
- [20] Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosomatic Res.*, 53, 865–871. doi: 10.1016/S0022-3999(02)00429-4.
- [21] Shamenko, V. O. (2014) Morfogistokhimicheskaya kharakteristika neyronov supraopticheskogo yadra gipotalamusa krysa pri dejstvii preryvistoj gipoksii [The morpho-histochemical characteristics of neurons of supraoptic nucleus of the rat hypothalamus under intermittent hypoxia]. *Ezhemesyachnyj nauchnyj zhurnal Fonda «Biolog»*, 4, 29–32 [in Russian].
- [22] Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2011) Nothing iffy about HIF in the Hypothalamus. *PLoS Biol.*, 9(7), e1001116. doi: 10.1371/journal.pbio.1001116.
- [23] Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F. J., Park, S., & Cai, D. (2011) Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation. *PLoS Biol.*, 9(7), e1001112. doi: 10.1371/journal.pbio.1001112.
- [24] Harrell, C. S., Rowson, S. A., & Neigh, G. N. (2015) Pharmacological stimulation of Hypoxia Inducible Factor-1  $\alpha$  facilitates the corticosterone response to a mild acute stressor. *Neurosci Lett*, 600, 75–79. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.051.
- [25] Maiti, P., Singh, S. B., Sharma, A. K., Muthuraju, S., Banerjee, P. K., & Ilavazhagan, G. (2006) Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry International*, 49, 709–716. doi: 10.1016/j.neuint.2006.06.002.
- [26] Doyle K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310–318. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.
- [27] Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., & Moghadam, H. F. (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol. Sci.*, 38(7), 1167–1186. doi: 10.1007/s10072-017-2938-1.
- [28] Terraneo, L., Paroni, R., Bianciardi, P., Giallongo, T., Carelli, S., Gorio, A., & Samaja, M. (2017) Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox Biology*, 11, 12–20. doi: 10.1016/j.redox.2016.10.018.
- [29] Li, Q. F., Wang, X. R., Yang, Y. W., & Lin, H. (2006) Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: Characterization and comparison with HIF-1alpha. *Cell Res.*, 16(6), 548–558. doi: 10.1038/sj.cr.7310072.
- [30] Khan, M., Khan, H., Singh, I., & Singh, A. K. (2017) Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.*, 12(5), 696–701. doi: 10.4103/1673-5374.206632.
- [31] Li, L., Candelario, K. M., Thomas, K., Wang, R., Wright, K., Messier, A., & Cunningham, L. A. (2014) Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ. *J. Neurosci.*, 34, 16713–16719. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4590-13.2014.
- [32] Sun, Y., He, W., & Geng, L. (2016) Neuroprotective mechanism of HIF-1 $\alpha$  overexpression in the early stage of acute cerebral infarction in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(1), 391–395. doi: 10.3892/etm.2016.3288.
- [33] Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M., & Michiels, C. (2002) Is HIF-1  $\alpha$  a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharmacology*, 64(5–6), 889–892. doi: 10.1016/S0006-2952(02)01155-3.
- [34] Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K. U., & Warnecke, C. (2009) The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem. J.*, 424, 143–151. doi: 10.1042/BJ20090120.

## Сведения об авторах:

Абрамов А. В., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, руководитель учебного медико-лабораторного центра, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.  
Шаменко В. А., ассистент каф. детских болезней ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

**Відомості про авторів:**

Абрамов А. В., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, керівник навчального медико-лабораторного центру, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Шаменко В. О., асистент каф. дитячих хвороб ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

**Information about authors:**

Abramov A. V., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of the Department of Pathological Physiology, Head of Scientific Medical-Laboratory Center, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Shamenko V. A., MD, Assistant of the Department of Children Diseases of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

---

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

---

Надійшло до редакції / Received: 05.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 10.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 12.05.2017

# Predictive value of melatonin and serotonin levels in early recovery period of cerebral ischemic hemispheric stroke

S. O. Medvedkova

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

**The aim** was developing of criteria for prediction of the early recovery period outcome of cerebral ischemic hemispheric stroke (CIHS) on the base of the identification of serum concentration of melatonin and plasma level of serotonin.

**Materials and methods:** complex clinical and paraclinical investigation was carried out in 77 patients (the average age of patients was  $57.9 \pm 0.9$  years) on early recovery period of CHIS using of clinical scales (National Institute of Health Stroke Scale, Barthel Index, modified Rankin Scale) on the 10<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> day of disease, and visualization of cerebral structures by CT scan, and identification of the serum concentration of melatonin and serotonin plasma level on the 10<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> day of disease, and also by the calculation of the melatonin/serotonin ratio (MSR) as serum concentration of melatonin divided by serotonin plasma level.

**Results.** Using the comparative ROC-analysis it was defined that the most informative parameters for prediction of moderate and severe disability as for value according to mRS  $\geq 3$  points on the 180<sup>th</sup> day are the level of MSR on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.78,  $p < 0.05$ ), serotonin plasma level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.74,  $p < 0.05$ ), dynamics of serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.67,  $p < 0.05$ ), dynamics of serotonin plasma level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.67,  $p < 0.05$ ), dynamics of MSR on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.66,  $p < 0.05$ ) and serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.66,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** The level of MSR  $>212.0$  on the 30<sup>th</sup> day was the predictor of moderate and profound disability for modified Rankin's scale  $\geq 3$  points on the 90<sup>th</sup> (AUC = 0.81,  $p < 0.05$ ; sensitivity = 100.0 %, specificity = 75.0 %) and on the 180<sup>th</sup> day of disease was (AUC = 0.78,  $p < 0.05$ ; sensitivity = 100.0 %, specificity = 73.3 %); the serotonin plasma level  $\leq 0.15$   $\mu\text{mol/l}$  on the 30<sup>th</sup> day of CIHS was the predictor of moderate and profound disability for modified Rankin's scale  $\geq 3$  points on the 180<sup>th</sup> day of disease (AUC = 0.74,  $p < 0.05$ ; sensitivity = 60.0 %, specificity = 86.7 %).

**Key words:**

cerebral infarction, serotonin, melatonin, prognosis.

**Pathologia**

2017; 14 (2), 163–166

**DOI:**

10.14739/2310-1237.2017.2.109292

**E-mail:**

s.medvedkova@gmail.com

## Прогностичне значення рівнів мелатоніну та серотоніну в ранньому відновному періоді мозкового ішемічного півкульового інсульту

С. О. Медведкова

**Мета роботи** – розробка критеріїв прогнозування виходу раннього відновного періоду мозкового ішемічного півкульового інсульту (МІПІ) на підставі визначення сироваткової концентрації мелатоніну та рівня серотоніну у плазмі крові.

**Матеріали та методи.** Здійснили комплексне клініко-параклінічне дослідження 77 хворих (середній вік  $57,9 \pm 0,9$  року) в ранньому відновному періоді МІПІ з використанням клінічних шкал (National Institute of Health Stroke Scale, Barthel Index, modified Rankin Scale) на 10, 30, 90 та 180 добу захворювання, візуалізації церебральних структур методом комп'ютерної томографії, визначення сироваткової концентрації мелатоніну, рівня серотоніну у плазмі крові на 10, 30 добу захворювання, а також розрахунком співвідношення мелатоніну та серотоніну (СМС) = сироваткова концентрація мелатоніну/рівень серотоніну у плазмі крові.

**Результати.** На підставі порівняльного ROC-аналізу встановили, що найінформативнішими параметрами для прогнозування помірної та вираженої інвалідизації у вигляді значення по mRS  $\geq 3$  бали на 180 добу є рівень СМС на 30 добу (AUC = 0,78,  $p < 0,05$ ), вміст серотоніну в плазмі крові на 30 добу (AUC = 0,74,  $p < 0,05$ ), динаміка сироваткової концентрації мелатоніну на 30 добу (AUC = 0,67,  $p < 0,05$ ), динаміка рівня серотоніну в плазмі крові на 30 добу (AUC = 0,67,  $p < 0,05$ ), динаміка СМС на 30 добу (AUC = 0,66,  $p < 0,05$ ) і сироваткова концентрація мелатоніну на 30 добу (AUC = 0,66,  $p < 0,05$ ).

**Висновки.** Рівень СМС  $>212,0$  на 30 добу МІПІ є предиктором помірної та глибокої інвалідизації у формі значення за модифікованою шкалою Ренкіна  $\geq 3$  бали на 90 (AUC = 0,81,  $p < 0,05$ ; чутливість = 100,0 %, специфічність = 75,0 %) та 180 добу захворювання (AUC = 0,78,  $p < 0,05$ ; чутливість = 100,0 %, специфічність = 73,3 %); вміст серотоніну у плазмі крові  $\leq 0,15$   $\mu\text{mol/l}$  на 30 добу МІПІ виступає предиктором помірної та глибокої інвалідизації у вигляді значення за модифікованою шкалою Ренкіна  $\geq 3$  бали на 180 добу захворювання (AUC = 0,74,  $p < 0,05$ ; чутливість = 60,0 %, специфічність = 86,7 %).

**Ключові слова:**

інфаркт мозку, серотонін, мелатонін, прогноз.

**Патологія.** – 2017. –

Т. 14, № 2(40). – С. 163–166

## Прогностическое значение уровней мелатонина и серотонина в раннем восстановительном периоде мозгового ишемического полушарного инсульта

С. А. Медведкова

**Цель работы** – разработка критериев прогнозирования исхода раннего восстановительного периода мозгового ишемического полушарного инсульта (МИПИ) на основании определения сывороточной концентрации мелатонина и уровня серотонина в плазме крови.

**Материалы и методы.** Проведено комплексное клинико-параклиническое исследование 77 больных (средний возраст  $57,9 \pm 0,9$  года) в раннем восстановительном периоде МИПИ с использованием клинических шкал (National Institute

**Ключевые слова:**

инфаркт мозга, серотонин, мелатонин, прогноз.

**Патология.** – 2017. –

Т. 14, № 2(40). – С. 163–166

of Health Stroke Scale, Barthel Index, modified Rankin Scale) на 10, 30, 90 и 180 сутки захворювання, візуалізації церебральних структур методом комп'ютерної томографії, визначення сировоточної концентрації мелатоніну і рівня серотоніну в плазмі крові на 10, 30 сутки захворювання, а також розрахунок співвідношення мелатоніну і серотоніну (СМС) = сировоточна концентрація мелатоніну/рівень серотоніну в плазмі крові.

**Результати.** На основі порівняльного ROC-аналізу встановлено, що найбільш інформативними параметрами для прогнозування умереної і вираженої інвалідизації в формі значення по mRS  $\geq 3$  балла на 180 сутки є рівень СМС на 30 сутки (AUC = 0,78,  $p < 0,05$ ), вміст серотоніну в плазмі крові на 30 сутки (AUC = 0,74,  $p < 0,05$ ), динаміка сировоточної концентрації мелатоніну на 30 сутки (AUC = 0,67,  $p < 0,05$ ), динаміка рівня серотоніну в плазмі крові на 30 сутки (AUC = 0,67,  $p < 0,05$ ), динаміка КИБМ на 30 сутки (AUC = 0,66,  $p < 0,05$ ) і сировоточна концентрація мелатоніну на 30 сутки (AUC = 0,66,  $p < 0,05$ ).

**Висновки.** Рівень СМС  $>212,0$  на 30 сутки МІПІ є предиктором умереної і глибокої інвалідизації в формі значення по модифікованій шкалі Рэнкіна  $\geq 3$  балла на 90 (AUC = 0,81,  $p < 0,05$ ; чутливість = 100,0 %, специфічність = 75,0 %) і 180 сутки захворювання (AUC = 0,78,  $p < 0,05$ ; чутливість = 100,0 %, специфічність = 73,3 %); вміст серотоніну в плазмі крові  $\leq 15$  мкмоль/л на 30 сутки МІПІ виступає предиктором умереної і глибокої інвалідизації в формі значення по модифікованій шкалі Рэнкіна  $\geq 3$  балла на 180 сутки захворювання (AUC = 0,74,  $p < 0,05$ ; чутливість = 60,0 %, специфічність = 86,7 %).

## Introduction

Diagnostics and treatment of the patients with cerebral stroke is one of the main problems in modern neurology. Medical and social significance of this problem is caused by the high morbidity, disability and mortality for above mentioned pathology [7]. Cerebral stroke is the main reason of disability among surviving patients. Post-stroke disability takes the first place among the reasons of disability concerning adults in the majority countries of the world. 80 % of people after brain stroke become disabled, 25 % of people need the nursing care [3]. Differentiated determination of optimal structure and number of medical therapies based on the individual prognosis is one of the ways for improvement of functional outcome among the patients with cerebral ischemic stroke [2].

In recent clinical and experimental investigations the role of serotonin [1] and melatonin [4–6,8] has been persuasively proved in pathogenesis of acute focal cerebral ischemia. This fact is the basis for suggestion about the possibility to use the humoral markers with aim to predict the outcome of cerebral ischemic stroke.

**Its aim** was developing criteria for prediction of the outcome during the early recovery period of CIHS on the base of the identification of serum concentration of melatonin and the level of serotonin in the plasma.

## Material and methods of investigation

In order to achieve the aim, complex clinical and paraclinical investigation was carried out in 77 patients (55 men and 22 women, the average age was  $57.9 \pm 0.9$  years) on early recovery period of CIHS. The inclusion criteria were: men and women at the age from 33 to 74 years old with the confirmed cerebral hemispheric ischemic stroke according to the data of clinical and computer tomography study; hospitalization during the first 24 hours from the beginning of disease. The patients with the following criterion were excluded from the investigation: acute disorders of cerebral circulation in anamnesis; haemorrhagic transformation of cerebral infarction; combined stroke;  $\geq 2$  lesions; somatic pathology on the stage of decompensation; cancer pathology.

The evaluation of the level for neurological deficit was carried out in all the patients according to the National Insti-

tute of Health Stroke Scale (NIHSS), the level of functional independence according to Barthel Index (BI) and disability according to modified Rankin Scale (mRS) on the 10<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> day of disease. Visualization of cerebral structures was done using the CT scanner Siemens Somatom Spirit (Germany).

Blood samples were collected into 2 vacutainer tubes (one – with clot activator, the next – with EDTA) by venipuncture from median cubital vein on the anterior forearm in the morning (7–7.30 AM) on the 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day from CHIS onset. Melatonin serum level was measured using an immunoassay (IBL, Germany, Cat. No. RE54021) at Scientific Medical Laboratory Center (head – prof. A. Abramov) of ZSMU. Serotonin plasma level was measured using a fluorescent spectrophotometry ( $\lambda_{ex} = 300$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm) at Laboratory Diagnosis and General Pathology Department (head – prof. A. Trilin) of the Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education. Melatonin/Serotonin ratio (MSR), dynamic coefficients of melatonin ( $\Delta ME$ ), serotonin ( $\Delta SE$ ) and MSR ( $\Delta MSR$ ) changes from the 10<sup>th</sup> day to the 30<sup>th</sup> day as compared to the 10<sup>th</sup> day were calculated.

Statistical data processing was done using the Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA, serial number AXXR712D-833214FAN5) application. Descriptive statistics are presented as median and interquartile range – Me [Q1; Q3]. The criteria of Mann–Whitney and Kruskal–Wallis were used for the estimation of intergroup differences, binary logistic regression and ROC-analysis were used for development of the predicting criteria.

## Results and their discussion

On the 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day of disease essential differences of serum concentration of melatonin, plasma concentration of serotonin and their correlation among the patients with CIHS depending on the age and sex were not revealed.

Distribution of patients with CIHS depending on the mRS index on the 90<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> day of disease is revealed in the *Table 1*.

As the primary endpoints, the cases of moderate and profound disability on the 90<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> day of the disease according to the indexes of mRS  $\geq 3$  points were registered respectively in 14 (18.2 %) and 12 (15.6 %) patients.

Using the comparative ROC-analysis we defined that the most informative parameters for prediction of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 90<sup>th</sup> day of CIHS are the following (in decreasing order of predictive value): the level of MSR on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.81,  $p < 0.05$ ), the serotonin plasma level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.69,  $p < 0.05$ ), dynamics of MSR level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.67  $p < 0.05$ ), the serotonin plasma level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.65,  $p < 0.05$ ) and dynamics of serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.64,  $p < 0.05$ ) (Table 2).

In accordance with the data from the table 2, the most informative parameters for prediction of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 180<sup>th</sup> day are also MSR level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.78,  $p < 0.05$ ), the serotonin plasma level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.74,  $p < 0.05$ ), dynamics of serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.67,  $p < 0.05$ ), dynamics of the serotonin plasma level on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.67,  $p < 0.05$ ), dynamics of MSR on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.66,  $p < 0.05$ ) and the serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day (AUC = 0.66,  $p < 0.05$ ).

On the basis of ROC-analysis the definitions of above mentioned indexes for prediction of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 90<sup>th</sup> day (Table 3) and on the 180<sup>th</sup> day of CIHS (Table 4) with the optimal correlation of sensitivity and specificity were determined.

It was defined that prognostic criterion of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 180<sup>th</sup> day of CIHS were: MSR level on the 30<sup>th</sup> day  $>212.0$ , MSR dynamics on the 10<sup>th</sup>–30<sup>th</sup> day  $>1.019$ , the serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day  $\leq 29.1$  pg/ml and dynamics of serum concentration of melatonin on the 10<sup>th</sup>–30<sup>th</sup> day  $\leq 0.382$ , whereas the level of serotonin in blood plasma on the 30<sup>th</sup> day is  $>0.15$  mcml/l and its dynamics on the 10<sup>th</sup>–30<sup>th</sup> day  $\geq -0.318$  were associated with the mRS  $\leq 2$  points on the 180<sup>th</sup> day of disease.

So, decreasing of serum concentration of melatonin on the 30<sup>th</sup> day or its increasing no more than 38.2 % from the level on the 10<sup>th</sup> day of disease are prognostically unfavorable for the functional outcome during early recovery period of CIHS. It allows considering mentioned options of melatonin dynamics as the markers of insufficiency in the system of endogenous antioxidant protection. At the same time it is the base for more intensive neurometabolic and antioxidant therapy among the patient of such a group.

Moreover, decreasing of serotonin level in blood plasma on the 30<sup>th</sup> day more than 31.8 from its level on the 10<sup>th</sup> day of the disease is also prognostically unfavorable factor. The availability of correlation interaction between plasma serotonin concentration and its level in brain was proved earlier by T. Audhya with co-authors [9]. Received data is also coordinated with the results of I. V. Shilonosova's investigation (2012), where inverse correlation between the content of humoral serotonin on the 16<sup>th</sup>–24<sup>th</sup> day of CIHS and the level of neurological deficit was defined [1]. Taking into consideration the ability of serotonin to play the role of angiogenesis inductor [4] and revealed by us interconnection between its concentration in blood and forecast of CIHS treatment, we can affirm about

**Table 1.** Distribution of patients with CIHS depending on the mRS index on the 90<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> day of disease

mRS score	the 90 <sup>th</sup> day, n (%)	the 180 <sup>th</sup> day, n (%)
0	13 (16.9 %)	21 (27.3 %)
1	21 (27.3 %)	20 (26.0 %)
2	29 (37.7 %)	24 (31.2 %)
3	13 (16.8 %)	11 (14.2 %)
4	1 (1.3 %)	1 (1.3 %)

**Table 2.** Comparative analysis of informational content as for melatonin and serotonin levels, MSR on the 10<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day of CIHS for prediction of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 90<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> day of disease on the basis of calculations of Area Under the Curve index (AUC)

Options	End point, AUC	
	mRS $\geq 3$ the 90 <sup>th</sup> day	mRS $\geq 3$ the 180 <sup>th</sup> day
The serotonin plasma level on the 10 <sup>th</sup> day, mcml/l	0.41	0.42
The melatonin serum level on the 10 <sup>th</sup> day, pg/ml	0.53	0.54
MSR level on the 10 <sup>th</sup> day	0.54	0.55
The serotonin plasma level on the 30 <sup>th</sup> day, mcml/l	0.69*	0.74*
The melatonin serum level on the 30 <sup>th</sup> day, pg/ml	0.45	0.66*
MSR level on the 30 <sup>th</sup> day	0.81*	0.78*
$\Delta$ SE	0.65*	0.67*
$\Delta$ ME	0.64*	0.67*
$\Delta$ MSR	0.67*	0.66*

mRS: modified Rankin Scale score; \*: significance of differences with the value of AUC = 0.5;  $p < 0.05$ .

**Table 3.** Criteria for prediction of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 90<sup>th</sup> day of CIHS

Criterion	Sensitivity	Specificity
MSR level on the 30 <sup>th</sup> day of CIHS $>212.0$	100 %	75.0 %
The serotonin plasma level on the 30 <sup>th</sup> day $\leq 0.15$ mcml/l	50.0 %	86.4 %
$\Delta$ MSR $> 0.658$	66.7 %	72.1 %
$\Delta$ SE $\geq -0.318$	50.0 %	83.7 %
$\Delta$ ME $\leq 0.513$	100 %	45.2 %

**Table 4.** Criteria for prediction of moderate and severe disability for mRS  $\geq 3$  points on the 180<sup>th</sup> day of CIHS

Criterion	Sensitivity	Specificity
MSR level on the 30 <sup>th</sup> day of CIHS $> 212.0$	100 %	73.3 %
The serotonin plasma level on the 30 <sup>th</sup> day $\leq 0.15$ mcml/l	60.0 %	86.7 %
$\Delta$ SE $\geq -0.318$	60.0 %	84.1 %
$\Delta$ ME $\leq 0.382$	100 %	48.4 %
$\Delta$ MSR $> 1.019$	60.0 %	79.5 %
The melatonin serum level on the 30 <sup>th</sup> day $\leq 29.1$ pg/ml	60.0 %	79.7 %

the pathogenetic significance of serotonin in the realization of sanogenesis mechanisms during early recovery period of CIHS.

Among the studied indexes the highest information value for prognosis of functional outcome of early recovery period of CIHS as for the results of this research was set for the ratio of melatonin and serotonin on the 30<sup>th</sup> day of disease (AUC = 0.81 against 0.45 и 0.69 for melatonin and serotonin respectively). It defines the practical usage of mentioned criterion as surrogate marker of objectification of interconnection of melatonin and its metabolic precursor – serotonin among the patients with CIHS as

for prognosis of outcome during the early recovery period of disease.

## Conclusions

Conducted investigation allows us to draw out the following conclusions:

1. The level of MSR >212.0 on the 30<sup>th</sup> day of CIHS is the predictor of moderate and profound disability for modified Rankin's scale  $\geq 3$  points on the 90<sup>th</sup> (AUC = 0.81,  $p < 0.05$ ; sensitivity = 100.0 %, specificity = 75.0 %) and on the 180<sup>th</sup> day of disease (AUC = 0.78,  $p < 0.05$ ; sensitivity = 100.0 %, specificity = 73.3 %).

2. The serotonin plasma level  $\leq 0.15$  mcmol/l on the 30<sup>th</sup> day of CIHS is the predictor of moderate and profound disability for modified Rankin's scale  $\geq 3$  points on the 180<sup>th</sup> day of disease (AUC = 0.74,  $p < 0.05$ ; sensitivity = 60.0 %, specificity = 86.7 %).

**Perspective for further scientific investigations** is the development of differential approach for arranging treatment and rehabilitation in patients with CIHS, taking into account the individual prognosis of outcome on the early recovery period of disease, based on the identification of the serum concentration of melatonin and the serotonin plasma level.

## References

- [1] Shilonosova, I. V. (2012) Serotonintransportnaya sistema v ostreishem periode tyazhologo aterotromboticheskogo ishemicheskogo insulta [Serotonin a transport system in an acute period if a serious atherothrombotic ischemic stroke]. *Vrach-aspirant*, 51(2.2), 335–339. [in Russian].
- [2] Reuter, B., Gumbinger, C., Sauer, T., Wiethölter, H., Bruder, I., Diehm, C., et al. (2016) Access, timing and frequency of very early stroke rehabilitation - insights from the Baden-Wuerttemberg stroke registry. *BMC Neurol*, 16, 222. doi: 10.1186/s12883-016-0744-7.
- [3] Wu, L., Wang, A., Wang, X., Zhao, X., Wang, C., Liu, L., et al. (2015) Factors for short-term outcomes in patients with a minor stroke: results from China National Stroke Registry. *BMC Neurol*, 15, 253. doi: 10.1186/s12883-015-0505-z.
- [4] Qin, L., Zhao, D., Xu, J., Ren, X., Terwilliger, E. F., Parangi, S., et al. (2013). The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR3/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1. *Blood*, 121(11), 2154–2164. doi: 10.1182/blood-2012-07-443903.
- [5] Juan, W. S., Huang, S. Y., Chang, C. C., Hung, Y. C., Lin, Y. W., Chen, T. Y., et al. (2014) Melatonin improves neuroplasticity by upregulating the growth-associated protein-43 (GAP-43) and NMDAR postsynaptic density-95 (PSD-95) proteins in cultured neurons exposed to glutamate excitotoxicity and in rats subjected to transient focal cerebral ischemia even during a long-term recovery period. *J Pineal Res*, 56(2), 213–223. doi: 10.1111/jpi.12114.
- [6] Chumboatong, W., Thummayot, S., Govitrapong, P., Tocharus, C., Jittiwat, J., & Tocharus, J. (2017) Neuroprotection of agomelatine against cerebral ischemia/reperfusion injury through an antiapoptotic pathway in rat. *Neurochem Int*, 102, 114–122. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.011.
- [7] Parada, E., Buendia, I., León, R., Negredo, P., Romero, A., Cuadrado, A., et al. (2014) Neuroprotective effect of melatonin against ischemia is partially mediated by alpha-7 nicotinic receptor modulation and HO-1 overexpression. *J Pineal Res*, 56(2), 204–212. doi: 10.1111/jpi.12113.
- [8] Sangha, R. S., Caprio, F. Z., Askew, R., Corado, C., Bernstein, R., Curran, Y., et al. (2015) Quality of life in patients with TIA and minor ischemic stroke. *Neurology*, 85(22), 1957–63. doi: 10.1212/WNL.0000000000002164.
- [9] Audhya, T., Adams, J. B., & Johansen, L. (2012) Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine. *Biochim Biophys Acta*, 820(10), 1496–501. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.05.012.
- [10] Paterniti, I., Cordaro, M., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2016) The antioxidative property of melatonin against brain ischemia. *Expert Rev Neurother*, 2016, 16(7), 841–848. doi: 10.1080/14737175.2016.1182020.

## Information about author:

Medvedkova S. O., MD, PhD, Associate Professor, Department of Nervous Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Відомості про автора:

Медведкова С. О., канд. мед. наук, доцент каф. нервових хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Сведения об авторе:

Медведкова С. А., канд. мед. наук, доцент каф. нервных болезней, Запорозжский государственный медицинский университет, Украина.

## Конфлікт інтересів: відсутній.

**Conflicts of Interest:** author has no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 13.02.2017

Після доопрацювання / Revised: 30.03.2017

Прийнято до друку / Accepted: 03.04.2017

## Експресія матричних металопротеїназ у дифузних гліомах: діагностична роль

Т. В. Шинкаренко

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро

Дифузні гліоми – злоякісні пухлини з високою інвазивністю, що забезпечується синтезом протеаз, зокрема матричних металопротеїназ (ММР). Експресія металопротеїназ неодноразово фіксувалася в різних формах дифузних гліом, однак значення особливостей експресії в диференціальній діагностиці потребує додаткових досліджень.

**Мета роботи** – визначити діагностичну роль особливостей експресії ММР-3 та ММР-9 у дифузних гліомах головного мозку різного гістологічного типу та ступеня злоякісності.

**Матеріали та методи.** Здійснили гістологічне та імуногістохімічне дослідження 52 дифузних гліом астроцитарного та олигодендрогліального типу з Grade (ступенем злоякісності) II–IV. Середній вік пацієнтів становив 43,13 року (від 22 до 73 років), співвідношення чоловіків і жінок – 1,08:1.

**Результати.** У дифузних гліомах інтенсивність експресії ММР-3 та ММР-9 і локалізація накопичених відповідних протеїнів були подібними (інтенсивність експресії збігалась у 76,9 % новоутворень). Для ММР була характерна переважно цитоплазматична реакція в пухлинних клітинах, а також ендотелію судин. Виражена (++) експресія ММР-3 – характерна для 80,8 % гліобластом (Grade IV за ВООЗ), 57,1 % пухлин, що належать до Grade III, та тільки для 14,3 % дифузних астроцитом та олигодендрогліом ( $p < 0,01$ ). Частка гліобластом із вираженою експресією ММР-9 сягала 75 %, у дифузних гліомах Grade II–III подібну інтенсивність експресії ММР-9 реєстрували у 42,9 % і 37,7 % пухлин відповідно ( $p < 0,05$ ). У астроцитарних пухлинах виражена експресія ММР спостерігалася частіше, ніж в олигодендрогліальних, але статистично значущої відмінності не зафіксовано ( $p > 0,05$ ). Інтенсивність експресії ММР залежала від проліферативної активності пухлини та віку пацієнта ( $p < 0,05$ ). Порівнюючи експресію ММР серед жінок і чоловіків, не виявили статистично вагомої різниці.

**Висновки.** Експресія ММР-3 та ММР-9 є подібною за інтенсивністю та локалізацією накопичених протеїнів у дифузних гліомах головного мозку. Інтенсивність експресії ММР залежить від ступеня злоякісності дифузних гліальних пухлин і Grade-залежних показників, що може використовуватись у диференціальній діагностиці.

**Ключові слова:**  
дифузна гліома, імуногістохімія, діагностика, ММР-3, ММР-9.

**Патологія.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 167–171

**DOI:**  
10.14739/2310-1237.2017.2.109293

**E-mail:**  
Timash3061990@gmail.com

## Експрессия матричных металлопротеиназ в диффузных глиомах: диагностическая роль

Т. В. Шинкаренко

Диффузные глиомы – злокачественные опухоли с высокой инвазивностью, которая обеспечивается синтезом протеаз, в частности матричных металлопротеиназ (ММР). Экспрессия металлопротеиназ неоднократно фиксировалась в различных формах диффузных глиом, однако значение особенностей экспрессии в дифференциальной диагностике глиальных опухолей требует дополнительных исследований.

**Цель работы** – определить диагностическую роль особенностей экспрессии ММР-3 и ММР-9 в диффузных глиомах головного мозга различного гистологического типа и степени злокачественности.

**Материалы и методы.** Осуществлено гистологическое и иммуногистохимическое исследования 52 образцов диффузных глиом астроцитарного и олигодендроглиального типа с Grade (степенью злокачественности) II–IV. Средний возраст пациентов составил 43,13 года (от 22 до 73 лет), соотношение мужчин и женщин – 1,08:1.

**Результаты.** В диффузных глиомах интенсивность экспрессии ММР-3 и ММР-9 и локализация накопленных белков были подобны (уровень экспрессии совпадает в 76,9 % новообразований). Для ММР была характерна преимущественно цитоплазматическая реакция в опухолевых клетках, а также эндотелии сосудов. Выраженная (++) экспрессия ММР-3 была характерна для 80,8 % глиобластом (Grade IV по ВОЗ), 57,1 % опухолей, отнесенных к Grade III, и только для 14,3 % диффузных астроцитом и олигодендроглиом ( $p < 0,01$ ). Доля глиобластом с выраженной экспрессией ММР-9 достигала 75 %, в диффузных глиомах Grade II–III подобный уровень экспрессии ММР-9 регистрировали в 42,9 % и 37,7 % опухолей соответственно ( $p < 0,05$ ). В астроцитарных опухолях выраженная экспрессия ММР наблюдалась чаще, чем в олигодендроглиальных, однако статистически значимого различия не зафиксировано ( $p > 0,05$ ). Интенсивность экспрессии ММР зависела от пролиферативной активности опухоли и возраста пациента ( $p < 0,05$ ). При сравнении экспрессии ММР среди женщин и мужчин статистически значимой разницы выявлено не было.

**Выводы.** Экспрессия ММР-3 и ММР-9 подобны по интенсивности и локализации накопленных белков в диффузных глиомах головного мозга. Интенсивность экспрессии ММР зависит от степени злокачественности диффузных глиальных опухолей и Grade-зависимых показателей, что может быть использовано в дифференциальной диагностике.

**Ключевые слова:**  
опухоль  
головного мозга,  
иммуногистохимия,  
диагностика,  
ММР-3, ММР-9.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 167–171

## Expression of matrix metalloproteinases in diffuse gliomas: diagnostic value

T. V. Shynkarenko

Diffuse gliomas are malignant tumors with high invasiveness, last is provided by the synthesis of proteases, in particular matrix metalloproteinases (MMPs). Expression of metalloproteinases has been repeatedly documented in different forms of diffuse gliomas, but the differential diagnostic possibilities of its usage need additional research.

**Key words:**  
diffuse glioma,  
immunohistochemistry,  
diagnostic tests,  
MMP-3, MMP-9.

**The aim of the work** was to determine the diagnostic role of MMP-3 and MMP-9 expression in brain diffuse gliomas of different histological types and malignancy grades.

**Materials and methods.** Histological and immunohistochemical examination of diffuse astrocytic and oligodendroglial gliomas (Grade II-IV) was performed (52 samples). The average age of the patients was 43.13 years (age range was 22–73 years), the male: female ratio was 1.08:1.

**Results.** The intensity of MMP-3 and MMP-9 expression and localization of preserved proteins are similar in diffuse gliomas (however, expression levels coincide in 76.9 % of tumors). Predominantly cytoplasmic expression is showed by tumor cells, as well as vascular endothelium. The high level (++) expression of MMP-3 is characteristic for 80.8 % glioblastomas (Grade IV WHO), 57.1 % of the Grade III tumors, and only among 14.3 % of diffuse astrocytes and oligodendroglomas ( $p < 0.01$ ). The proportion of glioblastomas with high level expression of MMP-9 reaches 75 %; the similar expression level of MMP-9 is recorded in Grade II-III diffuse gliomas (in 42.9 % and 37.7 % of tumors, respectively),  $p < 0.05$ . The high level expression of MMPs is more frequent in astrocytic tumors than in oligodendroglomas, but statistically significant difference is not observed ( $p > 0.05$ ). Expression of MMPs depended on proliferative tumor activity and patient's age ( $p < 0.05$ ). There was no statistically significant difference between MMPs expression in women and men.

**Conclusions.** The expression of MMP-3 and -9 is similar by pattern and intensity in diffuse gliomas of the brain. The intensity of MMPs expression depends on the malignancy grade and Grade-dependent features of diffuse glial tumors.

Дифузні гліоми головного мозку – злоякісні пухлини астроцитарного та олігодендрогліального типів II–IV ступенів злоякісності (Grade) за ВООЗ – характеризуються поширенням неопластичних клітин уздовж пучків білої речовини, судин, а також під мозковими оболонками [1,2], що унеможлиблює тотальне хірургічне видалення пухлини, а отже зумовлює високий ризик рецидивів і суттєво впливає на прогноз захворювання.

Відомо, що інвазивні властивості забезпечуються численними механізмами, серед них найдослідженишим є руйнування навколишнього клітинного матриксу (НКМ) [3,4]. НКМ – складна мережа, що побудована з колагенів, протеогліканів, фібронектину, ламініну тощо; виконує функцію бар'єра на шляху переміщення неопластично трансформованих клітин. Протеоліз НКМ відбувається під впливом ферментів, що належать здебільшого до родини матриксних металопротеїназ (ММР), серинових, цистеїнових та аспартатових протеїназ, надмірний синтез яких зафіксований у великій кількості солідних новоутворень [5].

ММР представлені 23 ферментами (ММР 1–23), що розділені на шість груп за особливостями будови та специфічністю до субстратів: колагенази, желатинази, стромелізини, матрілізини, ММР мембранного типу та інші (некласифіковані). Експресія ММР визначається в пухлинних клітинах, фіброблестах, ендотеліоцитах, нейтрофілах; ММР забезпечують деградацію структурних протеїнів НКМ, а також регулюють проліферацію, апоптоз, ангіогенез та імунну відповідь унаслідок протеоліза рецепторів, факторів росту та адгезії [6]. Регуляція активності ММР відбувається шляхом змін експресії відповідних генів, активації неактивних форм ферментів у НКМ і блокування активних ММР тканинними інгібіторами металопротеїназ (ТІМР) чи неспецифічними інгібіторами протеаз (альфа-2 макроглобуліни) [7]. Визначення особливостей експресії ММР може стати основою для розробки та призначення специфічної таргетної терапії [8].

У дифузних гліомах визначається надмірна експресія переважно ММР-2, ММР-9 і деяких інших, неодноразово вказувалось на збільшення інтенсивності експресії ММР у високозлоякісних астроцитомах (Grade III–IV) [9–11], але частина дослідників не знайшли

статистичної значущості відмінностей експресії ММР у пухлинах різного ступеня злоякісності [12]. Також невизначеним залишилось співвідношення експресії ММР пухлинами астроцитарного та олігодендрогліального типів.

## Мета роботи

Визначити діагностичну роль особливостей експресії ММР-3 та ММР-9 у дифузних гліомах головного мозку різного гістологічного типу та ступеня злоякісності.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідили 52 дифузні гліоми пацієнтів, які лікувались у нейрохірургічному відділенні Дніпропетровської обласної клінічної лікарні імені І. І. Мечникова протягом 2010–2017 рр. Пацієнти не отримували хіміо- чи радіотерапії до операції. Гістологічний діагноз встановлений згідно з сучасними гістологічними та імуногістохімічними критеріями [2]. У дослідження включені 7 дифузних астроцитом (Grade II), 9 анапластичних астроцитом (Grade III), 24 гліобластоми (Grade IV), 7 олігодендрогліом (Grade II), 5 анапластичних олігодендрогліом (Grade III). Середній вік пацієнтів становив  $43,12 \pm 11,20$  року. Співвідношення чоловіків і жінок – 1,08:1.

*Імуногістохімічний метод.* Імуногістохімічне дослідження здійснили згідно з протоколами компанії Termo Scientific (TS), (США): для визначення експресії ММР-3 (клон SL-1 ID3, р. 1:200 (TS,США)), ММР-9 (клон Ab-1 GE-213, р. 1:200 (TS,США)) та Ki-67 (клон sp6, р. 1:400 (TS, США)) у зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США). Експресію ММР визначали за локалізацією накопиченого білка у структурах пухлин (пухлинні клітини, судини, вогнища некрозу, кальцифікати), а також напівкількісно за рівнем накопичення у структурах неоплазії («-» – відсутнє, «+/-» – слабке, «+» – помірне, «+ /++» – виражене, «+++» – максимальне накопичення) та інтенсивністю експресії: «+» (10–40 % площі ділянки зрізу з найбільшою інтенсивністю експресії), «+++» (коричневий колір займає >40 % площі «гарячої ділянки»). Площа



коричневого кольору визначалася шляхом послідовних деконволюції, бінаризації, гістограми кольорів (ImageJ). Індекс проліферації (ІП) визначали за методикою, що описана раніше [13,14], як середнє значення співвідношення кількості Ki-67-імунореактивних ядер до загальної кількості пухлинних ядер у фотографіях зон новоутворення з найбільшим скупченням клітин, що проліферують.

Статистичний аналіз здійснили за допомогою програмного забезпечення DoctorStat (версія 1.9). Дані представлені у вигляді  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє арифметичне значення,  $m$  – стандартна похибка середнього. Статистичну значущість відмінності результатів у групах досліджуваних пухлин перевірено за допомогою точного тесту Фішера (2xN). Значення  $p < 0,05$  прийнято статистично значущим [15].

## Результати та їх обговорення

Індекс проліферації пухлинних клітин у дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлинах головного мозку коливався від 0,9 до 32,6 %, середнє значення –  $15,4 \pm 10,3$  %. Найвищі значення ІП зареєстровані у гліобlastомах ( $18,8 \pm 8,4$  %), найнижчі – у пухлинах, що належать до Grade II, –  $3,6 \pm 2,1$  %. Анапластичні гліоми (Grade III) характеризувалися високими значеннями ІП, але поступалися гліобlastомам ( $14,2 \pm 9,1$ ). ІП  $< 10$  % був властивий 21 пухлині (40,4 %).

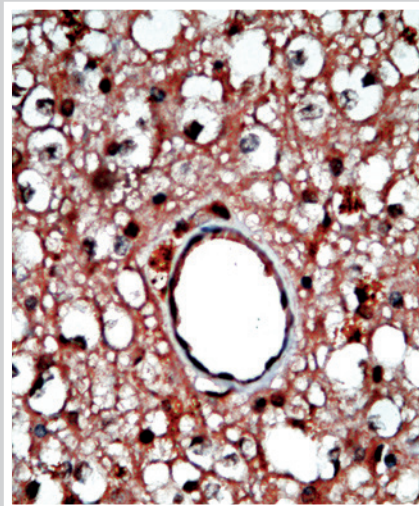
Локалізація MMP-3 і MMP-9 у дифузних гліомах була дуже подібною (табл. 1). Максимальна експресія MMP-3 та MMP-9 визначалася в ендотеліальних клітинах судин гліом (++) , які різко виділялися в оточенні негативних перичитів і сполучної тканини – особливо у великих судинах (рис. 1,2). Також максимальний рівень експресії був властивий перинуклеарній зоні пухлинних клітин, тоді як відростки формували слабопозитивний фон, а невиражену інтрануклеарну реакцію реєстрували рідко. Менш інтенсивна експресія визначалася в пухлинних клітинах із багатьма ядрами або у стані мітозу. Більш інтенсивна експресія MMP спостерігалася на периферії пухлини та периваскулярно. У навколосудинній зоні пухлин виявлялись поодинокі імунореактивні нейтрофіли та макрофаги. Потрібно відзначити інтенсивне накопичення MMP (++) у зовнішніх шарах кальцифікатів при менш позитивному центрі обвапнування. Ділянки некрозу показали несуттєве накопичення MMP, що вказувало на незначну роль, яку вони відіграють у резорбції некротизованої тканини гліом. У реактивних астроцитах у перифокальній зоні олігодендрогліом спостерігалася значна перинуклеарна експресія MMP-3 (++) , дещо інтенсивніша за експресію MMP-9 (+). Протилежне співвідношення зафіксоване в геміоцитах.

Інтенсивність експресії MMP-3 та MMP-9 (табл. 2). Виражена експресія MMP статистично вірогідно частіше фіксувалася у пухлинах більш літніх пацієнтів ( $> 50$  років), а також у пухлинах, для яких була властива інтенсивна проліферація пухлинних клітин (ІП  $> 10$ ),  $p < 0,01$ . Експресія MMP не залежала від статі пацієнтів ( $p > 0,05$ ). У астроцитарних гліомах частіше спостерігали інтенсивну експресію, ніж в олігодендрогліальних пухлинах. Однак статистичної значущості остання

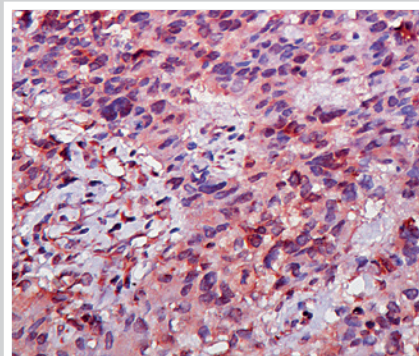
**Таблиця 1.** Локалізація та рівень накопичення MMP-3 та MMP-9 у дифузних гліомах

Локалізація	MMP-3	MMP-9
Пухлинні клітини:		
інтрануклеарно	+/-	+/-
перинуклеарно	+/++	+/++
відростки	+/-	+
Ендотелій судин	++	++
Сполучна тканина судин	-	-
Реактивні астроцити (периферія пухлини)	++	+
Некротизована тканина	+	+
Багатоядерні клітини	+/-	+/-
Клітини з фігурами мітозу	+/-	+/-
Геміоцити	+/++	++
Кальцифікати	++	++

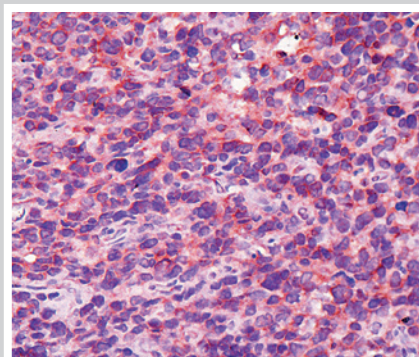
-: відсутнє; +/-: слабке; +: помірне; +/++: виражене; ++: максимальне накопичення.



**Рис. 1.** Олігодендрогліома (Grade II). Виражена експресія MMP-9 ендотелієм судин. ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. 36.  $\times 1000$ .



**Рис. 2.** Гліобlastома (Grade IV). Експресія MMP-9 ендотелієм гломерулоїдних судин. ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. 36.  $\times 400$ .



**Рис. 3.** Гліобlastома (Grade IV). Інтенсивна (++) експресія MMP-9 пухлинними клітинами (переважно перинуклеарна реакція). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. 36.  $\times 400$ .

**Таблиця 2.** Взаємозв'язок між експресією MMP і клініко-морфологічними характеристиками дифузних гліом головного мозку (n, %, p)

	n	MMP-3		p	MMP-9		p
		+	++		+	++	
Стать							
Чоловіча	27	12 44,4 %	15 55,6 %	0,781	10 37,0 %	17 63,0 %	0,403
Жіноча	25	13 52,0 %	12 48,0 %		13 52,0 %	12 48,0 %	
Вік							
<50	31	19 61,3 %	12 38,7 %	0,026*	18 58,1 %	13 41,9 %	0,023*
>50	21	6 28,6 %	15 71,4 %		5 23,8 %	16 76,2 %	
ІП							
<10	21	16 76,2 %	5 23,8 %	0,002*	15 71,4 %	6 28,6 %	0,002*
>10	31	9 29,0 %	22 71,0 %		8 25,8 %	23 74,2 %	
Тип пухлини							
астроцитарний	40	15 37,5 %	23 57,5 %	0,06	16 66,7 %	24 60,0 %	0,32
олігодендрогліальний	12	10 83,3 %	4 16,7 %		7 58,3 %	5 41,7 %	
Grade пухлини							
Grade II	14	12 85,7 %	2 14,3 %	0,003*	8 57,1 %	6 42,9 %	0,037*
Grade III	14	6 42,9 %	8 57,1 %		9 64,3 %	5 37,7 %	
Grade IV	24	7 29,2 %	17 80,8 %		6 25,0 %	18 75,0 %	
Усього	52	25	27		23	29	

\*: відмінність статистично значуща при  $p < 0,05$ .

залежність не мала ( $p > 0,05$ ). Пухлинним клітинам дифузних астроцитом та олігодендрогліом (Grade II) була властива неінтенсивна експресія MMP-9 (рис. 1), в анапластичних астроцитомах та анапластичних олігодендрогліомах (Grade III) визначалась тенденція до інтенсивної експресії пухлинними клітинами MMP, а гліобластоми (рис. 2, 3) характеризувались здебільшого вираженою експресією MMP (++) . Інтенсивніша експресія MMP властива злякнішим дифузним гліомам (MMP-3  $p < 0,01$ ; MMP-9  $p < 0,05$ ). Виявлений значний прямий взаємозв'язок між експресією MMP-3 та MMP-9 у дифузних гліомах головного мозку ( $p < 0,001$ ) (табл. 2). Статистично вірогідної відмінності показників експресії MMP у пухлинах астроцитарного та олігодендрогліального типів не зафіксували, але виявили суттєво вищі значення інтенсивності експресії MMP-3 та MMP-9 у астроцитарних пухлинах (табл. 2).

Дослідження інших авторів продемонстрували чималий вплив різноманітних генетичних та антигенних властивостей на ступінь злякнісності та прогноз дифузних гліом. Особлива увага приділяється експресії MMP-2 та MMP-9, що пояснюється їхнім внеском у переміщення неопластичних клітин у НКМ головного мозку [4,8]. V. Thoms et al. (2003), як і ми, спостерігали концентрування MMP периваскулярно, а також у перифокальних зонах пухлин [11]. Локалізація MMP у пухлинних клітинах і в ендотелії судин пояснюється їхнім підвищеним інтрацелюлярним синтезом із наступним виділенням у навколишню клітинний простір [4,6].

Як встановлено нами раніше, ІП і вік хворих є Grade-залежними факторами [12], що пояснює їхній взаємозв'язок з інтенсивністю експресії MMP. Q. Хуе (2017) у клітинній культурі гліобластоми показав, що надлишкова експресія MMP-9 стимулює клітинну проліферацію [10] і може бути одним із механізмів пухлинної прогресії.

## Висновки

1. У дифузних гліомах визначається однакове за локалізацією накопичення MMP-3 та MMP-9, а для 76,9 % дифузних гліом характерна також подібна інтенсивність експресії MMP-3 та MMP-9. Виражена (++) експресія MMP-3 характерна для 80,8 % гліобластом (Grade IV за ВООЗ), для 57,1 % анапластичних гліом (Grade III) та для 14,3 % дифузних астроцитом та олігодендрогліом ( $p < 0,01$ ).

2. Виражена експресія MMP-9 спостерігається у 75 % гліобластом, а також реєструється у 42,9 % дифузних гліом Grade II та у 37,7 % анапластичних гліальних пухлин Grade III ( $p < 0,05$ ).

3. У астроцитарних пухлинах виражена експресія MMP спостерігається частіше, ніж в олігодендрогліальних, але статистично значущої відмінності не зафіксували ( $p > 0,05$ ).

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні діагностичної та прогностичної ролі інших клініко-морфологічних та ІГХ характеристик дифузних гліом головного мозку.

**Фінансування.** Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Розробка діагностичних і прогностичних критеріїв новоутворень різних локалізацій з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу» (номер держреєстрації 0116U002827), 2016–2018.

**Funding.** The research was carried out within the scientific-research work “Development of diagnostic and prognostic criteria for neoplasms of different localizations with considering biological indices of tumor process activity” (State registration number 0116U002827), 2016–2018.

## Список літератури

- [1] Claes A. Diffuse glioma growth: a guerilla war / A. Claes, A.J. Idema, P. Wesseling // Acta neuropathologica. – 2007. – Т. 114. – №5. – С. 443–458.
- [2] WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / W.K. Cavenee, S.Y. Leung, C. Hawkins et al. – Lyon: IARC, 2016. – 408 pp.
- [3] Mechanisms regulating glioma invasion / I. Paw, R.C. Carpenter, K. Watabe et al. // Cancer letters. – 2015. – Т. 362. – №1. – С. 1–7.
- [4] Turner S.G. Mechanisms of Glioma Cell Invasion / S.G. Turner, M. Ahmad, S.A. Toms // Neurooncology-Newer Developments. – InTech, 2016.
- [5] Mawrin C. Glioma and Extracellular Matrix / C. Mawrin, C. Seidenbecher // Glioma Cell Biology. – Springer Vienna, 2014. – С. 271–292.
- [6] Sternlicht M.D. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior / M.D. Sternlicht, Z. Werb // Annual review of cell and developmental biology. – 2001. – Т. 17. – №1. – С. 463–516.
- [7] Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo / J. Gaffney, I. Solomonov, E. Zehorai, I. Sagi // Matrix Biology. – 2015. – Т. 44. – С. 191–199.
- [8] Jabłońska-Trypuc A. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs / A. Jabłońska-Trypuc, M. Matejczyk, S. Rosochacki // Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. – 2016. – Т. 31. – №1. – С. 177–183.

- [9] The clinical utility of matrix metalloproteinase 9 in evaluating pathological grade and prognosis of glioma patients: a meta-analysis / X. Yang, S. Lv, Y. Liu et al. // *Molecular neurobiology*. – 2015. – Т. 52. – №1. – С. 38–44.
- [10] High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates / Q. Xue, L. Cao, X.Y. Chen et al. // *Oncology Letters*. – 2017. – Т. 13. – №3. – С. 1325–1330.
- [11] Thorns V. Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas / V. Thorns, G.F. Walter, C. Thorns // *Anticancer research*. – 2003. – Т. 23. – №5A. – P. 3937–3944.
- [12] Matrix metalloproteinase-2 and-9 expression in astrocytic tumors / K. Kunishio, M. Okada, Y. Matsumoto et al. // *Brain tumor pathology*. – 2003. – Т. 20. – №2. – С. 39–45.
- [13] Пославська О.В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців / О.В. Пославська // *Morphologia*. – 2015. – Т. 9. – №3. – С. 122–126.
- [14] Шпонька І.С. Характеристика та аналіз KI-67-імунореактивності в астроцитоммах головного мозку / І.С. Шпонька, Т.В. Шинкаренко, О.В. Пославська // *Морфологія*. – 2016. – Т. 10. – №1. – С. 96–101.
- [15] Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. – К., 2006. – 558 с.

## References

- [1] Claes, A., Idema, A. J., & Wesseling, P. (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta neuropathologica*, 114(5), 443–458. doi: 10.1007/s00401-007-0293-7.
- [2] Cavenee, W. K., Leung, S. Y., Hawkins, C., Van Meir, E. G., Burger, P. C., & Tabori, U. (2016). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised*. Lyon: IARC.
- [3] Paw, I., Carpenter, R. C., Watabe, K., Debinski, W., & Lo, H. W. (2015). Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer letters*, 362(1), 1–7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.015.
- [4] Turner, S. G., Ahmad, M., & Toms, S. A. (2016). Mechanisms of Glioma Cell Invasion. *Neurooncology-Newer Developments*. InTech. doi: 10.5772/63126.
- [5] Mawrin, C., & Seidenbecher, C. (2014). Glioma and Extracellular Matrix. *Glioma Cell Biology*, (pp. 271–292). Springer Vienna. doi: 10.1007/978-3-7091-1431-5\_10.
- [6] Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1), 463–516. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.
- [7] Gaffney, J., Solomonov, I., Zehorai, E., & Sagi, I. (2015). Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biology*, 44, 191–199. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.012.
- [8] Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(sup1), 177–183. doi: 10.3109/14756366.2016.1161620.
- [9] Yang, X., Lv, S., Liu, Y., Li, D., Shi, R., Tang, Z., et al. (2015). The clinical utility of matrix metalloproteinase 9 in evaluating pathological grade and prognosis of glioma patients: a meta-analysis. *Molecular neurobiology*, 52(1), 38–44. doi: 10.1007/s12035-014-8850-2.
- [10] Xue, Q., Cao, L., Chen, X. Y., Zhao, J., Gao, L., Li, S. Z., & Fei, Z. (2017). High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates. *Oncology Letters*, 13(3), 1325–1330. doi: 10.3892/ol.2017.5567.
- [11] Thorns, V., Walter, G. F., & Thorns, C. (2003). Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Anticancer research*, 23(5A), 3937–3944.
- [12] Kunishio, K., Okada, M., Matsumoto, Y., & Nagao, S. (2003). Matrix metalloproteinase-2 and-9 expression in astrocytic tumors. *Brain tumor pathology*, 20(2), 39–45. doi: 10.1007/s10014-003-0140-9.
- [13] Poslavska, O. V. (2015) Metodolohiia vykorystannia prohhrmnoho zabezpechennia dlia analizu tsyfrovyykh mikrofotohrafii na bazi kursu patomorfologii z metoiu pidvyshhennia profesijnoho rinvnia studentiv i naukovtsiv [Methodology for the use of software for the analysis of digital micrographs on the base of pathomorphology course in order to increase the professional level of students and scientists]. *Morphologia*, 9(3), 122–6. [in Ukrainian].
- [14] Shpon'ka, I. S., Shynkarenko, T. V., & Poslavska, O. V. (2016) Kharakterystyka ta analiz KI-67-Imunoreaktyvnosti v astrocytomakh holovnoho mozku [Characterization and analysis of KI-67-immunoreactivity in brain astrocytoma]. *Morphologia*, 10(1), 96–101. [in Ukrainian].
- [15] Antomov, M. (2006) *Matematicheskaya obrabotka i analiz mediko-biologicheskikh dannyh* [Mathematical processing and analysis of medical and biological data] Kyiv [in Russian].

## Відомості про автора:

Шинкаренко Т. В., аспірант каф. патологічної анатомії і судової медицини, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

## Сведения об авторе:

Шинкаренко Т. В., аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днипро.

## Information about author:

Shynkarenko T. V., PhD student, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, State Establishment "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dnipro.

## Конфлікт інтересів: відсутній.

**Conflicts of Interest:** author has no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 22.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 08.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 09.06.2017

# Myocardial hypertrophy and intracardial hemodynamics in children with bicuspid aortic valve

A. V. Kamenshchuk, O. G. Ivanko

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

## Key words:

bicuspid aortic valve, children, heart hypertrophy, dopplerecho-cardiography, hemodynamics, regression analysis.

## Pathologia

2017; 14 (2), 172–176

## DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109296

## E-mail:

I0G@ukr.net

Bicuspid aortic valve is one of the most common congenital heart diseases with low manifestation in childhood and severe consequences in adults that determines the importance in early diagnostics of myocardial changes in this anomaly. According to the literature the polymorphisms in the genes of *NFATC* family could result both in impaired embryogenetic valves formation and development of postnatal myocardial hypertrophy.

**The aim of the study** was to detect the early changes of intracardial hemodynamics at aortic valve in children with bicuspid aortic valve (BAV) and establish their interrelations to the signs of myocardial hypertrophy in these children.

**Materials and methods:** Dopplerographic study of basic intracardiac hemodynamics parameters in 38 children with BAV and in 28 children of control group was conducted. The results were processed statistically by Student's t-test, correlation analysis and multiple regression.

**Results:** In the result of study the moderate concentric left ventricle myocardial hypertrophy development was detected in 62 % of children with BAV which is accompanying to significant increasing of blood flow velocity and pressure gradient at aortic valve. There were not established significant correlations between the parameters of hemodynamics at valve and left ventricle's posterior wall depth and septum depth whereas the highest inputs of these values were obtained in the left ventricle systolic dimension and volume and less in the hypertrophic signs.

**Conclusions:** In children with BAV the moderate concentric myocardial hypertrophy with significant changes of intracardial hemodynamics at aortic valve takes place with the highest inputs in left ventricle volumetric values. The obtained data serves as a substantiation for the treatment and prevention of its further development.

## Ключові слова:

двостулковий аортальний клапан, діти, гіпертрофія міокарда, доплерокардіографія, гемодинаміка, регресійний аналіз.

## Патологія. – 2017. –

Т. 14, № 2(40). –

С. 172–176

## Гіпертрофія міокарда та внутрішньосерцева гемодинаміка в дітей із двостулковим аортальним клапаном серця

A. V. Каменщик, О. Г. Іванько

Двостулковий аортальний клапан є однією з найпоширеніших вроджених вад серця, котра має малосимптомний перебіг у дитинстві та важкі прояви в дорослому віці, що визначає важливість ранньої діагностики змін у міокарді при цій аномалії. Згідно з науковими літературними даними, поліморфізми генів сімейства *NFATC* можуть впливати як на ембріогенетичний формування клапанів серця, так і на розвиток постнатальної гіпертрофії міокарда.

**Мета роботи** – визначення ранніх змін внутрішньосерцевої гемодинаміки на аортальному клапані в дітей із двостулковим клапаном серця (ДАК) і встановлення взаємозв'язків цих параметрів із показниками гіпертрофії міокарда.

**Матеріали та методи.** У 38 хворих із ДАК та у 28 умовно здорових дітей контрольної групи здійснили доплерографічне дослідження параметрів внутрішньосерцевої гемодинаміки зі статистичним опрацюванням даних за критерієм Стьюдента, методами кореляційного аналізу та множинної регресії.

**Результати.** У результаті дослідження в 62 % хворих із ДАК встановлена наявність помірної концентричної гіпертрофії міокарда, що поєднувалася зі значним підвищенням градієнта тиску та швидкості кровотоку на аортальному клапані. Водночас не встановили значущих кореляцій між параметрами гемодинаміки на клапані та товщиною задньої стінки лівого шлуночка й міжшлуночкової перетинки з наявністю найбільших внесків даних, що отримали, в систолічний об'єм і розмір лівого шлуночка та менших – у показники, що відбивають міокардальну гіпертрофію.

**Висновки.** У дітей із ДАК наявна помірна концентрична гіпертрофія міокарда лівого шлуночка, що супроводжується суттєвими змінами гемодинаміки аортального клапана з найбільшим впливом цих змін на волюметричні показники лівого шлуночка.

## Ключевые слова:

двустворчатый аортальный клапан, дети, гипертрофия миокарда, доплерокардиография, гемодинамика, регрессионный анализ.

## Патология. – 2017. –

Т. 14, № 2(40). –

С. 172–176

## Гипертрофия миокарда и внутрисердечная гемодинамика у детей с двустворчатым аортальным клапаном сердца

A. V. Каменщик, О. Г. Иванько

Двустворчатый аортальный клапан является одним из наиболее распространённых врождённых пороков сердца, имеет малосимптомное течение в детском возрасте и тяжёлые осложнения у взрослых, что определяет важность ранней диагностики изменений в миокарде при этой патологии. Согласно научным литературным данным, полиморфизмы генов семейства *NFATC* могут влиять как на эмбриогенетическое формирование клапанов сердца, так и на развитие постнатальной гипертрофии миокарда.

**Цель работы** – определение ранних изменений внутрисердечной гемодинамики на аортальном клапане у детей с двустворчатым клапаном сердца (ДАК) и выявление взаимосвязей этих параметров с показателями гипертрофии миокарда.

**Материалы и методы.** У 38 больных с ДАК и у 28 условно здоровых детей контрольной группы было проведено доплерографическое исследование параметров внутрисердечной гемодинамики с последующей статистической обработкой полученных данных при помощи критерия Стьюдента, методами корреляционного анализа и множественной регрессии.

**Результаты.** В результате исследования у 62 % больных с ДАК установлено наличие умеренной концентрической гипертрофии миокарда, которая сочеталась с повышением градиента давления и скорости кровотока на аортальном клапане. В то же время не выявлено значимых корреляций между параметрами гемодинамики на клапане и толщиной задней стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки при наличии наибольших вкладов полученных параметров в систолический объём и размер левого желудочка и, соответственно, меньших – в показатели, отражающие гипертрофию у этих больных.

**Выводы.** У детей с ДАК имеет место умеренная концентрическая гипертрофия миокарда левого желудочка, которая сопровождается существенными изменениями гемодинамики аортального клапана с наибольшим влиянием этих изменений на волюметрические показатели левого желудочка.

## Introduction

Congenital heart defects (CHD) in children has recently attracted the attention of the medical community. The permanent increasing in CHD incidence could be attributed to environmental influence producing genotoxic effects as well as infections during pregnancy affecting the genome at formation the heart structure. At the same time, in the general structure of CHD there is also a growing number of cardiac defects involving valve abnormalities, and, as we know, the consequences of these defects in the form of acute cardiovascular events occur mainly in adulthood. Nevertheless, until recently the most widespread CHD like bicuspid aortic valve (BAV) with the populational prevalence is from 10 to 20 cases per 1000 was considered as the small anomaly of the heart. That's why the problem of children management with BAV currently remains quite actual [1,2]. First of all, because oBAV is the most widespread congenital heart disease which is mainly revealed occasionally by heart ultrasound and has low manifestation during childhood. In adults the defect is complicated with aortal dissection, aortal valve failure and aortal stenosis [3]. At the same time, this anomaly is often accompanied by other aortal defects and genetic syndromes [4,5]. It is also must be emphasized that one of the BAV manifestations is the myocardial hypertrophy with slow progression caused either by morphologic and functional features of this CHD or by independent co-morbid condition related to polymorphisms of NFATC genes that, by turn, leads to formation of valve anomalies within the embryogenesis and postnatal stress-induced myocardial hypertrophy. These genes are represented by 5 modifications with an expression in different tissues and also participate in hypertrophic response of bones and heart muscles. From the other hand, in some studies the role of NFATC proteins in development of cardiac dysfunction and myocardial hypertrophy was proven [6,7].

**The aim** of the study was to detect the early changes of intracardial hemodynamics at aortic valve in children with BAV and established their interrelations to the signs of myocardial hypertrophy in this cohort of patients.

## Materials and methods

There was conducted a study of basic dopplerographic parameters in 38 children with BAV. In the control group 28 healthy children without differences in their age, sex and body weight compared to BAV patients were included (10.2 y. o.  $\pm$  0.7 y. o. and 10.9 y. o.  $\pm$  0.8 y. o. respectively;

$p > 0.05$ , BMI 17.08 kg/m<sup>2</sup>  $\pm$  0.70 kg/m<sup>2</sup> and 18.9 kg/m<sup>2</sup>  $\pm$  0.84 kg/m<sup>2</sup> respectively;  $p > 0.05$ ). Most of patients in both comparable groups were the boys (28 (75 %) and 17 (62 %) respectively;  $p > 0.05$ ). All the children were free of signs of heart failure. Dopplerographic study was conducted with "Medison – 8000" scanner and 2.5 MHz transducer with detection of dopplerographic data and calculation of left ventricle myocardial mass by Devereux R. B. –  $1.04 [(LVold + VSd + LVPWd)^3 - LVold^3] - 13,6$  [8] and index of left ventricle myocardial mass – by P. Gosse –  $M/H^{2.7}$  [9], where the LVold is left ventricle diastolic volume in ml, VSd is diastolic ventricular septum depth in mm, LVPWd is left ventricle posterior wall depth in mm, M is left ventricle mass and H is height were done to all children. The relative left ventricle posterior wall depth (rLVPWd) was calculated by Ganau ( $2 \cdot LVPWd / LVDd$ ) [10], where LVPWd is the left ventricle posterior wall depth and LVDd is the left ventricle diastolic dimension. The left ventricle geometry type was established by P. Verdecchia [11] in dependence of left ventricle myocardium mass index and relative left ventricle posterior wall depth values. The data were processed consequently with Statistica 6.0 program by using Student t-test, Spearman correlations and multiple regressions by counting the beta regression coefficients. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital and Medical University. The informed consent from the parents was taken.

## Results and discussion

At the first stage of the study the comparative analysis of basic anatomical data and heart hemodynamics in two above mentioned groups of patients was conducted. This data is represented in the *Table 1*.

As it is shown in *Table 1* there are basic signs of disorders in heart hemodynamics concerned to bloodstream at aortal valve with an essential increasing of peak flow velocity (6.90 m/s  $\pm$  3.67 m/s against 0.97 m/s  $\pm$  0.05 m/s respectively;  $p < 0.05$ ) and peak pressure gradient (17.56 mm Hg  $\pm$  3.89 mm Hg and 3.38 mm Hg  $\pm$  0.33 mm Hg respectively;  $p < 0.05$ ) that was in correspondence to this anomaly. There was also the established increasing of left ventricle mass (146.51 g  $\pm$  30.4 g against 80.13 g  $\pm$  12.01 g in control group;  $p < 0.05$ ) and index of left ventricle mass (61.37 g/m<sup>2.7</sup>  $\pm$  17.51 g/m<sup>2.7</sup> and 27.97 g/m<sup>2.7</sup>  $\pm$  4.46 g/m<sup>2.7</sup> respectively;  $p < 0.05$ ). In 24 from 38 patients with BAV the left ventricle posterior wall depth (LVPWd) and ventricular septum depth was more than 8 mm and their rLVPWd was 0.49 mm  $\pm$  0.04 mm compared to those with LVPWd

**Table 1.** Morphologic and functional echodopplerographic signs in children with bicuspid aortic valve and in the control group

Parameters of heart hemodynamics	M ± m	
	Children with BAV, (n = 38)	Control, (n = 28)
PA (diameter of pulmonary artery), mm	19.35 ± 0.49	19.25 ± 0.42
Ao (diameter of aorta), mm	19.36 ± 3.06	19.25 ± 0.46
Left atrium longitudinal dimension, mm	25.82 ± 1.11	22.91 ± 0.94
Left atrium transversal dimension, mm	24.72 ± 0.74	22.94 ± 0.83
Right atrium longitudinal dimension, mm	25.89 ± 1.11	23.68 ± 1.03
Right atrium transversal dimension, mm	25.00 ± 0.78	23.18 ± 0.85
Right ventricle longitudinal dimension, mm	44.7 ± 1.31	43.24 ± 1.46
Right ventricle transversal dimension, mm	22.43 ± 0.54	21.94 ± 0.57
LVDd (left ventricle diastolic dimension), mm	41.42 ± 1.37	40.61 ± 1.11
LVDs (left ventricle systolic dimension), mm	25.39 ± 1.06	26.25 ± 0.93
LVold (left ventricle diastolic volume), ml	81.9 ± 6.64	75.57 ± 5.43
LVols (left ventricle systolic volume), ml	26.06 ± 2.86	26.33 ± 2.35
S Vol (systolic volume), ml	56.41 ± 4.32	50.78 ± 3.19
Ejec F (ejection fraction), %	69.57 ± 1.26	66.71 ± 1.05
VSd (ventricular septum depth), mm	8.35 ± 0.40	7.24 ± 0.28
LVPWd (left ventricle posterior wall depth), mm	8.37 ± 0.41	7.21 ± 0.26
MVV (mitral valve peak bloodstream velocity), m/s	0.91 ± 0.04	0.89 ± 0.05
MVPG (mitral valve peak pressure gradient), mm Hg	7.87 ± 3.86	5.39 ± 3.55
AVV (aortal valve peak bloodstream velocity), m/s	6.90 ± 3.67*	0.97 ± 0.05
AVPG (aortal valve peak pressure gradient), mm Hg	17.56 ± 3.89*	3.38 ± 0.33
TVV (tricuspid valve peak bloodstream velocity), m/s	2.15 ± 1.51	7.99 ± 4.99
TVPG (tricuspid valve peak pressure gradient), mm Hg	4.49 ± 2.81	4.75 ± 3.57
PAV (pulmonary artery peak bloodstream velocity), m/s	6.24 ± 3.69	4.52 ± 3.57
PAVPG (pulmonary artery valve peak pressure gradient), mm Hg	8.82 ± 3.60	10.77 ± 4.85
LVMM (left ventricle myocardial mass), g	146.51 ± 30.4*	80.13 ± 12.01
ILVMM (index of left ventricle myocardial mass), g/m <sup>2.7</sup>	61.37 ± 17.51*	27.97 ± 4.46
rLVPWd (relative left ventricle posterior wall depth), mm	0.41 ± 0.02*	0.35 ± 0.01

\*: p &lt; 0.05.

less than 8mm where this value was 0.34 mm ± 0.01 mm (p < 0.05). In the same time, indexes of left ventricular myocardial mass were 104.25 g/m<sup>2.7</sup> ± 33.10 g/m<sup>2.7</sup> and 42.66 ± 17.13 g/m<sup>2.7</sup> respectively (p < 0.05). Thus, in 63.2 % of these patients with increasing both relative LVPWd and index of left ventricle mass the concentric hypertrophy of left ventricle took place, whereas in other 14 patients (36.8 %) there was normal left ventricle geometry. In addition, there was not any significant difference revealed with the parameters of heart hemodynamics at aortal valve and dimensions of heart chambers in children with BAV and control group. This has led to the systematic study of the correlation relationship between the LVPWd, VSd and aortal valve's hemodynamics in patients with BAV. The obtained data is represented in *Table 2*. As it is shown in *Table 2*, both in children with BAV and control group the most significant correlations between the left ventricle posterior wall depth and ventricular septum depth to the diameters of aorta and pulmonary artery, transversal dimension of left atrium, longitudinal and transverse dimension of right ventricle, left ventricle diastolic dimension and the diastolic volume were obtained. Comparatively to the control group in children with BAV there were not significant correlations between left atrium longitudinal dimension and LVPWd (R = -0.04), VSd (R = 0.1), LVDs and LVPWd (R = 0.11) to VSd (R = 0.16), LVols or LVPWd and VSd (R = 0.25 and 0.58 respectively; p < 0.05), PAV or LVPWd (R = -0.11) and VSd (R = -0.09).

At the same time, in BAV patients the significant correlations between right atrium transverse dimension or LVPWd and VSd were found (R = 0.37; p < 0.05 and R = 0.45; respectively, p < 0.05), that distinguishes this group of patients from the in control. It should be also emphasized that comparatively to control in children with BAV the opposite direction of LVPWd or VSd and Ejec F correlations with low values of coefficients were found (R = 0.32 and R = -0.34 respectively; p < 0.05).

The other feature of conducted correlation analysis in children with BAV was an absence of significant interrelations between the blood flow velocity at aortal valve and LVPWd or VSd. In both above mentioned groups the obtained correlation coefficients to the aortal valve pressure gradient were non significant.

Thus, despite the stated increase of bloodstream velocity and pressure gradient at aortal valve in BAV children, these parameters of intracardiac hemodynamics were not influenced significantly on the myocardial hypertrophy whereas in control group the medium and high level of interrelations were established (*Table 2*). Based on obtained data the individual comparative inputs of peak AVPG and peak AVV in the LVPWd and VSd were estimated by multiple regression method in children with BAV and in control group.

These data is shown in *Table 3*. As it is seen from the *Table 3*, the mentioned parameters of hemodynamics at aortal valve had small inputs on LVPWd and VSd either in BAV children or in control. It also should be noted, that highest significant inputs in heart chambers dimensions in the control group were the peak pressure gradient into the left atrium longitudinal dimension (beta = 1.57) and peak bloodstream velocity with negative input value into the atrium's transversal dimension (beta = -0.81).

Taking into account the opposite direction of these inputs it could be assumed an adaptation influence of pressure gradient increasing at aortal valve into left atrium lengthening as well as flow velocity into decreasing of their transversal dimension respectively, that is, the general elongation of left atrium in the control group in response to increasing of blood flow and pressure gradient at aortal valve was marked. On the other hand, these tendencies were not seen in children with BAV in whom the increased LVPWd took place.

Based on these results the inputs of blood flow parameters at aortal valve into left ventricle hemodynamics in both groups of patients were established. The data are represented in the *Table 4*.

In *Table 4* it is shown that in children with BAV in comparison to the control the highest inputs had the valve's pressure gradient into LVDs (-2.43 against 0.71 respectively; p < 0.05), gradient pressure and blood flow velocity into LVold (1.50 against -1.33 respectively; p < 0.05 and 1.50 against -1.08 respectively; p < 0.05) and the blood flow velocity into S Vol. However, the inputs of mentioned blood flow parameters at the aortal valve into the LVPWd and VSd were insignificant both as in control as in children with BAV.

Thus, the marked signs of left ventricular hypertrophy in children with BAV did not have direct interrelations with the parameters of hemodynamics at aortal valve. It should be also emphasized that in BAV children the total

number of obtained significant correlations compared to the control group were less both to LVPWd (3 against 9, respectively) and to VSd (11 against 13 respectively). The results of multiple regression analysis in children with BAV showed an absence of important inputs of aortal valve's hemodynamics into left atrium dimensions compared to

the control, which has become the another confirmation of early myocardial desadaptive changes in this cohort of patients.

At the same moment, in children with BAV the significant influences of the aortal valve bloodstream velocity on the left ventricle diastolic parameters and on the sys-

**Table 2.** Correlation coefficients (R) between left ventricle posterior wall (LVPWd) and ventricular septum (VSd) depths and the parameters of heart hemodynamics in children with bicuspid aortic valve and in the control group

Parameters of hemodynamics	R (p)			
	LVPWd		Vsd	
	BAV	control	BAV	control
PA (diameter of pulmonary artery), mm	0.37 (0.02)	0.62 (<0.01)	0.34 (0.03)	0.66 (<0.01)
Ao (diameter of aorta), mm	0.41 (<0.01)	0.64 (<0.01)	0.36 (0.02)	0.67 (<0.01)
Left atrium longitudinal dimension, mm	-0.04 (0.8)	0.34* (0.05)	0.1* (0.54)	0.38 (0.03)
Left atrium transversal dimension, mm	0.35 (0.03)	0.39 (0.02)	0.50 (<0.01)	0.44 (<0.01)
Right atrium longitudinal dimension, mm	0.25 (0.12)	0.26 (0.14)	0.37 (0.02)	0.30 (0.08)
Right atrium transversal dimension, mm	0.37 (0.02)	0.24 (0.17)	0.45 (<0.01)	0.28 (0.1)
Right ventricle longitudinal dimension, mm	0.61 (<0.01)	0.55 (<0.01)	0.61 (<0.01)	0.60 (<0.01)
Right ventricle transversal dimension, mm	0.51 (<0.01)	0.47 (<0.01)	0.48 (<0.01)	0.49 (<0.01)
LVDd (left ventricle diastolic dimension), mm	0.45 (0.04)	0.65 (<0.01)	0.47 (<0.01)	0.69 (<0.01)
LVDs (left ventricle systolic dimension), mm	0.11 (0.51)	0.67* (<0.01)	0.16 (0.31)	0.70* (<0.01)
LVoid (left ventricle diastolic volume), ml	0.40 (0.01)	0.62 (<0.01)	0.43 (<0.01)	0.64 (<0.01)
LVols (left ventricle systolic volume), ml	0.26 (0.1)	0.55 (<0.01)	0.25 (0.12)	0.58 (<0.01)
S Vol (systolic volume), ml	0.49 (0.01)	0.60 (<0.01)	0.50 (<0.01)	0.63 (<0.01)
Ejec F (ejection fraction), %	0.32 (0.04)	-0.34* (0.03)	0.29 (0.07)	-0.38* (0.01)
MVV (mitral valve peak bloodstream velocity), m/s	-0.12 (0.47)	0.05 (0.81)	0.009 (0.95)	0.10 (0.59)
MVPG (mitral valve peak pressure gradient), mm Hg	-0.04 (0.83)	0.19 (0.32)	0.06 (0.74)	0.15 (0.45)
AVV (aortal valve peak bloodstream velocity), m/s	0.23 (0.17)	-0.33* (0.08)	0.19 (0.24)	-0.33* (0.09)
AVPG (aortal valve peak pressure gradient), mm Hg	0.18 (0.26)	-0.03 (0.85)	0.20 (0.22)	-0.04 (0.86)
TVV (tricuspid valve peak bloodstream velocity), m/s	-0.01 (0.95)	-0.26 (0.18)	0.13 (0.45)	-0.33 (0.09)
TVPG (tricuspid valve peak pressure gradient), mm Hg	0.04 (0.83)	-0.18 (0.36)	0.12 (0.49)	-0.25 (0.21)
PAV (pulmonary artery peak bloodstream velocity), m/s	-0.11 (0.50)	-0.53* (<0.01)	-0.09 (0.58)	-0.58* (<0.01)

\*: statistic significance between correlation coefficients.

**Table 3.** The inputs of peak pressure gradient and peak bloodstream velocity at aortal valve into heart chamber dimensions in children with bicuspid aortic valve by the data of obtained regression quotients (beta) compared to control group

Parameters of hemodynamics	peak bloodstream velocity		peak pressure gradient	
	BAV	control	BAV	control
	Left atrium longitudinal dimension, mm	-0.65	1.08	-0.45
Left atrium transversal dimension, mm	-0.14	-0.81*	-0.30	-0.71
Right atrium longitudinal dimension, mm	0.62	-0.70	0.88	-0.81
Right atrium transversal dimension, mm	-0.07	0.97	-0.31	0.19
Right ventricle longitudinal dimension, mm	-0.09	-0.03	-0.08	-0.21
Right ventricle transversal dimension, mm	-0.21	-0.32	-0.34	0.05
VSd, mm	0.23	0.16	-0.11	0.31
LVPWd, mm	-0.16	-0.45	0.51	-0.38

\*: p < 0.05.

**Table 4.** The inputs of peak bloodstream velocity and peak gradient pressure at aortal valve into the left ventricle hemodynamics, left ventricle posterior wall depth and ventricular septum depth by the data of obtained regression coefficients (beta) in children with bicuspid aortic valve compared to control group

Parameters of hemodynamics	AVV		AVPG	
	BAV	control	BAV	control
	LVDd (left ventricle diastolic dimension), mm	-2.96*	1.42*	-2.43*
LVDs (left ventricle systolic dimension), mm	-0.03	-0.18	-0.16	-0.15
LVoid (left ventricle diastolic volume), ml	1.50*	-1.08	1.51*	-1.33
S Vol (systolic volume), ml	1.40*	0.31	0.80	1.05
Ejec F (ejection fraction), %	-0.25	-0.18	0.0001	-0.64
VSd, mm	-0.13	-0.56	0.1	-0.32
LVPWd, mm	0.19	0.16	0.13	0.11

\*: p < 0.05; **AVV**: arterial valve bloodstream velocity; **AVPG**: arterial valve pressure gradient.

toxic volume were obtained, that were correspondent to decreasing of left ventricle diastolic dimension and to compensatory increasing of the ejection fraction in LVPWd and Vsd thickening.

## Conclusions

1. In children with BAV the parameters of hemodynamics at aortal valve have the highest inputs into the left ventricle diastolic dimension, systolic dimension and volume.

2. In children with BAV in absence of the heart failure and clinical manifestations the moderate concentric hypertrophy of left ventricle takes place which is combined to significant disorders of intracardial hemodynamics at aortic valve.

3. The detected features of myocardial hypertrophy in its early manifestation in children with BAV create a theoretical substantiation for the prevention, diagnostics and therapy of this anomaly.

## References

- [1] Hales, A. R., & Mahle, W. T. (2014) Echocardiography screening of siblings of children with bicuspid aortic valve. *Pediatrics*, 133, e1212. doi: 10.1542/peds.2013-3051.
- [2] Petit, C. J., Gao, K., Goldstein, B. H., Lang, S. M., Gillespie, S. E., Kim, S. I., & Sachdeva, R. (2016) Relation of Aortic Valve Morphologic Characteristics to Aortic Valve Insufficiency and Residual Stenosis in Children With Congenital Aortic Stenosis Undergoing Balloon Valvuloplasty. *Am J Cardiol.*, 117(6), 972. doi: 10.1016/j.amjcard.2015.12.034.
- [3] Siu, S. C., & Candice, K. (2010) Bicuspid aortic valve disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(25), 2789–2800. doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.068.
- [4] Hanedan Onan, S., Baykan, A., Sezer, S., Narin, F., Mavili, E., Baykan, Z., et al. (2016) Evaluation of cardiovascular changes in children with BAVs. *Pediatr Cardiol.*, 37(3), 472–481. doi: 10.1007/s00246-015-1302-6.
- [5] Calloway, T. J., Martin, L. J., Zhang, X., Tandon, A., Benson, D. W., & Hinton, R. B. (2011) Risk factors for aortic valve disease in bicuspid aortic valve: A family-based study. *American journal of medical genetics*, 155(5), 1015–1020. doi: 10.1002/ajmg.a.33974.
- [6] Lunde, I. G. (2011) Molecular mechanisms of heart failure; Nuclear Factor of Activated T-cell (NFAT) signaling in myocardial hypertrophy and dysfunction. Dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD). Oslo, Norway. Series of dissertations submitted to the Faculty of Medicine, University of Oslo, №1307.
- [7] Wu, B., Baldwin, H. S., & Zhou, B. (2013) Nfatc1 directs the endocardial progenitor cells to make heart valve primordium. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(8), 294–300. doi: 10.1016/j.tcm.2013.04.003.
- [8] Devereux, R. B., Alonso, D. R., Lutas, E. M., Gottlieb, G. J., Campo, E., Sachs, I., & Reichek, N. (1986) Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am. J. Cardiol.*, 57(6), 450–458. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(86\)90771-X](https://doi.org/10.1016/0002-9149(86)90771-X).
- [9] Gosse, P., Jullien, V., Jarnier, P., Lemetayer, P., & Clementy, J. (1999) Echocardiographic definition of left ventricular hypertrophy in the hypertensive: which method of indexation of left ventricular mass? *J. Hum. Hypertens.*, 13(8), 505–9.
- [10] Ganau, A., Devereux, R. B., Roman, M. J., de Simone, G., Pickering, T. G., Saba, P. S., et al. (1992) Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 19(7), 1550–1558. doi: 10.1016/0735-1097(92)90617-V.
- [11] Verdecchia, P., Porcellati, C., Zampi, I., Schillaci, G., Gatteschi, C., Battistelli, M., et al. (1994) Asymmetric left ventricular remodeling due to isolated septal thickening in patients with systemic hypertension and normal left ventricular masses. *Am. J. Cardiol.*, 73(4), 247–52. doi: [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(94\)90228-3](https://doi.org/10.1016/0002-9149(94)90228-3).

## Information about authors:

Kamenshchuk A. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Hospital Pediatrics, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Ivanko O. G., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Propedeutics of Children Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Відомості про авторів:

Каменщик А. В., канд. мед. наук, доцент каф. госпітальної педіатрії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Іванько О. Г., д-р мед. наук, професор, зав. каф. пропедевтики дитячих хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Сведения об авторах:

Каменщик А. В., канд. мед. наук, доцент каф. госпитальной педиатрии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Иванько О. Г., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. пропедевтики детских болезней, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 20.12.2016

Після доопрацювання / Revised: 15.03.2017

Прийнято до друку / Accepted: 31.03.2017



# Differential diagnosis algorithm of endogenous catatonia, catatonia-morphic and catatonia-mimicking states

D. N. Safonov

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

**Subject relevance.** The process of mental pathology pathomorphosis leads to the polymorphism of its clinical manifestations and, as a consequence – to difficulties in identification and differential diagnosis. The solution to this problem is in the adaption of diagnostic methodology to clinical realities by including into their structure instruments formed basing on pathomorphosis factors and trends. In this perspective, the most prominent example is endogenous catatonia, which in the academic tradition is conventionally affiliated with the form of schizophrenia with the same name. According to the classical understanding, endogenous catatonia, or, in the narrow sense – catatonic syndrome, is a group of intermittent motor disorders, arranged with polymorphic shell constellation of neuropsychiatric manifestations.

**The aim** is to develop pathomorphosis adapted clinical algorithm of endogenous catatonia differential diagnostics.

**Materials and methods:** 236 patients of Zaporizhzhia Regional Psychiatric Clinic were examined. Patients were divided into groups due to their mental disorders:

- core group: patients with elements of endogenous catatonia in the structure of different clinical forms of schizophrenia (there were 144 patients in this group);
- comparison group # 1: 69 patients with late neurotropic effects of neuroleptic therapy (LNENT);
- comparison group # 2: 103 patients with catatonia-morphic dissociative disorders (CDD);
- comparison group # 3: 90 patients with organic catatonic disorder (OrCD);

**Results.** Using Bush-Francis Catatonia Rating scale as an instrument of clinical analysis and statistical research of results with A. Wald's sequential analysis (modified by E. V. Gubler) an algorithm of differential diagnostics of endogenous catatonia which includes 3 steps of Recognition Scale for Endogenous Catatonia is developed.

**Conclusion.** Designed scales have a number of categorical differences from existing analogues, foremost by virtue of specificity of clinical-discussion compositions of using marks and disqualified conditions and excluding phenomena spectrum availability. The validity level: true positive diagnostic results (sensitivity) = 94.43 %, pseudo-negative = 5.56 %, true negative (specificity) = 90.00 %, pseudo-positive = 10.00 %.

**Key words:**  
catatonia,  
diagnosis,  
algorithms.

**Pathologia**  
2017; 14 (2), 177–181

**DOI:**  
10.14739/2310-1237.  
2017.2.109665

**E-mail:**  
doxtor15@gmail.com

## Алгоритм диференційної діагностики ендогенної кататонії, кататоморфних та кататомімікрічних станів

Д. М. Сафонов

Процес патоморфозу психічної патології призводить до поліморфізму її клінічних проявів та, як наслідок, – до труднощів в ідентифікації та диференціальній діагностиці. Вирішення цієї проблеми полягає в адаптації діагностичних методик до клінічних реалій шляхом включення до їхнього складу інструментів, що сформовані на основі факторів патоморфозу та його тенденцій. З цього погляду найяскравішим прикладом є ендогенна кататонія, яка в академічній традиції, зазвичай, пов'язується з однойменною формою шизофренії. Відповідно до класичного розуміння, ендогенна кататонія або, у вузькому сенсі, кататонічний синдром є групою моторних порушень із поліморфною оболонкою психоневрологічного порядку.

**Мета роботи** – розробка патоморфоз-адаптованого клінічного алгоритму диференціальної діагностики ендогенної кататонії.

**Матеріали та методи.** Обстежили 236 пацієнтів Запорізької обласної психіатричної лікарні. Пацієнтів поділили на групи в зв'язку з їхніми психічними розладами:

- основна група: хворі з елементами ендогенної кататонії у структурі різних клінічних форм шизофренії (144 хворі);
- група порівняння № 1: 69 пацієнтів із пізніми нейротропними ефектами нейролептичної терапії (ПНЕНТ);
- група порівняння № 2: 103 хворі з кататоморфними дисоціативними розладами (КДР);
- група порівняння № 3: 90 хворих з органічним кататонічним розладом (ОрКР).

**Результати.** Використання клінічної шкали Буша–Френсіса як інструмента клінічного аналізу та статистичного дослідження результатів у рамках подвійного послідовного аналізу А. Вальда (модифікованого Є. В. Гублером) призвело до створення алгоритму диференціальної діагностики ендогенної кататонії, котра містить 3 кроки використання «Шкали розрізнення ендогенної кататонії» («ШРЕК»).

**Висновки.** Розроблена шкала має низку категоріальних відмінностей від наявних аналогів передусім через специфіку клініко-дискурсивних композицій із використанням маркерів і дискваліфікуючих станів. Рівень валідності: істинно позитивні результати діагностики (чутливість) = 94,43 %, псевдонегативні = 5,56 %, істинно негативні (специфічність) = 90,00 %, псевдопозитивні = 10,00 %.

**Ключові слова:**  
кататонічний  
синдром,  
ендогенна  
кататонія,  
органічна  
кататонія,  
діагностика,  
алгоритм.

**Патологія.** – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 177–181

**Ключевые слова:**

кататонический синдром, эндогенная кататония, органическая кататония, диагностика, алгоритм.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 177–181

## Алгоритм дифференциальной диагностики эндогенной кататонии, кататоморфных и кататомимикрических состояний

Д. Н. Сафонов

Процесс патоморфоза психической патологии приводит к полиморфизму её клинических проявлений и, как следствие, – к трудностям в идентификации и дифференциальной диагностике. Решение этой проблемы заключается в адаптации диагностических методик к клиническим реалиям путем включения в их состав инструментов, сформированных на основе факторов патоморфоза и его тенденций. С этой точки зрения наиболее ярким примером является эндогенная кататония, которая в академической традиции обычно связывается с одноименной формой шизофрении. Согласно классическому пониманию, эндогенная кататония или, в узком смысле, кататонический синдром, является группой моторных нарушений с полиморфной оболочкой психоневрологического порядка.

**Цель работы** – разработка патоморфоз-адаптированного клинического алгоритма дифференциальной диагностики эндогенной кататонии.

**Материалы и методы.** Обследовано 236 пациентов Запорожской областной психиатрической больницы. Пациенты были разделены на группы в связи с их психическими расстройствами:

- основная группа: больные с элементами эндогенной кататонии в структуре различных клинических форм шизофрении (144 больных);
- группа сравнения № 1: 69 пациентов с поздними нейротропными эффектами нейролептической терапии (ПНЭНТ);
- группа сравнения № 2: 103 больных с кататоморфными диссоциативными расстройствами (КДР);
- группа сравнения № 3: 90 больных с органическими кататоническими расстройствами (ОрКР).

**Результаты.** Использование клинической шкалы Буша–Френсиса в качестве инструмента клинического анализа и статистического исследования результатов в рамках двойного последовательного анализа А. Вальда (модифицированного Е. В. Гублером) привело к созданию алгоритма дифференциальной диагностики эндогенной кататонии, которая включает в себя 3 шага применения «Шкалы различения эндогенной кататонии» («ШРЭК»).

**Выводы.** Разработанная шкала имеет ряд категориальных отличий от существующих аналогов, прежде всего в силу специфики клинко-дискурсивных композиций с использованием маркеров и дисквалифицирующих состояний. Уровень валидности: истинно положительные результаты диагностики (чувствительность) = 94,43 %, псевдоотрицательные = 5,56 %, истинно отрицательные (специфичность) = 90,00 %, псевдоположительные = 10,00 %.

### Subject relevance

The process of mental pathology pathomorphosis (PM) leads to polymorphism of its clinical manifestations and, as a consequence – to difficulties in identification and differential diagnosis. The solution to this problem is in the adaption of diagnostic methodology to clinical realities by including into their structure instruments formed basing on PM factors and trends [18–22].

In this perspective, the most prominent example is endogenous catatonia (EC), which in the academic tradition conventionally is affiliated with the form of schizophrenia with the same name. According to the classical understanding, EC, or, in the narrow sense – catatonic syndrome (CS), is a group of intermittent motor disorders, arranged with polymorphic shell constellation of neuropsychiatric manifestations [1,2,19–22].

With psychiatric diagnosis formalization degree in-censement, as a result of adaptation to the requirements of evidence-based medicine, which is typical of the international psychiatric discourse of XXI century, diagnostic algorithms that provide specialized diagnostic scales have been established in clinical practice, including: Rosebush and colleagues scale (1999), The Modified Rogers Scale (MRS, 1991), Bush-Francis Catatonia Rating Scale (BFCRS, 1996), Northoff Catatonia Scale (NCS, 1999), Catatonia Rating Scale (CRS, 2008). Analysis of scales above finds lack of signs that are specific to EC structure, contamination of diagnostic positions and replication of same phenomena. That leads to discursive heterogeneity

and artificial etiopatogenetic homogenization, without any formal system of adaptation to EC PM [3–15].

In this regard, the development of PM adapted diagnostic tool for EC differentiation is an urgent task of modern clinical psychiatry.

**The aim of this study** is to develop pathomorphosis adapted clinical algorithm of endogenous catatonia differential diagnostics.

### The research design and basic features of contingents and methods

453 patients struggling catatonia and behavior disorders of different genesis have been examined on the basis of the Zaporizhzhia Regional Psychiatric Clinic. For further examination 236 patients were chosen by prevailing criteria (primarily by the nosology). All the patients have been hospitalized in stable somatic state due to psycho-somatic examination. The duration of the disorder takes from 5 to 30 years. The average age of patient was approximately 34 years.

Patients were divided into groups due to their mental disorders:

- core group: patients with elements of endogenous catatonia in the structure of different clinical form of schizophrenia (there are 144 patients in this group);
- comparison group # 1: 69 patients with late neurotropic effects of neuroleptic therapy (LNENT);
- comparison group # 2: 103 patients with catatonomorphic dissociative disorders (CDD);

– comparison group # 3: 90 patients with organic catatonic disorder (OrCD);

On the stage of testing diagnostic tool sensitivity and specificity, 30 patients with schizophrenia disorder with excluded phenomena of catatonic range were included to the comparison group.

Following research methods were used:

– psycho-pathological method – used for identification of disorder due to ICD-10 and analysis of its course with the help of the diagnostic scales (PANSS / Bush-Francis Catatonia Rating Scale (G. Bush, M. Fink, G. Petrides, 1996) [16,17];

– catamnestic method – analysis of new diagnostic specificity, determine the effectiveness of the developed differential diagnostics tool.

– clinical and statistical methods – were used for research results processing and assessment of the results' authenticity. All calculations were implemented on PC by dint of SPSS 15.0 and Excel programs from Microsoft Office 2003 pack. There a designation and arithmetical mean and variations were conducted for every quantitative indicator  $M(s)$ , standardized mistakes of average  $M \pm m$ , Student's criterion for quantitative indicators, unified signification of statistical probability  $p$ , diagnostic value grade (of diagnostic coefficients (DC) and Kullback's informativeness measure (IM)) an a part of A. Wald's sequential analysis (modified by E. V. Gubler). Statistic manipulations of research results were implemented on PC by Excel programs from Microsoft Office 2003 pack.

## Research results

Comparative analysis of the endogenous catatonia symptoms occurrence was performed with different representative of the comparison group, videlicet:

– LNENT [20] (Table 1);

– CDD [21] (Table 2);

– OrCD [22] (Table 3).

With DC and IM calculations by the formulas (E. V. Gubler, 1978);

$$DC = 10 \lg \frac{A_1}{A_2}; \quad (1)$$

$$IM = 10 \lg \frac{A_1}{A_2} \times 0.5 [A_1 - A_2]; \quad (2)$$

where: DC – diagnostic coefficient;

IM – Kullback's informativeness measure;

A1 – sign frequency in comparison group # 1;

A2 – sign frequency in comparison group # 2.

All important signs were made into differential-diagnostic tables (step 1, 2 and 3 ECDS) and posted in descending order of informativeness:

Filling scales of clinical forms was based on consistent observation and registration of psychopathological phenomena, postural and facial features, articulation, content, emphatic intonational-verbal communication parameters, neurological stigmas and complex patterns of behavior.

"Yes" mark was put in table in case of the phenomena presence, "No" mark was put in table in case of phenomena absence. On filling each line, the amount calculation of DC has been produced. By dint of mark DC addition, reaching value of  $\sum_{DC} = +13$  or  $-13$ , imposed preliminary diagnostic

**Table 1.** ECDS, step 1 – form (differentiation of EC and LNENT) [20]

Sign (mark)	Yes	No	$\sum_{DC}$
negativism (passive)	-5.66	+9.05	
impulsive actions	-6.35	+8.05	
echophenomena	-6.19	+7.08	
retrograde amnesia	-8.31	+4.59	
paramimia	-6.73	+5.27	
autoaggression	-9.13	+3.59	
catalepsy	-7.02	+4.03	
solidification	-8.11	+3.20	
oneiric	-13.75	+1.77	
stupor	-7.60	+2.62	
negativism (active)	-7.32	+2.35	
stereotyped movements	-6.10	+2.68	
tremor at rest	+6.94	-2.28	
autonomic disorders	+9.67	-1.35	
agression	+7.45	-1.58	
motor automatisms	-5.77	+1.96	
mutism	-6.03	+1.80	
choreoathetosis	+6.87	-1.30	
dystonia	+5.51	-1.33	
rigidity	-4.43	+0.97	

**Table 2.** ECDS, step 2 – form (differentiation of EC and CDD) [21]

Sign (mark)	Yes	No	$\sum_{DC}$
echophenomena	-8.60	+7.52	
impulsiveness	-5.08	+7.65	
autoaggression	-8.83	+3.56	
stupor	-8.09	+2.66	
negativism	-7.58	+2.46	
paramimia	-4.83	+2.46	
tremor	+5.71	-1.44	
demonstrativeness	+5.59	-1.38	
stereotypy	-3.23	+2.03	
autonomic disorders	+2.33	-1.69	
dyspnea	+3.82	-0.98	

**Table 3.** ECDS, step 3 – form (differentiation of EC and OrCD) [22]

Sign (mark)	Yes	No	$\sum_{DC}$
negativism (passive)	-5.31	+8.93	
impulsive actions	-5.74	+7.88	
tremor at rest	+7.81	-3.20	
catalepsy	-5.41	+3.73	
solidification	-6.25	+2.97	
paramimia	-3.38	+4.19	
echophenomena	-2.27	+5.05	
negativism (active)	-4.79	+2.01	
oneiric	-6.45	+1.48	
stupor	-4.23	+2.10	
mutism	-5.22	+1.70	
crepuscular disorder	+7.81	-0.77	
nystagmus	+7.81	-0.77	
autoaggression	-2.65	+2.22	
ambivalency	-2.45	+2.35	
agression	+5.92	-0.94	
retrograde amnesia	-1.68	+1.70	
passive submission	+0.63	-0.23	

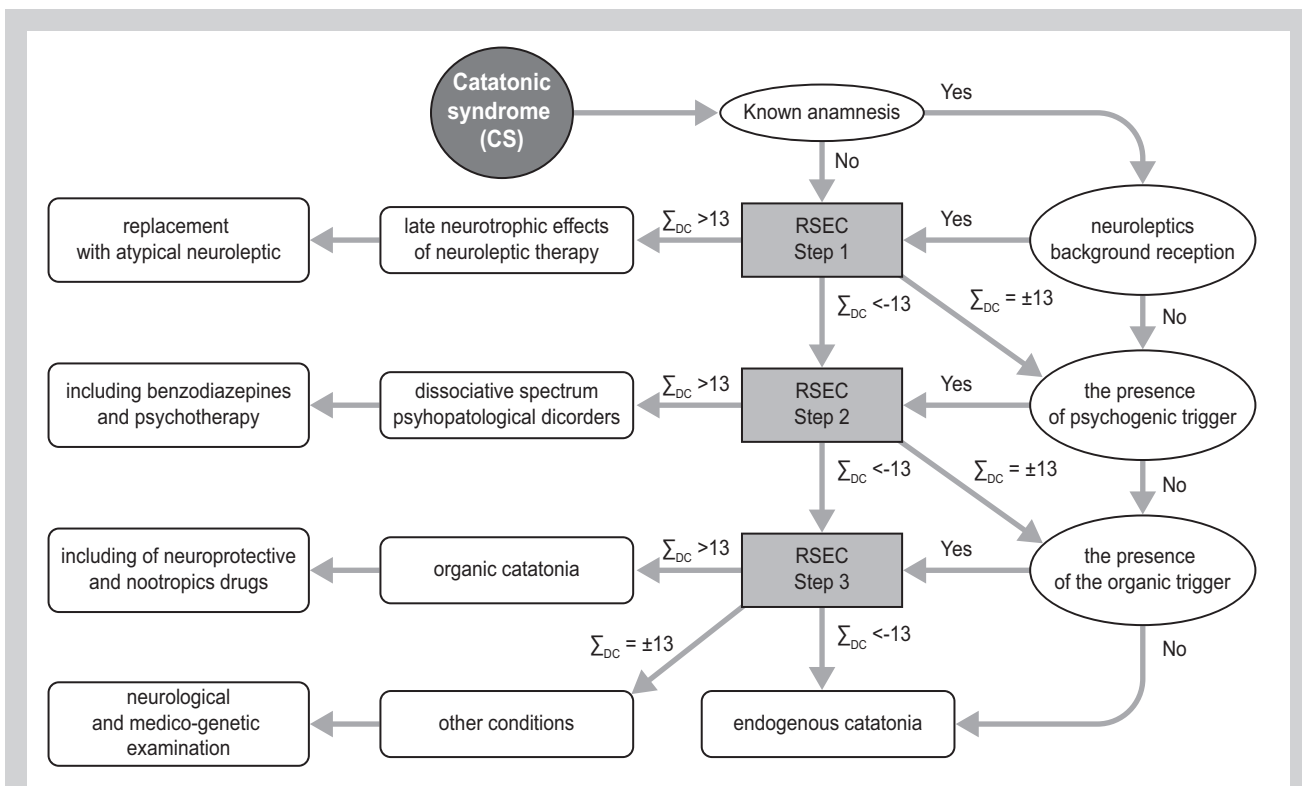


Fig. 1. Protocol of differential diagnostic of EC based on ECDS, steps 1–3.

conclusion of belonging psychopathological disorders to LNENT, CDD and OrCD (if  $\sum_{DC} = +13$ ), or to primary (endogenous) catatonia (if  $\sum_{DC} = -13$ ), which has confidence level = 95 % ( $p = 0.05$ ). Reaching value of  $\sum_{DC} = +20$  or  $-20$  imposed a final diagnostic conclusion, which has confidence level = 99 % ( $p = 0.01$ ). If higher confidence level is needed, process of phenomena education continues until reaching value  $\sum_{DC} = +30$  or  $-30$  appropriate = 99.9 % ( $p = 0.001$ ) confidence level.

There is a protocol of differential diagnostic of EC based on ECDS, steps 1–3 (Fig. 1).

The analysis of the developed protocol of differential diagnosis has been performed. Taking into account specificity of views on the discuss on the identification of psychomotorical and behavioral disorders of catatonic range double check in 2 vectors of the sensitivity and specificity of new diagnostics tool was made on anonymized and randomized contingent (sensitivity analysis) and on 30 patients of psychiatric hospital excepted catatonic semiotics (specificity analysis). These 2 vectors are:

1) formal competence (for clinical-statistical indicators of sensibility and specificity of ECDS protocol to diagnosis, obtained by verified diagnostic protocol – BFCRS): sensibility = 84.03 % (121 of 144 anonymized and randomized comparison group), specificity = 83.33 % (25 of 30 patients with excluded by dint of BFCRS catatonic symptoms);

2) discursively-native competence (for clinical-statistical indicators of sensibility and specificity of ECDS protocol to diagnosis, obtained by council of competent specialists: sensibility = 94.43 % (121 of 144 anonymized and randomized comparison group), specificity = 90.00 %

(25 of 30 patients with excluded by dint of consensus catatonic symptoms).

Using of designed protocol allowed reaching the level of true positive results (sensibility) = 94.43 %, pseudo-negative = 5.56 %, true negative (specificity) = 90.00 %, pseudo-positive = 10.00 %.

### Conclusions:

1. There differential diagnostic properties of clinical-psychopathological semiotics signs were revealed and analyzed in EC, LNENT, CDD and OrCD patients. Values of DC and IM were calculated. Reliability analysis of differences and IM values allowed separating valid signs for syndromic accessory of catatonia differential.

According to the methodology of diagnostic decision reliability for probability level attainment 95 % ( $p = 0.05$ ), threshold  $\sum_{DC}$  – is a constant =  $\pm 13$ , for reaching probability 99 % =  $\pm 20$ , for reaching probability 99.9 % =  $\pm 30$ :

– if  $\sum_{DC} < -13, -20$  and  $-30$  psychopathological semiotic complex with probability 95%, 99% i 99,9% respectively, it speaks in favour to EC;

– if  $\sum_{DC} < +13, +20$  and  $+30$  psychopathological semiotic complex with probability 95%, 99% i 99,9% respectively speaks in favour to CDD, OrCD and LNENT;

– in the range  $-13 < \sum_{DC} < +13$  – conclusion should not be considered reliable, because wherein  $p > 0.05$ .

2. All important signs were made into differential-diagnostic tables and posted in descending order of informativeness  $\sum_{IM}$ . All the valid and discursively-native marks were used in based on three-step realization algorithm ECDS protocol. Designed scale allows making a diag-

nostic decision of relatively psychopathological disorder to EC, LNENT, CDD or OrCD on any reliability level: 95 % ( $p = 0.05$ ), 99 % ( $p = 0.01$ ) or 99.9 % ( $p = 0.001$ ). Based on the designed scale EC differential diagnostic protocol has been formed. Using of designed protocol allowed reaching the level of true positive results (sensitivity) = 94.43 %, pseudo-negative = 5.56 %, true negative (specificity) = 90.00 %, pseudo-positive = 10.00 %.

Designed scales have a number of categorical differences from existing analogues, foremost by virtue of specificity of clinical-discussion compositions of using marks and disqualified conditions and excluding phenomena spectrum availability.

## References

- [1] American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fifth ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- [2] American Psychiatric Association (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fourth Edition, Text Revision: DSM-IV-TR. Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
- [3] Ayehu, M., Shibre, T., Milkias, B., & Fekadu, A. (2014) Movement disorders in neuroleptic-naïve patients with schizophrenia spectrum disorders. *BMC Psychiatry*, 14, 280. doi: 10.1186/s12888-014-0280-1.
- [4] Bräunig, P., Krüger, S., Shugar, G., Höffler, J., & Börner, I. (2000) The catatonia rating scale – development, reliability, and use. *Compr Psychiatry*, 41(2), 147–58. doi: 10.1016/S0010-440X(00)90148-2.
- [5] Bush, G., Fink, M., Petrides, G., Dowling, F., & Francis, A. (1996) Catatonia I: rating scale and standardized examination. *Acta Psychiatr. Scand.*, 93(2), 129–136. doi: 10.1111/j.1600-0447.1996.tb09814.x.
- [6] Caroff, S., Mann, S., Francis, A., Fricchione, G. (Eds.) (2004) Catatonia: from psychopathology to neurobiology. *Am. Psychiatric Publishing*.
- [7] Cernovsky, Z. Z., Landmark, J. A., Merskey, H., & O'Reilly, R. L. (1998) The relationship of catatonia symptoms to symptoms of schizophrenia. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie*, 43(10), 1031–1035. doi: 10.1177/070674379804301009.
- [8] Comella, C. L., Leurgans, S., Wu, J., Stebbins, G. T., & Chmura, T. (2003) Dystonia Study Group. Rating scales for dystonia: a multicenter assessment. *Mov Disord.*, 18(3), 303–312. doi: 10.1002/mds.10377.
- [9] Elze, M. C., Gimeno, H., Tustin, K., Baker, L., Lumsden, D. E., Hutson, J. L., & Lin, J. P. (2016) Burke-Fahn-Marsden dystonia severity, Gross Motor, Manual Ability, and Communication Function Classification scales in childhood hyperkinetic movement disorders including cerebral palsy: a 'Rosetta Stone' study. *Dev Med Child Neurol.*, 58(2), 145–53. doi: 10.1111/dmcn.12965.
- [10] Monbaliu, E., Ortibus, E., Roelens, F., Desloovere, K., Deklerck, J., Prinzie, P., et al. (2010) Rating scales for dystonia in cerebral palsy: reliability and validity. *Med Child Neurol.*, 52(6), 570–575. doi: 10.1111/j.1469-8749.2009.03581.x.
- [11] Northoff, G., Koch, A., Wenke, J., Eckert, J., Böker, H., Pflug, B., & Bogerts, B. (1999) Catatonia as a psychomotor syndrome: a rating scale and extrapyramidal motor symptoms. *Mov Disord.*, 14 (3), 404–416. doi: 10.1002/1531-8257(199905)14:3<404::AID-MDS1004>3.0.CO;2-5.
- [12] Peralta, V., & Cuesta, M. J. (2001) Motor features in psychotic disorders. II. Development of diagnostic criteria for catatonia. *Schizophr. Res.*, 47(2–3), 117–126. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0920-9964(00)00035-9.
- [13] Rooseleer, J., Willaert, A., & Sienaert, P. (2011) Rating scales for assessing catatonia; which ones are the best? *Tijdschr Psychiatr.* 53(5), 287–98. doi: 10.1016/j.jad.2011.02.012.
- [14] Rosebush, P. I., Hildebrand, A. M., Furlong, B. G., & Mazurek, M. F. (1990) Catatonic syndrome in a general psychiatric inpatient population: frequency, clinical presentation, and response to lorazepam. *J. Clin. Psychiatry*, 51(9), 357–362.
- [15] Stompe, T., Ortwein-Swoboda, G., Ritter, K., Schanda, H., & Friedmann, A. (2002) Are we witnessing the disappearance of catatonic schizophrenia? *Comprehensive Psychiatry*, 43, 167–174. doi: http://dx.doi.org/10.1053/comp.2002.32352.
- [16] Gubler, E. V. (1978) *Vychislitel'nyye metody analiza i raspoznavaniye patologicheskikh processov [Computational methods of analysis and recognition of pathological processes]*. Leningrad: Mediciyna. [in Russian].
- [17] Gubler, E. V., & Genkin, A. A. (1973) *Primeneniye neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh [The use of nonparametric statistical criteria in biomedical research]*. Doneck. [in Russian].
- [18] Chugunov, V. V., Safonov, D. N., & Gorodokin, A. D. (2013) Kliniko-statisticheskij i istoriograficheskij analiz predstavlenij ob e'pidemiologii rassstrojstv katonicheskogo spektra [Clinical-statistical and historiographic analysis of the catatonic spectrum disorder presented by the epidemiology]. *Acta Psychiatrica, Psychologica, Psychotherapeutica et Ethologica Tavrica*, 1(62), 69–76. [in Russian].
- [19] Chugunov, V. V. (2014/2015) *Psikhoterapevticheskij diaagnoz [Psychotherapeutic diagnosis]*. Kharkiv: Nauka. [in Russian].
- [20] Chugunov, V. V., Linskiy, I. V., Safonov, D. N., & Gorodokin, A. D. (2016) Kriterii i klinicheskij instrumentarij differencial'noj diagnostiki e'ndogennoj katononii i pozdnykh nejtropnykh e'fektov nejtropicheskij terapii («Shkala razlicheniya e'ndogennoj katononii») [Criteria and clinical tools for differential diagnostics of endogenous catatonia and late neurotropic effects of neuroleptic therapy ("Endogenous catatonia differentiation scale")]. *Ukrainskyi visnyk psykhonevrolohi*, 24, 1(86), 88–96. [in Russian].
- [21] Chugunov, V. V., Linskiy, I. V., Safonov, D. N., & Gorodokin, A. D. (2016) Kriterii i klinicheskij instrumentarij differencial'noj diagnostiki e'ndogennoj katononii i rassstrojstv dissociativnogo spektra («Shkala razlicheniya e'ndogennoj katononii», shag 2) [Criteria and clinical differentiation tools of endogenous catatonia and disorders of dissociative spectrum ("Endogenous catatonia differentiation scale", step 2)]. *Psikhiatriya, psikhoterapiya i medicinskaya psikhologiya*, 7(3), 337–352. [in Russian].
- [22] Chugunov, V. V., Linskiy, I. V., Safonov, D. N., & Gorodokin, A. D. (2016) Kriterii i klinicheskij instrumentarij differencial'noj diagnostiki e'ndogennoj i organicheskij katononii («Shkala razlicheniya e'ndogennoj katononii», shag 3) [Criteria and clinical instruments for differential diagnosis of endogenous and organic catatonia («Scale for distinguishing endogenous catatonia», step 3)]. *Sciences of Europe.*, 6(6), 78–88. [in Russian].

## Information about author:

Safonov D. N., Assistant of the Department of Psychiatry, Psychotherapy, General and Medical Psychology, Narcology and Sexology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Відомості про автора:

Сафонов Д. М., асистент каф. психіатрії, психотерапії, загальної та медичної психології, наркології та сексології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Сведения об авторе:

Сафонов Д. Н., ассистент каф. психиатрии, психотерапии, общей и медицинской психологии, наркологии и сексологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

## Конфлікт інтересів: відсутній.

**Conflicts of Interest:** author has no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 10.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 01.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 12.06.2017

# The effectiveness of automatic laparoscopic diagnostics of liver pathology using different methods of digital images classification

D. N. Bayazitov<sup>1</sup>, N. V. Kresyun<sup>1</sup>, A. B. Buzinovskiy<sup>2,3</sup>, N. R. Bayazitov<sup>1</sup>, A. V. Lyashenko<sup>1</sup>, L. S. Godlevskiy<sup>1</sup>, T. V. Prybolovets<sup>1</sup>, K. A. Bidnyuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Odesa National Medical University, Ukraine, <sup>2</sup>International center on researches and education in the field of informational technologies and systems at National Academy of Sciences and Ministry of Education of Ukraine, Kyiv, <sup>3</sup>Odesa Regional Clinic Hospital, Ukraine

## Key words:

liver diseases, laparoscopy, diagnostic imaging, image processing, computer-assisted.

## Pathologia

2017; 14 (2), 182–187

## DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109219

## E-mail:

BajazitovDmytro@hotmail.com,  
godlevskiy@odmu.edu.ua

Computer automatic diagnostic (CAD)/classification of videoimages is actual for laparoscopic surgery. Such CAD is supposed to explore intraoperatively for support surgeon decisions.

**Aim:** to evaluate the effectiveness of the CAD systems developed on the basis of two classifiers – HAAR features cascade and AdaBoost for the detection of cirrhotic and metastatic damages of the liver.

**Materials and methods.** The development of CAD was based on training of HAAR features cascade and AdaBoost classifiers with images/frames, which have been cropped out from video gained in the course of laparoscopic diagnostics. RGB frames which were gamma-corrected and converted into HSV have been used for training. Also descriptors were extracted from images with the modified method of Local Binary Pattern (LBT), which includes data on color characteristics ("modified color LBT" – MCLBT) and textural ones for AdaBoost classifier training. 1000 positive images along with 500 negative ones of both types of pathology were used for training. After cessation of training the tests were performed with the aim of the estimation of effectiveness of recognition. Test session images were different from those ones which have been used for training of the classifier. Test control sessions were performed with trained classifiers with 319 frames containing cirrhotic and 253 frames with metastatic deteriorations in liver tissue. 365 frames with the absence of mentioned pathology were used as a control group – practically healthy liver state.

**Results.** Classification of test video-images revealed that the highest recall for cirrhosis diagnostics was achieved after training of AdaBoost with MCLBT descriptors extracted from HSV images – 0.655, and in case for metastatic damages diagnostics – for MCLBT gained from RGB images – 0.925. Hence developed AdaBoost based CAD system achieved 69.0 % correct classification rate (accuracy) for cirrhotic and 92.7 % for metastatic images. The accuracy of Haar features classifier was highest in case of metastatic foci identification and achieved 0.701 (RGB) – 0.717 (HSV) values.

**Conclusions.** Haar features based cascade classifier turned to be less effective when compared with AdaBoost classifier trained with MCLBT descriptors. Metastatic foci are better diagnosed when compared with cirrhotic liver deterioration with the explored approaches to digital images classification.

## Ключові слова:

захворювання печінки, лапароскопія, діагностичне зображення, зображення обробка комп'ютерна.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 182–187

## Ефективність автоматизованої лапароскопічної діагностики патологічного стану печінки при застосуванні різних методів класифікації цифрових зображень

Д. М. Баязітов, Н. В. Кресюн, А. Б. Бузиновський, М. Р. Баязітов, А. В. Ляшенко, Л. С. Годлевський, Т. В. Приболовєць, К. А. Біднюк

Комп'ютерна автоматизована діагностика (КАД)/класифікація відеозображень є актуальною в лапароскопічній хірургії. Подібна КАД передбачається до використання впродовж виконання лапароскопічного втручання з метою підтримки ухвалення рішення хірургом.

**Мета роботи** – оцінити ефективність КАД, що створені на базі двох класифікаторів: каскадного класифікатора ознак Хаара та AdaBoost під час діагностики циротичних змін печінки та метастатичного її ураження.

**Матеріали та методи.** Створення КАД здійснювали шляхом навчання каскадного класифікатора ознак Хаара та AdaBoost зображеннями/кадрами, котрі були вилучені з відеоряду, що отримали під час лапароскопічної діагностичної процедури. Кадри, що отримані в RGB форматі шкали кольорів, обробляли за допомогою гама-корекції та трансформували у шкалу HSV, після чого обидва типи кадрів використовували для навчання. За допомогою модифікованого методу локальних бінарних патернів (LBT), котрий включав показники колірності («модифікований за кольором LBT» – MCLBT), а також характеристики текстури, визначали дескриптори для навчання AdaBoost класифікатора. Загалом для навчання кожного класифікатора використовували 1000 зображень із підтвердженими діагнозами та 500 – з їхньою відсутністю для кожної форми патології печінки. Після завершення навчання виконували контрольне тестування та визначали ефективність діагностики відзначених класифікаторів. При цьому для тестування використовували зображення, котрі не застосовували під час навчання: 319 зображень циротично зміненої та 253 зображення метастатичних змін поверхні печінки, а також 365 зображень печінки без патологічних змін.

**Результати.** Контрольне тестування засвідчило, що найвищим показник повноти діагностики цирозу печінки був при використанні AdaBoost класифікатора, котрий було навчено за допомогою MCLBT-дескрипторів, що отримали з кадрів у HSV форматі – 0,655, а також під час діагностики метастатичного ураження печінки – при використанні MCLBT-дескрипторів, що одержали з кадрів у RGB форматі – 0,925. Отже, КАД на основі AdaBoost класифікатора дає можливість

ефективно діагностувати циротичні зміни в 69,0 % та метастатичне ураження – в 92,7 % випадків. Коректна діагностика за допомогою класифікатора на основі ознак Хаара була найвищою у випадку діагностики метастатичного ураження та становила 0,701 та 0,717 під час навчання з використанням RGB і HSV форматів зображень відповідно.

**Висновки.** Класифікатор на основі ознак Хаара є менш ефективним порівняно з класифікатором AdaBoost, що навчений за MCLBT-дескрипторами під час вирішення питань автоматизованої діагностики стану печінки. За допомогою класифікаторів, котрі застосовані, метастатичне ураження діагностується ефективніше порівняно з циротичними змінами печінки.

## Эффективность автоматизированной лапароскопической диагностики патологии печени при использовании разных методов классификации цифровых изображений

Д. Н. Баязитов, Н. В. Кресюн, А. Б. Бузиновский, Н. Р. Баязитов, А. В. Ляшенко,  
Л. С. Годлевский, Т. В. Приболовец, Е. А. Биднюк

Компьютерная автоматизированная диагностика (КАД)/классификация видеоизображений является актуальной в лапароскопической хирургии. Подобные КАД используются интраоперационно во время лапароскопического вмешательства для поддержки принятия решений хирургом.

**Цель работы** – оценить эффективность КАД, созданных на базе двух классификаторов: каскадного классификатора признаков Хаара и AdaBoost при диагностике цирротических изменений печени и её метастатического поражения.

**Материалы и методы.** Создание КАД проводилось путём обучения каскадного классификатора признаков Хаара и AdaBoost изображениями/кадрами, которые были получены из видеоряда, зарегистрированного во время лапароскопической диагностической процедуры. Кадры, полученные в RGB формате шкалы цветности обрабатывали путём гамма-коррекции и трансформировали в шкалу HSV, после чего оба типа кадров применяли для обучения. С помощью модифицированного метода локальных бинарных паттернов (LBT), который включал показатели цветности («модифицированный по цветности LBT» – MCLBT), а также характеристики текстуры, определяли дескрипторы, которыми проводили обучение AdaBoost классификатора. В целом для обучения каждого классификатора использовали 1000 изображений с подтверждёнными диагнозами и 500 – с их отсутствием для каждой формы патологии печени. После окончания обучения проводили контрольное тестирование и определяли эффективность диагностики применённых классификаторов. При этом для тестирования использовали изображения, которые не применялись во время обучения: 319 изображений цирротично изменённой и 253 изображения метастатических изменений поверхности печени, а также 365 изображений печени без патологических изменений.

**Результаты.** Контрольное тестирование показало, что наиболее высоким показателем полноты диагностики цирроза печени был при использовании AdaBoost классификатора, который обучен с помощью MCLBT-дескрипторов, полученных при обработке кадров в HSV формате – 0,655, а также при диагностике метастатического поражения печени – при использовании MCLBT-дескрипторов, полученных при обработке кадров в RGB формате – 0,925. Таким образом, КАД на основе AdaBoost классификатора позволяет эффективно диагностировать цирротические изменения в 69,0 % и метастатические поражения – в 92,7 % случаев. Корректная диагностика с применением классификатора на основе признаков Хаара была наиболее высокой в случае диагностики метастазов и составляла 0,701 и 0,717 при обучении с применением RGB и HSV форматов изображений соответственно.

**Выводы.** Классификатор на основе признаков Хаара менее эффективен в сравнении с классификатором AdaBoost, который обучали с помощью MCLBT-дескрипторов при решении вопросов автоматизированной диагностики состояния печени. С помощью применённых классификаторов метастатические изменения диагностируются более эффективно в сравнении с циррозом печени.

**Ключевые слова:** заболевания печени, лапароскопия, диагностическое изображение, изображения обработка компьютерная.

**Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 182–187**

Computer automatic diagnostic (CAD)/classification of videoimages is actual for minimal invasive abdominal surgery and endoscopy [1–5]. CAD systems are intensively developed for tracking laparoscopic instrumentation [6], identification of zones of pathology [4,7,8] and the diminution the risk of damage of healthy tissues [2]. Thus, A. Lahane et al. [2] used series of computer vision algorithms to track surgical instruments and coarse location of the cystic artery. It indicates the possibility of an injury to the cystic artery by automatically detecting the proximity of the surgical instruments with respect to the cystic artery [2].

Some peculiarities were stressed for video-laparoscopic images automatic classification [5]. Thus, authors pointed on the absence of tangible differences in elements of images as a result of rather high level of noise and lack of lightness. Besides, another obstacle, which complicates the CAD is confined to high variability of the shape of objects, which are searching for. Also the majority of pixels contain prevalently red color hues, which reduced their

informative significance. The quick change of the angle of object along with changes of their illumination and specular reflections significantly impact on the result of automatic recognition [5]. Hence, the usage of gamma-correction in the course of preprocessing of primarily gathering information, which permits to identify relations between quantitative pixel characteristics and their actual brightness is justified [4].

Taking into consideration the necessity of fast working of algorithm for video-data analysis, it is reasonable to explore classifier based on Haar-features cascade [6]. Haar features system first time proposed by [9] for face recognition was described in details in a lot of works, including those ones devoted to tracking of laparoscopic instrumentation [6]. Exploration of Haar features presumes the investigation of the sum of pixels intensity after broking initial image into rectangular tile regions or windows [6]. Hence, exclusion the process of analyzing each pixel of an image separately saves

the time for analysis and makes the process of recognition congruent with the flowing of videoframes. For each window the sum of pixel intensities in adjacent windows is calculated and the difference is taken between those regions and the window in question. Obtained difference is indicative for the classification of the target window which is necessary for the comparison of gained data with those ones presented in the library specially composed for the training of the Haar cascade classifier. Hence, critical step for gaining results is confined to the correct creation of the library of Haar-features which provides with maximal versions of divergent appearance of pathological process in target zone.

The training of Haar features based cascade needs a lot of time which might be measured in months when tens of thousands of images are used [6]. That is clear disadvantage of the method and it is hard to avoid it as far as increasing the number of images is proportional to the effectiveness of diagnostics [6].

We have chosen the two versions of pathology with relatively low for the CAD – suspicion of focal metastatic damage of liver and suspicion of cirrhotic deteriorations of the liver. Such an approach permits to minimize the size of zone of interest as well as to avoid to some extent the drastic visual variability of pathological appearance. Besides, we hoped to get most informative and few/least numerous descriptors of texture, color and shape of pathological zones.

Texture features extracted from pathological endometrium were different from normal one, and were characterized by lower image intensity, while variance, entropy and contrast gave higher values [4]. Thus, for the hysteroscopic images the heightened mediana of grey scale is clearly identified and along with more homogenous and less contrast might be treated as informative differential index for normal state identification [4]. That is why we decided to use both color and texture features for training Haar-features based classifier. Besides, as an alternate to Haar features-based classifier we have explored AdaBoost classifier trained with minimal number of descriptors gained from Local Binary Pattern (LBP) method application. The classical method of LBP manipulates with grey scale of color and ignores other colors information. Instead of the modified LBP method, which includes data on color characteristics (modified color LBP – MCLBT) [11, 12] was used in the present investigation for gaining color and texture descriptors [3, 13].

**The main aim** of this work was to work out and to compare the effectiveness of CAD based on Haar-features cascade classifier with AdaBoost – based CAD and which were trained to distinguish between normal and pathological state of liver being damaged with metastases or cirrhosis.

## Materials and methods

The next steps were performed in the course of collecting data and their analysis:

- Calibration of digital camera, which included white balance and conversion of color scale into digital code; that was performed in accordance to instructions of camera's manufacturer;

- The frontal position of the object which was under inspection with deviation from right angle up to  $15 \pm 5^\circ$  and distance to visualized zone from 3 to 5 cm was used [4]; those images which have been got in a such a fashion were used for both CAD system training and testing;

- There is no documentation for OpenCV that describes what size the positive samples should be scaled to. Some tutorials suggest using sizes around 20 x 20 or pixels for face recognition or 24 x 24 pixels for polyps endoscopic diagnostics [7]. In our investigation those zones which have been of interest from diagnostic point of view have been identified off-line with their size 60 x 60 pixels and used for training of classifier; in the course of laparoscopic intervention the speed of video frames was modified via using the low frequency filter and size of image was artificially modified from 30 x 30 up to 60 x 60 pixels, which was necessary for optimizing classificatory performance.

- Gamma-correction performing of gained image with the recalculation of gamma-coefficient;

- Conversion of RGB scale into HSV one; such a conversion was justified by orientation of Haar features on the estimation of the intensity of pixels;

The OpenCV library contains a built-in function for developing this library via Haar feature classifiers [10]. We have used the next OpenCV modules in our work: 1) OpenCV\_core – for basic calculations, generation of pseudorandom numbers, XML import/export e. c.; 2) OpenCV\_imgproc – images processing; 3) OpenCV\_highgui – simple UI, upload/storage of images and video; 4) OpenCV\_ml – methods and models of adaboost training; 5) OpenCV\_video – movement analysis and tracking (optical stream, templates of movement, background abolishing; 6) OpenCV\_objdetect – detection of the objects on images (Haar, HOG e. c.); 7) OpenCV\_calib3d – camera calibration.

- Training to Haar features, using both RGB and HSV images.

- Training AdaBoost classifier with MCLB templates [14]; in both cases key features, which were used, were confined to mean, entropy, contrast, homogeneity and excesses.

- Results of classification were stored at data base which permitted to perform additional analysis later on.

All the laparoscopic videos were got with laparoscopic camera with 5 mm aperture diameter “Carl Storz Tricam Camera (Carl Storz, Germany) during 2011–2016 years. That camera had the analogous input (PAL 475 horizontal lines) and incoming signal was digitalized with the pixel density of 720 x 576 and capture was made with video capture card “averMedia HD capture Studio 203” (Avermedia, France) and presented at CAD interface (Fig. 1).

Criteria (both technical and medical), which have been used for the inclusion were the next: documented digital camera calibration made in accordance to the manufacturer instruction; the average severity of patient's state and approving of diagnoses by results of clinician and laboratory and instrumental investigations.

*Features extraction and classifiers training.* Being applied to RGB scale MCLBT calculates LBT for R and G channels of normalized RGB color space [11, 12].



The more stable data were provided with RGB–MCLBT under different conditions of illumination intensity as far as after normalization the invariant state of “R” and “G” channels was achieved.

The texture characteristics calculation using HSV–MCLBT was performed via recalculations on Hue channel, which was invariant with regard to illumination and saturation variability. For LBT calculation the radius of 1.5 and 12 pixels was applied [12]. The pertinent pattern was created for each of scale vector, as a result and the characteristic vector was determined for templates of MCLBT, which included mean, entropy, contrast, homogeneity and excesses.

For the training of classifiers 32 laparoscopic video-images patients with metastatic liver damage and 35 with cirrhosis were used as “positive” ones (Fig. 2). Also for the classifier training 40 videos gained from normal liver surface were used as a control – “negative” images. Each video was classified in accordance to final diagnoses, which have been proved with clinical and instrumental methods of diagnostics or/and with histological data. Hence, in all the cases training was performed retrospectively.

Each video contained 2500–3000 frames, among which manually those ones for teaching and testing collections were verified, cropped out and storage.

For the classifiers training the next parameters were explored:

- False positive rate  $f = 0.3$ ;
- Windows with the size of frame as  $60 \times 60$  pixels;
- Number of positive images –  $n = 1000$  for each pathology;
- Number of negative images –  $n = 500$ .

After cessation of training the tests were performed with the aim of the estimation of effectiveness of recognition.

Test session images were different from those ones which have been used for training of the classifier. Test control sessions were performed with 319 frames containing cirrhotic and 253 frames with metastatic deteriorations in liver tissue. 365 frames with the absence of mentioned pathology was used as a control group – practically healthy liver state.

**Statistical procedures.** To assess the performance of our classifiers, we use the measures precision, recall and F-score [7].

Precision measures the fraction of the detected-positive instances, which are true-positive:

$$\text{Precision} = TP / (TP + FP).$$

TP is the number of true-positive instances, FP is the number of false-positive instances.

Recall is the fraction of all true-positive instances, which are also detected positive. The formula for calculating the recall is:

$$\text{Recall} = TP / P.$$

P is the number of positive instances.

F-score (also F-measure or F1-score) is the harmonic mean of precision and recall. It is thereby a combination of these two measures in a single number.



Fig. 1. Interface of the CAD software.

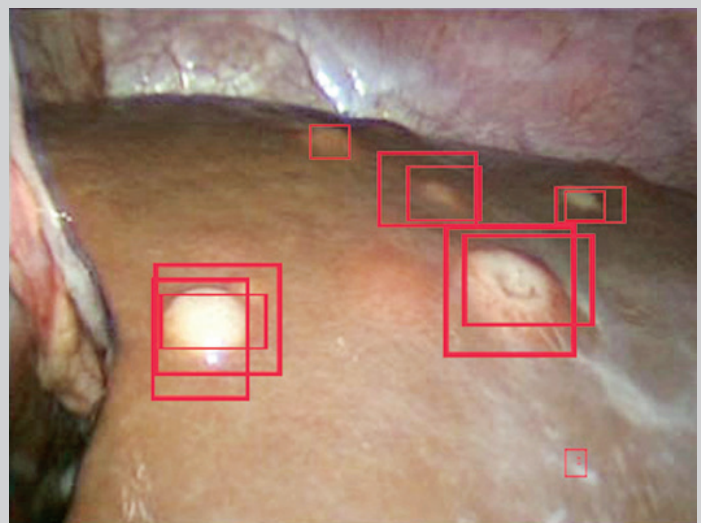


Fig. 2. General scheme on the CAD working. With the squares “zones of interest” are automatically defined and tracked.

$$F = 2 * \text{Precision} * \text{Recall} / (\text{Precision} + \text{Recall}).$$

In several sections, the measure accuracy is used as well. Accuracy is the proportion of correctly classified items out of all the items classified.

$$\text{Accuracy} = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN).$$

TN is the number of true-negative, FN is the number of false-negative instances.

## Results

Gained data revealed that the effectiveness of diagnostics of cirrhosis was lower than diagnostics of metastasis independently of type of frames which have been used for training (Table 1). The highest recall for cirrhosis diagnostics was registered after training with MCLBT obtained from HSV converted images – 0.655, while for metastasis diagnostics recall for RGB–MCLBT was higher than for HSV–MCLBT – 0.925 and 0.913 respectively.

**Table 1.** Detector performance of HAAR features-based and AdaBoost classifiers trained with different types of images

Classifier	Frames type used for training	True positive	True negative	False positive	False negative	Precision	Recall	F1 Score	Accuracy
Cirrhosis									
Haar-features cascade	RGB	133	225	140	186	0.487	0.417	0.450	0.523
	HSV	162	202	163	157	0.498	0.508	0.503	0.532
AdaBoost	MCLBT (RGB)	206	280	85	113	0.708	0.524	0.602	0.711
	MCLBT (HSV)	209	263	102	110	0.672	0.655	0.663	0.690
Metastasis									
Haar-features cascade	RGB	166	267	98	87	0.629	0.656	0.642	0.701
	HSV	173	270	95	80	0.645	0.684	0.664	0.717
AdaBoost	MCLBT (RGB)	234	339	26	19	0.900	0.925	0.912	0.927
	MCLBT (HSV)	231	327	38	22	0.859	0.913	0.895	0.903

Nevertheless for both types of pathology MCLBT-based methods permitted to get better diagnostics results in comparison with the based on RGB and HSV images training of classifier.

The presence of rather low level of true positive results of diagnostics in case of training with RGB and HSV images independently of type of pathology should be stressed (Table 1). Further extraction of features and training with corresponded templates permitted to increase number of true positive results of diagnostics along with reduction of false negative results. Thus, the net increase of true positive diagnoses in case of MCLBT usage for training pertained to training with both RGB and HSV images was from 1.3 up to 1.5 times for both pathology, while decrease of false negative diagnoses was from 1.65 (RGB) to 1.42 (HSV) for cirrhosis and reduction of false negative diagnoses achieved from 4.57 times (RGB) to 3.64 times (HSV).

## Discussion

Hence, gained data are in favor for the rather high effectiveness of automatic diagnostics of liver pathology with the created CAD.

Meanwhile, it was mentioned that only Haar-like feature based classifier is not enough to be a strong object classifier as far as it needs prolonged recalculation of features for robust detection of image [6]. Our results also have revealed that training with RGB and HSV images was less effective for proper diagnostics, especially in case of cirrhotic deteriorations detection. That might be a sign of rather weak potential of HAAR features based classifier for the correct recognition of suspected pathology. Thus, work performed by [7] which was devoted to automatic diagnostics colon polyps via endoscopic images analysis revealed that usage of Haar-features or Histogram of oriented Gradients based detectors were weak for reliable colon polyps automatic detection. Much more effective was an approach based on Global image feature such as Joint Composite Description, which permitted to gain precision of diagnostics of 93.3 % and weighted average recall of 98.5 %. Main reasons for not satisfactory results were the enormous variety of appearance of such lesions and their orientation. It should be noted that both factors are not so important and are rather well controllable in the course of laparoscopic intervention. That justifies our efforts in the direction of improving effectiveness of diagnostic which is based on Haar-features detectors.

Training with modified templates of both RGB and HSV images and minimal MCLBT derived descriptors substantially improved results of classification performed with AdaBoost classifier. Thus, MCLBT descriptors which were got both from HSV and RGB images permitted to reduce number of false negative diagnoses from 3.64 times to 4.57 times when pertained to the results of diagnostics of metastatic liver damage after training with only HSV or RGB – derived HAAR features correspondently. Less pronounced reduction was observed in case of diagnostics of cirrhosis – from 1.2 (HSV) to 1.65 (RGB) times. At the same time increasing the number of true positive diagnoses was more modest and raised up to from 1.3 to 1.5 times for both cirrhosis and metastases. A little bit better results gained with RGB images to some extent correspond with data after [15]. Authors showed the preference of RGB images for tissue classification, when used with widely applied feature descriptors and that combining the tissue texture with the reflectance spectrum improves the classification performance.

Hence, more pronounced improvement – reduction of false negative results points on meaningful role played by extracted features and used templates for classifier training. Despite main advantage of Haar features based classification, namely – small amount of data used for the machine learning process as well as avoiding overfitting of trained classifier [7], the exploration of MCLBT-based training of AdaBoost should be recognized as more effective for laparoscopic CAD of liver state. This result does not exclude principal possibility of high effectiveness of cascade classifier trained with MCLBT descriptors as well and AdaBoost trained with Haar descriptors [3,11].

Today we have no strict recommendations on the protocol of automatic classification of laparoscopic video-images. Meanwhile, being based upon delivered data it is reasonable to use MCLBT descriptors for AdaBoost classifier training for resolving problems of automatic diagnostics in laparoscopic surgery.

## Conclusions

1. The CAD of laparoscopic images based on the AdaBoost classifier permitted effectively classify cirrhotic and metastatic deterioration in liver tissue with highest recall gained with MCLBT from HSV images used for training – up to 0.672, and for MCLBT RGB – up to 0.912 correspondently.

2. MCLBT used descriptors for training AdaBoost classifier proved to increase the precision, recall, F1 score as well as accuracy of automatic diagnostics of cirrhotic and metastatic changes in liver.

**Perspectives of future investigations.** It is supposed to continue training of both classifiers with increased number of laparoscopic images and with extended forms of laparoscopy – defined pathology. Also the exploration of best version of developed CAD is supposed to perform in operation room.

## References

- [1] Boisvert, J., Cheriet, F., & Grimard, G. (2003). Segmentation of laparoscopic images for computer assisted surgery. *Lecture Notes in Computer Sciences*, 2749, 587–594.
- [2] Lahane, A., Yesha, Y., Grasso, M., Joshi, A., Park, A., & Lo, J. (2012). Detection of unsafe action from laparoscopic cholecystectomy video. *Proc. 2nd ACM SIGMINT International Health Informatics Symposium*. (P. 315–322).
- [3] Lyashenko, A. V., Bayazitov, N. R., Godlevsky, L. S., Bayazitov, D. N., & Buzynovskiy, A. V. (2016). Informatsiino-tekhnichna systema avtomatyzovanoi laparoskopichnoi diahnozyky [Informational-technical system for the automatized laparoscopic diagnostics]. *Radioelektronika, informatyka, upravlinnia*, 4, 90–96. [in Ukrainian].
- [4] Neofytou, M. S., Tanos, V., Constantinou, I., Kyriacou, E. C., Pattichis M. S., & Pattichis, C. S. (2015). Computer-aided diagnosis in hysteroscopic imaging. *IEEE J Biomed Health Inform*, 19(3), 1129–1136. doi: 10.1109/JBHI.2014.2332760.
- [5] Shu, Y., Bilodeau, G. A., & Cheriet F. (2005). Segmentation of laparoscopic images: Integrating graph-based segmentation and multistage region merging. *Proc 2nd Canadian Conference on Computer and Robot Vision (CRV'05)*. doi: 10.1109/CRV. 2005.74.
- [6] Fatiev, D. (2015). Faculty of Science and Technology Department of Computer Science Object tracking for improved telementoring and telestration. INF-3997 Master's Thesis in Telemedicine and E-health, The Arctic University of Norway.
- [7] Albisser, Z. (2015). Computer-aided screening of capsule endoscopy videos. Master's Thesis, University of Oslo.
- [8] Zhou, M., Bao, G., Geng, Y., Alkandari, B., & Li, X. (2014). Polyp detection and radius measurement in small intestine using video capsule endoscopy. *Proc 7th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI)*, 237–241. doi: 10.1109/BMEI.2014.7002777.
- [9] Viola, P., & Jones, M. (2001). Rapid object detection using a boosted cascade of simple features. *Proc IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 1, 511–518. doi: 10.1109/CVPR.2001.990517.
- [10] Bouquet, J. (2000). Pyramidal implementation of the Lucas-Kanade feature tracker: description of the algorithm, openCV documentation. Retrieved from <http://www.intel.com/research/mlr/research/opencv>.
- [11] Zhu, C., Bichot, C. E., & Chen, L. (2010). Multi-scale color local binary patterns for visual object classes recognition. *Proc ICPR*, 3065–3068. doi: 10.1109/ICPR.2010.751.
- [12] Ledoux, A., Losson, O., & Maccare, L. (2016). Color local binary patterns: compact descriptors for texture classification. *Journal of Electronic Imaging, Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*, 25(6), 061404.
- [13] Ojala, T., Pietikainen, M., & Maenpaa, T. (2002). Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24(7), 971–987. doi: 10.1109/TPAMI.2002.1017623.
- [14] Bay, H., Tuytelaars, T., & Van Gool, L. (2006). Surf: Speeded up robust features. *ECCV 2006: Computer Vision – ECCV 2006*, 3951, 404–417.
- [15] Parent, F., Mandal, K. K., Loranger, S., Hideki, E., Fernandes, W., Kashyap, R., & Kadoury, S. (2016). 3D shape tracking of minimally invasive instruments using optical frequency domain reflectometry. *Proc of SPIE*, 9786, doi: 10.1117/12.2214998.

## Information about author:

Bayazitov D. N., Postgraduate Student, Surgery Department, Odesa National Medical University, Ukraine.  
Kresyun N. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Ophthalmology Department, Odesa National Medical University, Ukraine.  
Buzinovskiy A. B., Postgraduate Student, International Center on Researches and Education in the Field of Informational Technologies and Systems, National Academy of Sciences and

Ministry of Education of Ukraine, Kyiv, Surgeon in Odesa Regional Clinic Hospital, Ukraine.

Bayazitov N. R., MD, PhD, DSc, Professor of Surgery Department, Odesa National Medical University, Ukraine.

Lyashenko A. V., Assistant Professor, Department of Biophysics, Informatics and Medical Devices, Odesa National Medical University, Ukraine.

Godlevsky L. S., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Biophysics, Informatics and Medical Devices, Odesa National Medical University, Ukraine.

Prybolovets T. V., Senior Lecturer, Department of Biophysics, Informatics and Medical Devices, Odesa National Medical University, Ukraine.

Bidnyuk K. A., MD, PhD, Senior Lecturer, of Biophysics, Informatics and Medical Devices, Odesa National Medical University, Ukraine.

## Відомості про авторів:

Баязітов Д. М., аспірант каф. хірургії, Одеський національний медичний університет, Україна.

Кресюн Н. В., д-р мед. наук, професор каф. офтальмології, Одеський національний медичний університет, Україна.

Бузиновський А. Б., аспірант Міжнародного науково-навчального центру інформаційних технологій та систем НАН і МОН України, м. Київ, хірург КП «Одеська обласна клінічна лікарня», Україна.

Баязітов М. Р., д-р мед. наук, професор каф. хірургії, Одеський національний медичний університет, Україна.

Ляшенко А. В., асистент каф. біофізики, інформатики та медичної апаратури, Одеський національний медичний університет, Україна.

Годлевський Л. С., д-р мед. наук, професор, зав. каф. біофізики, інформатики та медичної апаратури, Одеський національний медичний університет, Україна.

Приболовеч Т. В., старший викладач каф. біофізики, інформатики та медичної апаратури, Одеський національний медичний університет, Україна.

Біднюк К. А., канд. мед. наук, старший викладач каф. біофізики, інформатики та медичної апаратури, Одеський національний медичний університет, Україна.

## Сведения об авторах:

Баязитов Д. Н., аспирант каф. хирургии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Кресюн Н. В., д-р мед. наук, профессор каф. офтальмологии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Бузиновский А. Б., аспирант Международного научно-учебного центра информационных технологий и систем НАН и МОН Украины, г. Киев, хирург КП «Одесская областная клиническая больница», Украина.

Баязитов Н. Р., д-р мед. наук, профессор каф. хирургии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Ляшенко А. В., ассистент каф. биофизики, информатики и медицинской аппаратуры, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Годлевский Л. С., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. биофизики, информатики и медицинской аппаратуры, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Приболовец Т. В., старший преподаватель каф. биофизики, информатики и медицинской аппаратуры, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Биднюк Е. А., канд. мед. наук, старший преподаватель каф. биофизики, информатики и медицинской аппаратуры, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 30.03.2017

Після доопрацювання / Revised: 02.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 05.06.2017

## Персоналіфікація періопераційного біомоніторингу

О. Н. Бойцова

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

### Ключевые слова:

безопасность  
больного,  
интра-  
операционный  
мониторинг,  
кальций-  
связывающий  
белок S100,  
фосфофрукто-  
гидратаза  
(энзолаза).

Патология. – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 188–192

DOI:  
10.14739/2310-1237.  
2017.2.109663

E-mail:  
Olesyaboitsova1@  
gmail.com

Количество методов періопераційного моніторингу постійно зростає завдяки досягненням сучасної науки. Однак збільшення кількості показників, що монітуються, і впровадження новітніх моніторингових систем не стало гарантом виключення періопераційних ускладнень. Стандартний моніторинг дає змогу контролювати найбільш загальні характеристики гомеостазу внутрішнього середовища організму, які є тільки запізними відбиттями змін енергоструктурної активності в масі клітин тіла хворого. Тому тривалість життя оперованих хворих не досягає середньостатистичної демографічної.

**Цель работы** – улучшение результатов лечения пациентов с острой абдоминальной хирургической патологией путём придания періопераційному забезпеченню енергопротективної спрямованості на основі персоналізованого енергоструктурного моніторингу.

**Материалы и методы.** Работа выполнена по результатам изучения энергопротективной способности анестезиологического обеспечения и періопераційної інтенсивної терапії 317 больных с острой абдоминальной хирургической патологией. На всех этапах анестезиологического обеспечения проводилась оценка глубокой картины показателей кислородного режима, непрямого определения основного обмена, транспорта кислорода, кислотно-основного, водно-электролитного состояния, показателей гемодинамики и микроциркуляции, определение надёжности энергоструктурной активности (ЭСА), её свойств, резервов и возможностей ауторегуляции. Дополнительно на основных періопераційних етапах у 30 больных определяли маркеры ишемии головного мозга: белок S100 и NSE (нейронспецифическая энзолаза) в сыворотке венозной крови методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Установлена тесная корреляционная зависимость между ранними проявлениями повреждений нейронов и клеток астроглии с энергоструктурными изменениями в организме больных. Наиболее сильная корреляционная взаимосвязь наблюдалась между энергоосмолярной ауторегуляцией и уровнями маркеров ишемии головного мозга ( $p < 0,01$ ). Включение в біомоніторинг как его компонента енергоструктурной активности, её свойств, резервов, эффективности ауторегуляции позволяет даже в отсутствие дорогостоящих и трудоёмких исследований нейроспецифических белков иметь представление о степени повреждения клеток головного мозга.

**Выводы.** Дополнение стандартов періопераційного біомоніторингу аудитом енергоструктурной активности (ЭСА) позволит не только своевременно выявлять изменения энергопродуктивной способности массы клеток тела (МКТ) больного, но и повысить періопераційную безопасность путём применения опережающей тактики лечения.

### Ключові слова:

безпека хворого,  
інтраопераційний  
моніторинг,  
кальцій-  
зв'язувальний  
білок S100,  
фосфопіруват-  
гідратаза (ензолаза).

Патология. – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 188–192

## Персоналіфікація періопераційного біомоніторингу

О. М. Бойцова

Кількість методів періопераційного моніторингу постійно зростає завдяки досягненням сучасної науки. Однак збільшення кількості показників, що монітуються, і впровадження новітніх моніторингових систем не стало гарантом виключення періопераційних ускладнень. Стандартний моніторинг дає змогу контролювати найбільш загальні характеристики гомеостазу внутрішнього середовища організму, які є тільки запізними відбиттями змін енергоструктурної активності в масі клітин тіла хворого. Тому тривалість життя оперованих хворих не досягає середньостатистичної демографічної.

**Мета роботи** – поліпшення результатів лікування пацієнтів із гострою абдоминальною хірургічною патологією шляхом надання періопераційному забезпеченню енергопротективної спрямованості на основі персоналізованого енергоструктурного моніторингу.

**Матеріали та методи.** Робота виконана за результатами вивчення енергопротективної здатності, анестезіологічного забезпечення та періопераційної інтенсивної терапії 317 хворих із гострою абдоминальною хірургічною патологією. На всіх етапах анестезіологічного забезпечення здійснили оцінювання глибокої картини показників кисневого режиму, непряме визначення основного обміну, транспорту кисню, кислотно-лужного, водно-електролітного стану, показників гемодинаміки та мікроциркуляції, визначення надійності енергоструктурної активності (ЕСА), її властивостей, резервів і можливостей ауторегуляції. Додатково на основних періопераційних етапах у 30 хворих визначали маркери ішемії головного мозку: білок S100 та NSE (нейронспецифічна ензолаза) в сироватці венозної крові методом імуноферментного аналізу.

**Результати.** Встановлено тісну кореляційну залежність між ранніми проявами ушкоджень нейронов і клітин астроглії з енергоструктурними змінами в організмі хворих. Найсильніший кореляційний взаємозв'язок спостерігається між енергоосмолярною ауторегуляцією та рівнями маркерів ішемії головного мозку ( $p < 0,01$ ). Включення до біомоніторингу як його компонента енергоструктурної активності, її властивостей, резервів, ефективності ауторегуляції дає можливість навіть за відсутності дорогих і трудомістких досліджень нейроспецифічних білків мати уявлення про ступінь пошкодження клітин головного мозку.

**Висновки.** Доповнення стандартів періопераційного біомоніторингу аудитом енергоструктурної активності (ЕСА) дасть можливість не тільки своєчасно виявляти зміни енергопродуктивної здатності маси клітин тіла (МКТ) хворого, а й підвищити періопераційну безпеку шляхом застосування випереджувальної тактики лікування.

## Personification of perioperative biomonitoring

O. N. Boitsova

The number of perioperative monitoring methods is constantly increasing due to the achievements of modern science. However, an increasing number of indicators for monitoring and introduction of the newest monitoring systems was not enough to guarantee the exclusion of perioperative complications. Standard monitoring allows us to control the most common characteristics of homeostasis, the internal environment of the body, which are only a belated reflection of changes in energy-structural activity in the mass of cells in the patient's organism. Therefore, the life expectancy of operated patients does not reach the average life expectancy of the population.

**Aim.** Improvement in treatment results of patients with acute abdominal surgical pathology, by energy-protective perioperative management, based on personified energy-structural monitoring.

**Materials and methods.** The research was performed on the results of the study of energy-protective ability, anesthetic management and perioperative intensive care of 317 patients with acute abdominal surgical pathology. At all the stages of anesthesia management we analyzed the oxygen regime features, acid-base and water-electrolyte status, basal metabolic rate, indicators of oxygen transport, central hemodynamics and microcirculation, reliability of energy-structural activity (ESA), its properties, reserves and possibilities for autoregulation. Brain ischemia markers levels, neurospecific proteins S100 and NSE (neuron specific enolase) were additionally determined in venous blood serum by enzyme immunoassay at the main stages of monitoring.

**Results.** A close correlation has been established between early manifestations of neurons and glial cells damage and energy-structural changes in patient's organism. The strongest correlation is observed between energy-osmolar autoregulation and levels of cerebral ischemia markers ( $p < 0.01$ ). Inclusion of energy-structural activity, its properties, reserves, efficiency of autoregulation in biomonitoring, as its component, allowed knowing the degree of brain cells damage even in the absence of expensive and laborious studies of neurospecific proteins.

**Conclusions.** Supplementing the standards of perioperative biomonitoring with an audit of energy-structural activity (ESA) will allow not only to identify changes in the energy-productive capacity of the patient's body cell mass on time, but also to increase perioperative safety by using of advanced treatment strategy.

### Key words:

patient safety, intraoperative monitoring, S 100 calcium binding protein beta subunit, phosphopyruvate hydratase.

### Pathologia

2017; 14 (2), 188–192

Количество методов периоперационного мониторинга постоянно увеличивается благодаря достижениям современной науки [1]. Классический вариант мониторинга включает в себя контроль показателей гемодинамики, вентиляции, оксигенации, водного баланса, термометрию [2]. Дополнительно используется мониторинг состояния центральной нервной системы, нейромышечной проводимости, уровня анальгезии. Однако увеличение количества мониторируемых показателей и внедрение новейших мониторинговых систем не явилось гарантией исключения периоперационных осложнений [3–5]. Поэтому продолжительность жизни оперированных больных не достигает среднестатистической демографической [6,7]. Стандартный мониторинг позволяет контролировать наиболее общие характеристики гомеостаза внутренней среды организма, которые являются лишь запоздалым отражением изменений энергоструктурной активности в массе клеток тела больного, и не даёт энергопротективной направленности периоперационному анестезиологическому обеспечению пациентов [8,9].

### Цель работы

Улучшение результатов лечения пациентов с острой абдоминальной хирургической патологией путём придания периоперационному обеспечению энергопротективной направленности на основе энергоструктурного мониторинга.

Задачи исследования. 1. Улучшить мониторинг периоперационной безопасности, используя аудит энергоструктурной активности в массе клеток тела больного.

2. Персонифицировать методику периоперационного биомониторинга, основываясь на определении

надёжности энергоструктурной активности, достаточности её резервов, динамики свойств и возможностей ауторегуляции.

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена по результатам изучения энергопротективной способности, анестезиологического обеспечения и периоперационной интенсивной терапии 317 больных. В исследование включены пациенты в возрасте от 18 до 88 лет. Среди них мужчин 132 (42%), женщин 185 (58%). Всем пациентам были выполнены оперативные вмешательства в экстренном и срочном порядке по поводу острой абдоминальной хирургической патологии. Постановка диагноза проводилась в соответствии с существующими стандартами. Общее количество операций составило 349. Операционно-анестезиологический риск оценивали по шкале физического статуса ASA и по уровню энергоструктурной активности [10]. Продолжительность операций варьировала от 35 до 190 минут, продолжительность анестезий – от 50 до 240 минут.

На всех этапах анестезиологического обеспечения проводилась оценка глубокой картины показателей кислородного режима (артерио-венозной разницы потребности (Сх, мл/л) и фактора компенсации потребности в транспорте кислорода (Qx, усл. ед.)), непрямоe определение основного обмена ( $OO = VO_2 \cdot 7,07$ , ккал/сут), транспорта кислорода, кислотно-основного, водно-электролитного состояния, показателей гемодинамики и микроциркуляции. Мониторинг гемодинамики и сатурации артериальной крови проводили аппаратом «ЮТАС-ЮМ-300». Газовый состав крови и параметры кислотно-основного состояния определяли с помощью аппарата ABL 800 FLEX (Radiometr, Дания).

**Таблиця 1.** Динамика параметров энергоструктурной активности и уровня нейроспецифических белков у пациентов с исходно нормальными маркерами ишемии головного мозга

Параметры	Этапы	Исход	Конец операции	1 сутки
Безопасность, %		3 [2;8]	–	–
Опасность, %		–	9 [6;17]*	10 [5;18]**
Миокардиальный резерв, %		9 [5;23]	14 [12;32]*	15 [10;26]**
Кислородно-транспортная недостаточность, %		11 [8;12]	20 [9;23]**	19 [17;25]**
Микроциркуляторно-митохондриальная недостаточность, %		10 [7;11]	16 [8;19]**	16 [14;20]**
Энергоосмолярная стабилизация, %	101 [100;102]	–	–	–
Гипоосмолярная дестабилизация, %	–	–	7 [6;8]**	7 [5;8]**
Гемодинамическая стабилизация, %	101 [100;102]	101 [100;102]	–	–
Систолическая дестабилизация, %	–	–	–	5 [4;7]
Адаптивность, %	126 [121;129]	118 [110;124]**	122 [113;126]**	–
Стабильность, %	106 [103;108]	–	–	–
Нестабильность, %	–	–	16 [8;19]**	16 [14;20]**
Адекватность, %	90 [89;97]	84 [82;92]**	84 [81;89]**	–
S 100, нг/л	76,31 [60,04;87,15]	78,12 [63,65;125,3]	96,19 [81,73;167,1]*	–
NSE, мкг/л	1,88 [1,09;4,45]	11,84 [2,57;23,49]**	8,79 [2,57;36,02]**	–

Данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей Me [k25 %; k75 %].  
\*: p < 0,05 в сравнении с исходными данными; \*\*: p < 0,01 в сравнении с исходными данными.

По общепринятым формулам рассчитывали содержание кислорода в артериальной и венозной крови (CaO<sub>2</sub> и CvO<sub>2</sub>, мл/л), артерио-венозную разницу по кислороду (avO<sub>2</sub>, мл/л), доставку и потребление кислорода (DO<sub>2</sub> и VO<sub>2</sub>, мл/мин\*м<sup>2</sup>). Сердечный выброс определяли методом, предложенным И. Б. Заболотских и соавторами (патент № 2186520 (РФ) А61В5/029, 2002), который является высокоточным и позволяет получать данные, максимально приближенные к реальности в режиме реального времени. Все исследуемые показатели сравнивали с должными величинами, которые рассчитывались с учётом возраста, пола, роста и веса каждого пациента. Так как энергоструктурная стабильность организма определяется его потребностью в потреблении кислорода и зависит от возможностей систем жизнеобеспечения удовлетворить эту потребность, на всех периоперационных этапах проводили определение надёжности энергоструктурной активности (ЭСА), её свойств (адаптивности, стабильности, адекватности), резервов (миокардиального, кислородно-транспортного, микроциркуляторно-митохондриального) и эффективности ауторегуляции (гемодинамической, энергоосмолярной) [6]. Надёжность (уровень) энергоструктурной активности определяли путём сравнения интенсивности текущей энергопродукции с уровнем должного основного обмена.

Дополнительно у 30 больных определяли маркеры ишемии головного мозга: белок S100 и NSE (нейронспецифическая энлаза) [11,12]. Пациенты, включённые в исследование, не имели психических и острых неврологических заболеваний, злокачественных образований лёгких, меланомы, так как данные состояния сопровождаются значительным повышением уровня нейроспецифических белков, что могло повлиять на результаты проводимого исследования. Определение концентрации S100 и NSE в сыворотке венозной крови выполняли методом иммуноферментного анализа на микропланшетном фотометре

DIGISCAN с помощью диагностических наборов CanAg S100 EIA и CanAg NSE EIA (Швеция) соответственно в Центральной научно-исследовательской лаборатории Запорожского государственного медицинского университета.

Для расчёта уровня статистической значимости различий p между двумя зависимыми выборками использовался непараметрический T-критерий Вилкоксона. Для выявления и оценки тесноты связи между уровнями маркеров ишемии головного мозга и энергоструктурной активности в массе клеток тела больных использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости принимался равным 0,05. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2007» и «Statistica® for Windows 6.0».

## Результаты и их обсуждение

В зависимости от исходного уровня нейроспецифических белков больные были разделены на две группы. В первую группу вошли 13 (43,3 %) больных с исходно нормальными маркерами ишемии головного мозга, которым проводилась периоперационная терапия и анестезиологическое обеспечение с применением энергопротективных технологий. Во вторую – 17 (56,7 %) больных с исходно повышенными маркерами ишемии головного мозга, которым проводилось стандартное анестезиологическое и периоперационное обеспечение. Динамика параметров энергоструктурной активности и уровня нейроспецифических белков на основных этапах периоперационной терапии представлены в *таблицах 1, 2*. Энергоструктурный статус больных первой группы (*табл. 1*) на исходном этапе характеризовался надёжностью энергоструктурной активности, которая обеспечивала безопасность периоперационной терапии. Миокардиальный резерв сохранялся, однако отсутствовали кислородно-транспортный и микроциркуляторно-митохондриальный резервы, что указывало на тенденцию к гипознергодинамии и гипознергобиотии энергоструктурной активности. У больных отмечалась кислородно-осмолярная стабилизация, которая не допускала систолическую дестабилизацию кровоснабжения. Энергоструктурная активность характеризовалась адаптивностью, стабильностью и адекватностью энергоструктурных взаимодействий. В конце операции, а также в первые послеоперационные сутки появилась опасность энергоструктурных повреждений.

Несмотря на возросший миокардиальный резерв (p < 0,05), увеличивалась кислородно-транспортная и микроциркуляторно-митохондриальная недостаточность, что соответствовало относительному дефициту энергодинамии и дефицитной энергобиотии. Поддерживалась гемодинамическая энергопротективность, обеспечивающая устойчивость персонификации энергобиотии. Однако кислородно-осмолярная стабилизация, ответственная за поддержание цитоархитектоники, сменялась гипоосмолярной дестабилизацией. Постепенно снижались адаптивность, стабильность и адекватность энергоструктурной активности, на-

растала нестабильность. На этом фоне повысилась сывороточная концентрация S 100 и NSE ( $p < 0,01$ ).

Энергоструктурный статус больных второй группы с исходно повышенными маркерами ишемии головного мозга (табл. 2) на всех этапах периоперационного обеспечения характеризовался ненадёжностью энергоструктурной активности и опасностью энергоструктурных повреждений.

Хотя к концу операции у больных отмечалось увеличение миокардиального резерва, обеспечивающее высокую антигипоксическую и антиишемическую способность периоперационной терапии, однако в первые послеоперационные сутки у пациентов развивалась миокардиальная недостаточность. У всех без исключения больных отсутствовали кислородно-транспортный и микроциркуляторно-митохондриальный резервы. Ауторегуляция энергоосмолярной и гемодинамической энергопротективности носила дестабилизирующий характер за счёт нестабильности и деструктивности энергоструктурной активности. Появилась неадекватность энергоструктурного взаимодействия, поэтому сывороточная концентрация S 100 и NSE оставалась высокой.

Взаимосвязь параметров энергоструктурной активности и нейроспецифических белков больных обеих групп исследования представлена в таблице 3. Наиболее сильная корреляционная взаимосвязь наблюдалась между энергоосмолярной ауторегуляцией и уровнями маркеров ишемии головного мозга ( $p < 0,01$ ). Проявилась сильная обратная корреляционная связь между свойствами энергоструктурной активности, резервами (кислородно-транспортным, микроциркуляторно-митохондриальным) и уровнями S100 и NSE ( $p < 0,01$ ).

При изучении данных, полученных при исследовании больных первой и второй групп, было установлено, что при дополнении стандартного периоперационного обеспечения энергопротективными технологиями восстановление энергоструктурного статуса происходило быстрее по сравнению со стандартным анестезиологическим и периоперационным обеспечением. Изменение энергоструктурного статуса при достижении энергопротективности устранялось с конца операции и оставалось стабильно надёжным в раннем послеоперационном и раннем послеоперационном периодах.

В результате проведённых исследований была доказана тесная корреляционная зависимость между ранними проявлениями повреждений нейронов и клеток астроглии с энергоструктурными трофотропными изменениями.

Включение в биомониторинг как его компонента энергоструктурной активности, её свойств, резервов, эффективности ауторегуляции позволяет даже в отсутствие дорогостоящих и трудоёмких исследований нейроспецифических белков иметь представление о степени повреждения клеток головного мозга.

## Выводы

Дополнение стандартов периоперационного биомониторинга аудитом энергоструктурной активности (ЭСА) позволит не только своевременно выявлять изменения

**Таблица 2.** Динамика параметров энергоструктурной активности и уровня нейроспецифических белков у пациентов с исходно повышенными маркерами ишемии головного мозга

Параметры	Этапы	Исход	Конец операции	1 сутки
Опасность, %		12 [6;22]	16 [14;21]	18 [16;19]
Миокардиальный резерв, %		15 [8;24]	17 [9;32]	–
Миокардиальная недостаточность, %		–	–	6 [3;18] <sup>#</sup>
Кислородно-транспортная недостаточность, %		25 [21;34]	23 [19;28]	24 [19;27]
Микроциркуляторно-митохондриальная недостаточность, %		20 [18;25]	19 [16;22]	19 [16;21]
Гипоосмолярная дестабилизация, %		8 [7;10]	9 [8;10]	9 [8;10]
Диастолическая дестабилизация, %		9 [6;11]	–	–
Систолическая дестабилизация, %		–	5 [4;6] <sup>*</sup>	4 [3;5] <sup>*</sup>
Адаптивность, %		121 [116;124]	–	–
Деструктивность, %		–	6 [4;11] <sup>**</sup>	5 [4;12] <sup>**</sup>
Нестабильность, %		20 [18;25]	19 [16;22]	19 [16;21]
Адекватность, %		80 [77;84]	–	–
Неадекватность, %		–	61 [60;62] <sup>**</sup>	66 [65;67] <sup>**</sup>
S 100, нг/л		218,58 [151,1;273,3]	202,5 [167,1;234,7]	216,97 [159,1;244,3]
NSE, мкг/л		25,52 [15,74;36,72]	23,04 [15,87;39,91]	26,41 [16,41;35,60]

Данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей Me [к25 %;к75 %].

<sup>#</sup>:  $p = 0,05$  в сравнении с исходными данными; <sup>\*</sup>:  $p < 0,05$  в сравнении с исходными данными;

<sup>\*\*</sup>:  $p < 0,01$  в сравнении с исходными данными.

**Таблица 3.** Взаимосвязь параметров энергоструктурной активности и нейроспецифических белков

Параметры энергоструктурной активности	S 100		NSE	
	rs	p	rs	p
Безопасность	-0,49	$P < 0,01$	-0,53	$P < 0,01$
Миокардиальный резерв	-0,18	$P > 0,05$	-0,05	$P > 0,05$
Кислородно-транспортный резерв	-0,52	$P < 0,01$	-0,59	$P < 0,01$
Микроциркуляторно-митохондриальный резерв	-0,51	$P < 0,01$	-0,61	$P < 0,01$
Энергоосмолярная ауторегуляция	-0,72	$P < 0,01$	-0,79	$P < 0,01$
Гемодинамическая ауторегуляция	0,23	$P > 0,05$	0,15	$P > 0,05$
Адаптивность	-0,46	$P < 0,01$	-0,47	$P < 0,01$
Стабильность	-0,51	$P < 0,01$	-0,61	$P < 0,01$
Адекватность	-0,50	$P < 0,01$	-0,60	$P < 0,01$

rs: коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

энергопродуктивной способности массы клеток тела (МКТ) больного, но и повысить периоперационную безопасность путём применения опережающей тактики лечения.

## Список литературы

- [1] Chilkoti G. Technological advances in perioperative monitoring: Current concepts and clinical perspectives / G. Chilkoti, R. Wadhwa, A. Saxena // J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. – 2015. – №31. – P. 14–24.
- [2] Recommendations for standards of monitoring during anaesthesia and recovery 2015 : Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland / M. Checketts, R. Alladi, K. Ferguson, *et al.* // Anaesthesia. – 2016. – №71. – P. 85–93.
- [3] Fowler A. A Review of Recent Advances in Perioperative Patient Safety / A. Fowler // Ann. Med. Surg. – 2013. – №2(1). – P. 10–14.
- [4] Fischer M. Perioperative medicine: From theoretical guidelines to clinical practice / M. Fischer, Y. Le Manach // Anaesth. Crit. Care Pain Med. – 2016. – №35(4). – P. 241–242.
- [5] Ng J. Perioperative Stroke in Noncardiac, Nonneurosurgical Surgery / J. Ng, M. Chan, A. Gelb // Anesthesiology. – 2011. – №115(4). – P. 879–890.
- [6] Шифрин А. Г. Стратегия периоперационной медицины / А. Г. Шифрин, Г. А. Шифрин. – Запорожье : Дикое поле, 2012. – 180 с.
- [7] Abraham M. Protecting the anaesthetised brain / M. Abraham // J. Neuroanaesthesiol. Crit. Care. – 2014. – №1. – P. 20–39.

- [8] Munirama S. 'Stratified' approach to individualized anaesthetic care / S. Munirama, G. McLeod // *Br. J. Anaesth.* – 2015. – №114(4). – P. 543–545.
- [9] Колесник Ю. М. Основы врачебной компетентности / Ю. М. Колесник, В. А. Туманский, Г. А. Шифрин. – Запорожье : Дикое поле, 2013. – 376 с.
- [10] Смирнова Л. М. Клиническая оценка тяжести операционной травмы / Л. М. Смирнова // *Клінічна хірургія.* – 2013. – №5. – С. 61–66.
- [11] The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress / F. Michetti, V. Corvino, M. Geloso, et al. // *J. Neurochem.* – 2012. – №120(5). – P. 644–659.
- [12] Wang K. Biomarkers of brain injury and neurological disorders / K. Wang, Z. Zhang, F. Kobeissy. – Boca Raton, Florida: CRC Press, 2014. – 650 p.

## References

- [1] Chilkoti, G., Wadhwa, R., & Saxena, A. (2015). Technological advances in perioperative monitoring: Current concepts and clinical perspectives. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 31(1), 14–24. doi: 10.4103/0970-9185.150521.
- [2] Checketts, M., Alladi, R., Ferguson, K., Gemmell, L., Handy, J., Klein, A., et al. (2016). Recommendations for standards of monitoring during anaesthesia and recovery 2015: Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland. *Anaesthesia*, 71(1), 85–93. doi: 10.1111/anae.13316.
- [3] Fowler, A. (2013). A Review of Recent Advances in Perioperative Patient Safety. *Annals of Medicine and Surgery*, 2(1), 10–14. doi: 10.1016/S2049-0801(13)70020-7.
- [4] Fischer, M., & Le Manach, Y. (2016). Perioperative medicine: From theoretical guidelines to clinical practice. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, 35(4), 241–242. doi: 10.1016/j.accpm.2016.06.002.
- [5] Ng, J., Chan, M., & Gelb, A. (2011). Perioperative Stroke in Noncardiac, Nonneurosurgical Surgery. *Anesthesiology*, 115(4), 879–890. doi: 10.1097/ALN.0b013e31822e9499.
- [6] Shifrin, A., & Shifrin, G. (2012). *Strategiya perioperacionnoj mediciny [Perioperative medicine strategy]*. Zaporozh'e: Dyke Pole. [in Russian].
- [7] Abraham, M. (2014). Protecting the anaesthetised brain. *Journal of Neuroanaesthesiology and Critical Care*, 1(1), 20–39. doi: 10.4103/2348-0548.124841.
- [8] Munirama, S., & McLeod, G. (2015). 'Stratified' approach to individualized anaesthetic care. *British Journal of Anaesthesia*, 114(4), 543–545. doi: 10.1093/bja/aeu345.
- [9] Kolesnik, Yu. M., Tumanskij, V. A., & Shifrin, G. A. (2013). *Osnovy vrachebnoj kompetentnosti [Basics of doctors' professional competence]*. Zaporozh'e: Dyke Pole. [in Russian].
- [10] Смирнова, Л. М. (2013). Клиническая оценка тяжести операционной травмы [Clinical estimation of severity of the operation trauma]. *Клінічна хірургія*, 5, 61–66. [in Russian].
- [11] Michetti, F., Corvino, V., Geloso, M., Lattanzi, W., Bernardini, C., Serpero, L., Gazzolo, D. (2012). The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *Journal of Neurochemistry*, 120(5), 644–659. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07612.x.
- [12] Wang, K., Zhang, Z., & Kobeissy, F. (2014). *Biomarkers of brain injury and neurological disorders*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

## Сведения об авторе:

Бойцова О. Н., ассистент каф. медицины катастроф, военной медицины, анестезиологии и интенсивной терапии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

## Відомості про автора:

Бойцова О. М., ассистент каф. медицины катастроф, військової медицини, анестезіології та інтенсивної терапії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

## Information about author:

Boitsova O. N., Assistant of the Department of Medicine of Catastrophes, Military Medicine, Anesthesiology and Intensive Care, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of interest:** author has no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 10.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 02.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 09.06.2017



# Эффективность лечения больных с переломами голени после внутрикостного блокированного остеосинтеза с применением дозатора нагрузки

Ю. В. Сухин, Ю. Ю. Павлычко, П. В. Данилов

Одесский национальный медицинский университет, Украина

**Цель работы** – оценка эффективности устройства для определения величины нагрузки на нижнюю конечность в послеоперационном периоде у больных с переломами костей голени.

**Материалы и методы.** Разработано и применено устройство, которое позволяет в реальном времени определять величину нагрузки на нижнюю конечность, а также сигнализировать о чрезмерной или слабой нагрузке. Сенсорный блок со стелькой и датчиком располагается в обуви под пяткой пациента, а основной блок крепится на голень при помощи ремня. В реальном времени регистрируется текущее значение нагрузки на ногу. Полученные данные записываются в энергонезависимую память. Система даёт возможность уведомить пациента или врача электронным письмом о наличии сильной или слабой нагрузки на нижнюю конечность, а также отсутствии нагрузки в течение продолжительного периода.

**Результаты.** Применение дозатора нагрузки проведено нами у 38 больных с переломами костей голени, которые находились на стационарном лечении в центре травматологии и ортопедии г. Одессы в период от 1,5 до 12 месяцев. В основную группу вошли больные, которым применялся в реабилитационном периоде дозатор нагрузки на нижнюю конечность (поперечный перелом диафиза костей голени – 9 больных, косой перелом – 11 больных). Контрольную группу составили пациенты без применения дозатора нагрузки (10 пациентов с косым переломом средней трети костей голени, 8 больных с поперечным переломом обеих костей голени в средней трети). В результате применения устройства удалось сократить срок сращения переломов на две недели и избежать такого осложнения, как контрактура сустава и несращение перелома.

**Выводы.** Устройство позволяет пациентам с травмами нижних конечностей придерживаться оптимальной нагрузки в период реабилитации, избегая чрезмерной и слабой нагрузки на нижнюю конечность.

Разработка даёт возможность определить статистику нагрузки и передачу её на сервер, благодаря чему лечащий врач может контролировать процесс реабилитации. При использовании данного устройства больной может давать оптимальную нагрузку на оперированную конечность до полного сращения перелома, что даёт возможность сохранить стереотип ходьбы, снизить риск повреждения фиксатора, а также позволяет оптимизировать остеогенез в зоне перелома.

## Ефективність лікування хворих із переломами гомілки після внутрішньокісткового блокованого остеосинтезу з застосуванням дозатора навантаження

Ю. В. Сухін, Ю. Ю. Павличко, П. В. Данилов

**Мета роботи** – оцінювання ефективності пристрою для визначення величини навантаження на нижню кінцівку в післяопераційному періоді у хворих із переломами кісток гомілки.

**Матеріали та методи.** Розроблено та застосовано пристрій, котрий дає можливість у реальному часі визначати величину навантаження на нижню кінцівку, а також сигналізувати про надмірне або слабке навантаження. Сенсорний блок з устійкою та датчиком розташовується у взутті під п'ятою пацієнта, а основний блок кріпиться на гомілку за допомогою ремня. У реальному часі реєструється поточне значення навантаження на ногу. Дані записувались в енергонезалежну пам'ять. Система дає можливість повідомити пацієнта або лікаря електронним листом про наявність сильного чи слабого навантаження на нижню кінцівку, а також відсутність навантаження протягом тривалого періоду.

**Результати.** Застосовувався дозатор навантаження у 38 хворих із переломами кісток гомілки, які перебували на стаціонарному лікуванні в центрі травматології та ортопедії м. Одеси в період від 1,5 до 12 місяців. До основної групи ввійшли хворі, яким застосовувався в реабілітаційному періоді дозатор навантаження на нижню кінцівку (поперечний перелом діафіза кісток гомілки – 9 хворих, косий перелом – 11 хворих). Контрольну групу становили пацієнти без застосування дозатора навантаження (10 пацієнтів із косим переломом середньої третини кісток гомілки, 8 хворих із поперечним переломом обох кісток гомілки в середній третині). Застосування пристрою скоротило термін зрощення переломів на два тижні та дало змогу уникнути такого ускладнення як контрактура суглоба й незрощення перелома.

**Висновки.** Пристрій дає можливість пацієнтам із травмами нижніх кінцівок дотримуватись оптимального навантаження в період реабілітації, уникаючи надмірного та слабого навантаження на нижню кінцівку. Розробка забезпечує визначення статистики навантаження та передачу її на сервер, завдяки чому лікар може контролювати процес реабілітації. Під час використання пристрою хворий може давати оптимальне навантаження на оперовану кінцівку до повного зрощення перелома, що зберігає стереотип ходьби, знижує ризик пошкодження фіксатора, а також оптимізує остеогенез у зоні перелома.

**Ключевые слова:** переломы костей голени, послеоперационный период, реабилитация.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 193–196

**DOI:** 10.14739/2310-1237.2017.2.109212

**E-mail:** yura.pavlychko@ukr.net

**Ключові слова:** переломи кісток гомілки, післяопераційний період, реабілітація.

**Патологія.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 193–196

**Key words:**

shin bone fractures, postoperative period, rehabilitation.

**Pathologia**

2017; 14 (2), 193–196

## Treatment efficiency of patients with shin fracture after intrasosseous blocked osteosynthesis by using the load dispenser

Yu. V. Sukhin, Yu. Yu. Pavlychko, P. V. Danilov

**The purpose** of research: evaluation of the effectiveness of the device for determining the value of the load on the lower extremity while walking in real time with controlling and signalization of excessive and insufficient load.

**Materials and methods.** Elaborated and applied device, that allows to determine the load magnitude on the lower extremity in real time, and also to signal about excessive or weak load. The sensory block with the insole and the sensor is located in shoes, under patient's heel, and the main block is fixed on the shin with the help of the strap. Current value of the load on the leg is registered in real time. Received data is recorded in non-volatile memory. The system provides an opportunity to notify patient or doctor by email about the presence of a strong or weak load on the lower extremity, and also about the absence of load for a long period.

**Results.** We used the loading batcher in 38 patients with the shin bones fractures, who were on inpatient treatment at the traumatology and orthopedics center in Odessa in the period from 1.5 to 12 months. The main group included patients, who used the load batcher on the lower extremity in rehabilitation period (transversal fracture of the shin bones diaphysis – 9 patients, oblique fracture – 11 patients). The control group consisted of patients, who didn't use the load batcher (10 patients with oblique fracture of the shin bones in the middle third, 8 patients with transversal fracture of both shin bones in the middle third). As a result of applying the device we succeeded to reduce the fracture fusion period for two weeks and avoid such complications as contracture of joint and fracture non-union.

**Conclusions.** The device allows patients with traumatic consequences reaching the optimal load in rehabilitation period, avoiding excessive load on the lower extremity.

The elaboration provides an opportunity to determine the statistics of the load and its transfer to the server, due to that physician can control the rehabilitation process. Applying this device patient can optimally load operated extremity until complete fracture fusion, it provides an opportunity to preserve the walking stereotype, to reduce the risk of the clamp damage and also optimizes osteogenesis in the fracture zone.

Для создания оптимальных условий сращения перелома требуется не только точность репозиции отломков, стабильная фиксация, малотравматичность техники операции, но и дозированная нагрузка на конечность в послеоперационном периоде [1]. По данным научной литературы, оптимальной считается нагрузка 20–30 % от массы тела больного [2,3]. Избыточная нагрузка может привести к повреждению фиксатора и повторному смещению костных отломков, а недостаточная не будет способствовать адекватному остеогенезу [4,5].

При этом важно, чтобы контроль нагрузки был постоянным. Для пациента крайне сложно определить нагрузку на нижнюю конечность в период реабилитации. Иногда для этого используют бытовые весы, а потом «запоминают» усилие, соответствующее необходимой нагрузке, которое стараются выдерживать во время ходьбы. Такой метод крайне неточен, и мало кто из пациентов им пользуется ввиду сложности определения нагрузки при каждом шаге.

### Цель работы

Оценка эффективности устройства для определения величины нагрузки на нижнюю конечность в послеоперационном периоде у больных с переломами костей голени.

### Материалы и методы исследования

Для решения этой проблемы разработано и запатентовано [Патент на полезную модель № 100049 от

10.07.2015 (устройство для определения нагрузки на ногу)] прибор, который позволяет в реальном времени определять величину нагрузки на нижнюю конечность, а также сигнализировать о чрезмерной или слабой нагрузке [6].

Анализ лечения больных после интрамедуллярного остеосинтеза блокированным стержнем с применением разработанного устройства проведён нами у 38 человек, которые находились на стационарном лечении в центре травматологии и ортопедии г. Одессы в период от 1,5 до 12 месяцев. Пациентов мужского пола было 28, женского – 10. Возраст больных составлял от 35 до 49 лет.

В основную группу (20 больных) вошли пациенты, которым применялся в реабилитационном периоде дозатор нагрузки на нижнюю конечность. В основной группе поперечный перелом диафиза костей голени отмечали у 9 больных, косой перелом – у 11 больных.

Группу сравнения составили пациенты (18 больных) без применения дозатора нагрузки: 10 пациентов – с косым переломом средней трети костей голени, 8 больных – с поперечным переломом обеих костей голени в средней трети (табл. 1).

Сроки сращения поперечного и косого переломов костей голени у больных основной группы и группы сравнения определяли в сроки от 16 до 20 недель по данным рентгенологического исследования.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере в программе Statistica 6.1 (серийный номер BXXR502C631824NET3). Закон распределения отличался от нормального, поэтому вычисляли медиану и интерквартильный интервал количества недель в реабилитационный период. Достоверность отличий сравниваемых величин определяли с применением непараметрического метода для сравнения выборок разного объёма – критерия

Таблица 1. Распределение больных по виду перелома костей голени

Вид перелома костей голени согласно классификации АО	Основная группа	Группа сравнения
Поперечный перелом костей голени (2A)	9	8
Косой перелом костей голени (2A)	11	10

Манна–Уитни (Z). Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

Разработанное устройство состоит из электронной платы, на которой расположен микропроцессор с программным обеспечением и энергонезависимой памятью для сохранения статистики, модуль Wi-Fi для передачи статистики на сервер и программирования параметров, вибромотор и пьезоизлучатель для сигнализации о чрезмерной или слабой нагрузке, контроллер заряда аккумулятора, аккумулятор, универсальный порт для подключения датчика веса, подзарядки аккумулятора и программирования параметров устройства. Измерительный модуль состоит из стельки и сенсора веса. Программирование параметров устройства производится с помощью блока программирования. Подзарядка аккумулятора производится при помощи блока питания (рис. 1).

Устройство реализуется следующим образом: сенсорный блок со стелькой и датчиком располагается в обуви под пяткой пациента, а основной блок крепится на голень при помощи ремня (рис. 2).

После включения устройства в программу микроконтроллера загружается значение веса пациента. После этого в реальном времени регистрируется текущее значение нагрузки на ногу. Если текущее значение превышает заданное значение в 20 % от веса пациента, то срабатывает устройство звуковой сигнализации для оповещения пациента о чрезмерной нагрузке на ногу. Если значение веса с датчика близко к критическому значению, но меньше его, то устройство начинает вибрировать для оповещения пациента о приближении к критической нагрузке. Полученные данные записываются в энергонезависимую память. Устройство позволяет сохранять и передавать на сервер статистику ходьбы пациента для контроля реабилитации врачом.

В случае введения больным при настройке параметров своей домашней Wi-Fi сети, после каждого сеанса реабилитации устройство будет отсылать статистику на сервер. На сервере в любой момент пациент или его лечащий врач могут посмотреть статистику нагрузки на ногу. В случае сильной или слабой нагрузки на нижнюю конечность, а также полного отсутствия нагрузки продолжительный период система уведомит об этом пациента или врача электронным письмом. Данные с сервера могут использоваться для принятия решения об изменении методики реабилитации.

Больным с косым переломом средней трети голени разрешалась дозированная нагрузка на конечность через 6 недель со дня операции, а при поперечном переломе – с 1–3 дня после операции в зависимости от интенсивности болевого синдрома. Нагрузка составляла до 20 % от общего веса больного. А через 8 недель со дня операции нагрузку на конечность увеличивали до 30 %.

Приводим данные для сравнения сроков сращения поперечного и косого перелома костей голени у больных основной группы и группы сравнения (табл. 2).

В результате проведенного исследования были получены следующие результаты: применение доза-

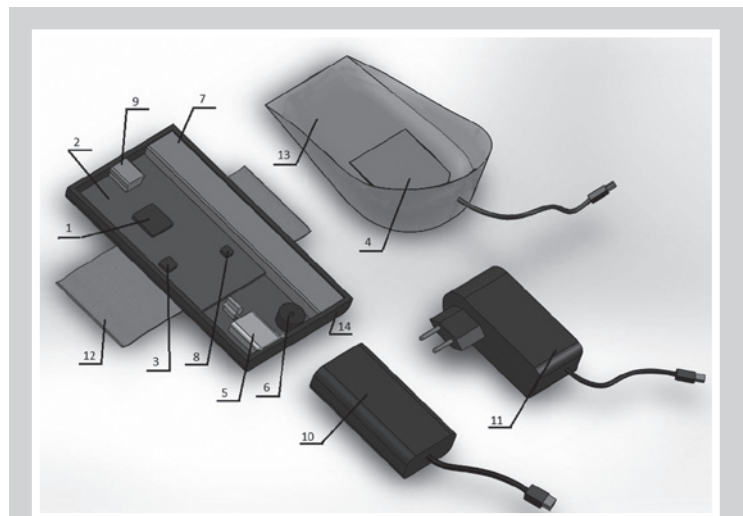


Рис. 1. Устройство для определения нагрузки на нижнюю конечность.

1: микропроцессор; 2: электронная плата; 3: модуль Wi-Fi; 4: датчик веса; 5: вибромотор; 6: пьезоизлучатель; 7: аккумулятор; 8: контроллер заряда аккумулятора; 9: универсальный порт; 10: блок программирования; 11: блок питания; 12: элемент крепления; 13: стелька; 14: корпус.



Рис. 2. Расположение датчика веса и крепление основного блока.

тора нагрузки положительно отразилось на состоянии больных основной группы. Период реабилитации у больных с поперечным переломом уменьшился в среднем на две недели: 15 недель – у основной и до 17 – у контрольной группы соответственно. Вышеизложенная закономерность была подтверждена и статистически, с использованием непараметрического метода – критерия Манна–Уитни ( $Z = 3,75$ ), с высоким уровнем достоверности ( $p < 0,001$ ). У больных с косым переломом мы также наблюдали уменьшение времени реабилитации, но оно было не таким явным, как у больных с поперечным переломом: 19 у основной и 19,7 недели – у контрольной группы.

Используя разработанное устройство дозированной нагрузки и ранней разработки движений в суставах, удалось избежать такого осложнения, как контрактура сустава и несращение перелома.

Таблица 2. Сравнение сроков реабилитации больных с применением и без применения дозатора нагрузки

Данные	Группы	Поперечный перелом костей голени (2А)		Косой перелом костей голени (2А)	
		основная группа	контрольная группа	основная группа	контрольная группа
Количество больных по характеру повреждения согласно классификации АО		9	8	11	10
Медиана		15,00	17,00	19,00	19,70
Интерквартильный интервал		(14,50; 16,00)	(16,75; 17,75)	(18,00; 20,00)	(18,00; 20,50)
Значение критерия Манна–Уитни		Z = 3,75		Z = 1,29	
Достоверность		p < 0,001		p < 0,2	

## Выводы

1. Разработанное устройство позволяет пациентам с травмами нижних конечностей придерживаться оптимальной нагрузки в период реабилитации, избегая чрезмерной и слабой нагрузки на нижнюю конечность. Устройство ведёт статистику нагрузки и передаёт её на сервер, благодаря чему лечащий врач может контролировать процесс реабилитации.

2. Устройство гарантирует оптимальную нагрузку на оперированную конечность до полного сращения перелома, даёт возможность сохранить стереотип ходьбы, снижает риск повреждения фиксатора, позволяет оптимизировать остеогенез в зоне перелома, что способствует сокращению сроков сращения перелома и сроков реабилитации на 2 недели.

## Список литературы

- [1] Об устройствах для мониторинга нагрузки при лечении диафизарных переломов голени / Г. Н. Колесников, Р. И. Мельцер, А. А. Тихомиров, Ю. А. Изотов // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – №9–11. – С. 2381–2385.
- [2] Ошибки и пути профилактики их последствий при лечении переломов костей голени / Д. В. Павлов, А. В. Воробьев, А. В. Алейников, А. Е. Новиков // *Казанский медицинский журнал*. – 2009. – Т. 90. – №6. – С. 857–861.
- [3] Коджевский П. Регенерация кости и стимуляция остеогенеза / П. Коджевский М. Шади // *Журнал клинической и экспериментальной ортопедии им. Г. А. Илизарова*. – 2016. – №1. – С. 12–17.
- [4] Анализ результатов лечения больных с диафизарными переломами костей голени при использовании комбинированного остеосинтеза / М. С. Эдиев, В. П. Морозов, В. Н. Белоногов и др. // *Гений ортопедии*. – 2013. – №4. – С. 10–14.
- [5] Експериментальне дослідження міцності первинної стабілізації кісткових фрагментів при використанні інтрамедулярних фіксаторів різного типу [Електронний ресурс] / С. О. Хмизов, А. В. Пашенко, О. А. Тяжелов та ін. // *Травма*. – 2016. – Т. 17. – №5. – Режим доступу: <http://www.mif-ua.com/archive/article/43830>
- [6] Патент №100049 UA МПК (2015.01) А61F 5/00. Пристрій для визначення навантаження на ногу / Ю. В. Сухин, П. В. Данилов, А. Ю. Сухин, І. В. Малишев; заявник та патентовласник Одеський державний медичний університет. – U2014 13322; заявл. 12.12.2014; опубл. 10.07.2015 // *Бюлетень* №13.

## References

- [1] Kolesnikov, G. N., Meltser, R. I., Tihomirov, A. A., & Izotov, Yu. A., (2014). Ob ustrojstvakh dlya monitoringa nagruzki pri lechenii diafizarnykh perelomov goleni [About devices for load monitoring in the treatment of diaphyseal fractures of the tibia]. *Fundamental'nye issledovaniya*, 9–11 2381–2385. [in Russian].
- [2] Pavlov, D. V., Vorobyov, A. V., Aleinikov, A. V., & Novikov, A. E. (2009). Oshibki i puti profilaktiki ikh posledstviy pri lechenii perelomov kostey goleni [The errors and ways of preventing their consequences in the treatment of shin bone fractures]. *Kazanskij medicinskij zhurnal*, 90(6), 857–861. [in Russian].
- [3] Kodzhevskij, P., & Shadi, M. (2016). Regeneraciya kosti i stimulyaciya osteogeneza [Regeneration of bone and stimulation of osteogenesis]. *Zhurnal klinicheskoy i e'ksperimental'noj ortopedii im H.A. Ilizarova*, 1, 12–17 [in Russian].
- [4] Ediev, M. S., Morozov, V. P., Belonogov, V. N., Kuvshinkin, A. A., & Balaiian, V. D. (2013). Analiz rezul'tatov lecheniya bol'nykh s diafizarnymi perelomami kostey goleni pri ispol'zovanii kombinirovannogo osteosin-

teza [Analysis of the results of treating patients with shaft fractures of leg bones using combined osteosynthesis]. *Genij ortopedii*, 4, 10–14. [in Russian].

- [5] Khmyzov, S. O., Pashenko, A. V., Tiazhelov, O. A., Karpinskyi, M. Yu., Karpinska, O. D., & Subbota, I. A. (2016) Eksperymentalne doslidzhennia mitsnosti pervynnoi stabilizatsii kistkovykh frahmentiv pry vykorystanni intrameduliarnykh fiksatoriv riznoho typu [Experimental study of the strength of the primary stabilizing bone fragments using various types of clamps intramedullary]. *Tравма*, 17(5). Retrived from <http://www.mif-ua.com/archive/article/43830> [in Ukrainian].
- [6] Sukhin, Yu. V., Danilov, P. V., Sukhin, A. Yu., & Malyshev, I. V. (2015) (patentee) Pat. UA nomer 100049 IPC (2015.01) A61F 5/00. Patent №100049 UA МПК (2015.01) А61F 5/00. Prystrii dlia vyznachennia navantazhennia na nohu [Patent №100049 UA МПК (2015.01) А61F 5/00. Device for measuring loading on the leg]. *Biuletен*, 13. [in Ukrainian].

## Сведения об авторах:

Сухин Ю. В., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. травматологии и ортопедии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Павлычко Ю. Ю., канд. мед. наук, доцент каф. травматологии и ортопедии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Данилов П. В., инженер медицинского оборудования, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

## Відомості про авторів:

Сухин Ю. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. травматології та ортопедії, Одеський національний медичний університет, Україна.

Павлычко Ю. Ю., канд. мед. наук, доцент каф. травматології та ортопедії, Одеський національний медичний університет, Україна.

Данилов П. В., інженер медичного обладнання, Одеський національний медичний університет, Україна.

## Information about authors:

Sukhin Yu. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Traumatology and Orthopedics, Odesa National Medical University, Ukraine.

Pavlychko Yu. Yu., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Traumatology and Orthopedics, Odesa National Medical University, Ukraine.

Danilov P. V., Engineer of Medical Equipment, Odesa National Medical University, Ukraine.

## Конфликт интересов: отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 28.03.2017

Після доопрацювання / Revised: 17.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 24.05.2017

# Alternative method of treating prolonged wound defects of trunk and extremities

E. V. Ponomarenko, I. S. Kovalenko

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

**The aim** of the study is to improve the treatment results in patients with prolonged wound defects on the trunk and extremities by using alternative methods.

**Materials and methods of research:** 75 patients with neurotrophic disorders aged 19–76 years were treated. Of the total number 25 (33.3 %) of patients were treated according to the methodology having been developed in the clinic.

**Results and discussion:** In 25 (33.3 %) cases of a neurotrophic ulcerative defect, skin regeneration course was prescribed for 2 to 6 weeks. We have had positive results (complete defects healing) in all the cases. The clinical experience of using hyaluronic acid preparation has been scientifically substantiated by the complex pathomorphological studies of skin biopsy material (histological, histochemical, immunohistochemical techniques ones using monoclonal antibodies *Rb a-Hu Collagen I*, *Clone RAHC11* and *Rb a-Hu Collagen III*, *Clone RAHC33* (Imtek, Russian Federation) to collagen I and III types).

**Conclusions:** The choice of corrective intervention method and the closure of the defect depended on the size, depth of the wound and the functional characteristics of the site of the injury. The new method of treatment of neurotrophic ulcers expands the prospects for treatment of patients with defects in the integumentary tissues. At the pathomorphological examination, the signs of healing with hyperproliferative processes were revealed in the epidermis, hyperkeratosis, parakeratosis, and excessive accumulation of collagen type I that characterized pathological healing and was often determined in the epidermis in chronic ulcers. Differential approach to selecting the method of closing wound surfaces makes it possible to achieve positive results in 98.1 % of cases.

**Key words:**

wounds, ulcer, morphological and microscopic findings, hyaluronic acid.

**Pathologia**

2017; 14 (2), 197–201

**DOI:**

10.14739/2310-1237.2017.2.109667

**E-mail:**

alena.ponomarenko@gmail.com

## Альтернативний спосіб лікування тривало існуючих ранових дефектів тулуба та кінцівок

О. В. Пономаренко, І. С. Коваленко

**Мета роботи** – поліпшити результати лікування хворих із тривало існуючими рановими дефектами тулуба та кінцівок шляхом застосування альтернативних методів.

**Матеріали та методи.** У клініці проліковано 75 хворих із нейротрофічними розладами віком від 19 до 76 років. 25 (33,3 %) пацієнтів від загальної кількості проліковано за методикою, котра розроблена в клініці.

**Результати.** У 25 (33,3 %) випадках нейротрофічного виразкового дефекту призначений курс редермалізації протягом 2–6 тижнів із позитивним результатом (повне заживлення дефекту) в усіх випадках. Клінічний досвід застосування препарату гіалуронової кислоти науково обґрунтований комплексним патоморфологічним дослідженням біопсійного матеріалу шкіри (гістологічними, гістохімічними, імуногістохімічними методиками з використанням моноклональних антитіл *Rb a-Hu Collagen I*, *Clone RAHC11* та *Rb a-Hu Collagen III*, *Clone RAHC33* («Імтек», Російська Федерація) до колагену I та III типів).

**Висновки.** Вибір методу корегуючого втручання та закриття дефекту залежав від розмірів, глибини рани та функціональних особливостей ділянки пошкодження. Новий спосіб лікування нейротрофічних виразок розширює перспективи лікування пацієнтів із дефектами покривних тканин. Під час патоморфологічного дослідження виявлялись ознаки загоєння І типу, що характеризує патологічне загоєння та часто визначається в епідермісі при хронічних виразках. Диференційний підхід до вибору методу закриття ранових поверхонь дає можливість досягнути позитивних результатів у 98,1 % випадків.

**Ключові слова:**

рани, виразка, морфологічні та мікроскопічні показники, гіалуронова кислота.

**Патологія.** – 2017. –

Т. 14, № 2(40). – С. 197–201

## Альтернативный способ лечения длительно существующих раневых дефектов туловища и конечностей

Е. В. Пономаренко, И. С. Коваленко

**Цель работы** – улучшить результаты лечения больных с длительно существующими раневыми дефектами туловища и конечностей путем применения альтернативных методов.

**Материалы и методы.** В клинике пролечено 75 больных с нейротрофическими трофическими дефектами в возрасте от 19 до 76 лет. 25 (33,3 %) пациентов от общего количества пролечено по методике, разработанной в клинике.

**Результаты.** В 25 (33,3 %) случаях нейротрофических язвенных дефектов был назначен курс редермализации в течение 2–6 недель с положительным результатом (полное заживление дефекта) во всех случаях. Клинический опыт применения препарата гиалуроновой кислоты был научно обоснован комплексным патоморфологическим исследованием биопсийного материала кожи (гистологическими, гистохимическими, иммуногистохимическими методиками (с использованием моноклональных антител *Rb a-Hu Collagen I*, *Clone RAHC11* и *Rb a-Hu Collagen III*, *Clone RAHC33* («Имтек», Российская Федерация) к коллагену I и III типов).

**Ключевые слова:**

раны, язва, морфологические и микроскопические показатели, гиалуроновая кислота.

**Патология.** – 2017. –

Т. 14, № 2(40). – С. 197–201

**Выводы.** Выбор метода корректирующего вмешательства и закрытия дефекта зависел от размеров, глубины раны и функциональных особенностей участка повреждения. Новый способ лечения нейротрофических язв расширяет перспективы лечения пациентов с дефектами покровных тканей. При патоморфологическом исследовании обнаружались признаки заживления с гиперпролиферативными процессами в эпидермисе, гиперкератозом, паракератозом и чрезмерным накоплением коллагена I типа, что характеризует патологическое заживление и часто определяется в эпидермисе при хронических язвах. Дифференцированный подход к выбору метода закрытия раневых поверхностей позволяет достичь положительных результатов в 98,1 % случаев.

Patients with prolonged wound defects are, first of all, the category of patients with disability for an indefinite period, possible disability and a significant decrease in the quality of life. As a rule, the patients receive long-term courses of treatment in several medical institutions, as outpatients too. The presence of wound surfaces leads to the limitation of physical activity, the need for regular painful dressings, permanent sense of malaise, the onset of drugs' side effects, emotional disorder.

Most often, the causes of prolonged wounds formation are vascular diseases (trophic ulcers in chronic venous insufficiency, ischemic ulcers in obliterating diseases of arteries), complicated forms of diabetes mellitus (neuropathic form of diabetic foot), cancer (radiation ulcers), and so on. Neurotrophic ulcer defects, as consequences of spinal cord injury and peripheral nerves, are difficult to conservative therapy and surgical correction. In the United States, every year more than 8-10 thousand new cases of complicated vertebral and spinal trauma are recorded, in Ukraine this figure is 2-3 thousand per year [3].

Despite the introduction of high-tech non-invasive neurosurgical techniques, the vast majority of patients with the consequences of traumatic injury to the spinal cord are disabled [1,4].

**The aim** of the study is to improve the treatment results of patients with long-standing wound defects of trunk and extremities by using alternative methods.

### Materials and methods of research

75 patients with neurotrophic disorders aged 19 to 76 years old, with an average age of 47.5 years, were treated from 2011 to 2017 at the clinical basis of the Department of Disaster Medicine, Military Medicine, Anesthesiology and Intensive Care of Zaporizhzhia State Medical University. Women – 27 (36 %), men – 48 (64 %). There were 25 (33.3 %) patients of the total number treated according to the new methodology using hyaluronic acid preparation, which has been developed in the clinic [2].

The patients were performed the following diagnostic measures: general clinical examination, angiological, neurological examination, clinical and laboratory diagnostics, microbiological monitoring of the wound contents, CT, electroneuromyography, Doppler ultrasonography, photodocumentation.

The complex pathomorphological study of the skin biopsy material was performed by histological (staining with hematoxylin and eosin), histochemical (Van Gieson's stain), immunohistochemical (according to the standardized protocols [6]. Using monoclonal antibodies Rb a-Hu Collagen I, Clone RAHC11 and Rb a-Hu Collagen III, Clone RAHC33 (Imtec, Russian Federation) to collagen types I and III). For the morphometric study, the skin preparations were photographed in 5 visual fields by the digital camera

“Canon EOS 1000D” (Japan) in the microscope Axioplan 2 (Carl Zeiss, Germany) with the magnification x200 and analyzed using the software ImageJ [11]. For the morphometric measurement of the relative area occupied by immunopositive structures, a standard “threshold of sensitivity” (the Threshold tool) was set up in the filtered image DAB channel for automatic segmentation of the digital image into two main types of pixel points (black and white), followed by the calculation of the ratio of the number Black pixel points (immunopositive zones) to the total number of pixels in the image, expressed in %. The statistical processing of the results was performed on a personal computer using the analysis package in the program Excel Microsoft Office 2013 and Statistica® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., License number AXXR712D833214FAN5). Median (Me), lower and upper quartiles (Q1, Q3) were calculated.

### Results and discussion

With neurotrophic ulcers (6 (8 %) of patients) with damage to peripheral nerve trunks, it was mandatory to conduct electroneuromyographic examinations with a neurosurgeon's inspection and the appointment of a special treatment. In 5 cases of trophic ulcers on the lower extremities, autografting was performed by a split skin graft, in one case of a wound defect on the forearm, they performed plasty with a rotation skin adipose flap on the axial blood supply.

In the 44 (58.7 %) patients, the decubital trophic defects III-IV degree in the spine (27 cases) area and the site of greater trochanter of femoral bones (21 cases) were diagnosed. The choice of the type of surgical intervention depends on the size of the defect.

In 12 patients there were 2 localizations simultaneously, in 4 patients – 3 localizations. In case of vertebral localization of neurotrophic ulcers, in 7 cases, plasty was used with one or two V-like skin and muscle rotation flaps; in 16 cases plasty was with skin adipose dicotyledonous pedicle flap; in 9 cases of neurotrophic ulcers in the site of greater trochanter plasty with rotation skin adipose dicotyledonous pedicle flap was performed. In other cases wound defects plasty was performed by the split autografting.

To prevent the development of seromas and hematomas in the early postoperative period, active drainages were installed for up to 5-7 days. Mandatory preoperative preparation included rational antibacterial therapy, taking into account the sensitivity of the sown flora, restoring electrolyte, water and protein balance. In all the patients, the primary healing of wound defects has been noted. Cases of rejection, marginal necrosis of flaps haven't been marked. In 3 cases subflapular seroma (up to 5 cm in diameter), which was successfully eliminated, occurred. In the remote period recurrences of neurotrophic ulcers have not been noted.

In 25 (33.3 %) cases of neurotrophic ulcer defect on the heels and residual defects in the area of the sacrum, buttocks a redermalization course was prescribed for 2 to 6 weeks with a positive result (complete defect healing) in all the cases.

Clinical manifestations of neuropathy were absence of pain, immutability of skin integuments temperature and their normal color, intact pulsation in the dorsal arteries of the foot, the presence of hyperkeratosis on the sole, specific deformity of the fingers, feet and joints. Trophic ulcers were localized in the places of excessive pressure on the sole – the area of the heel, the heads of metatarsal bones, the lateral part of the foot. The electroneuromyography confirmed the diagnosis in all the cases, namely, the lack of electrical conductivity along the peripheral nerve endings of the leg.

The basis of the new method for the treatment of trophic ulcers in the lower extremities is using a combined preparation of hyaluronic acid with sodium salt of succinic acid [2].

We have used the preparation of hyaluronic acid with sodium salt of succinic acid by injecting 1.0 ml of 1.5 % solution intracutaneously around the ulcer defect once per week for 5–7 weeks. During the treatment, dynamic measurements of the trophic ulcer defect were performed.

All the patients were treated according to this method and they were discharged with a positive result, namely, the complete healing of the trophic ulcer defect.

The introduction of hyaluronic acid preparations into the extracellular matrix provides the site of the surgery with the additional amount of hyaluronic acid to optimize the performance of its biological functions in the skin, such as: the tissues' turgor and flexibility increases and the processes of elastogenesis, collagenogenesis and angiogenesis are stimulated. Sodium succinate (sodium salt of succinic acid) operates at the level of mitochondria – to activate the processes of cellular respiration, ATP synthesis and the structural proteins of the skin.

This treatment technique can be used not only at the conditions of in-patient department but at the out-patient setting too which significantly reduces the terms of treatment and patient's stay in the hospital.

Despite the fact that redermalization is the technique that requires special training, its further use does not require specific instruments, anesthetic support, or operating room.

Conducting weekly measurements of ulcer defect makes it possible to evaluate the results of treatment in the dynamics and be able to correct treatment, which does not require special tools either, except for centimeter tape or tracing paper.

Thus, the combination of the afore-mentioned positive influences has contributed to increase the efficiency of treatment, to accelerate the recovery of patients, reduce the number of complications and reduce the number of bed days.

In addition to the fact that the use of this method does not require special means and the attracting of the other profile specialists, it can be used in the outpatient mode for the treatment of prolonged existing trophic ulcers with vascular etiology in the complex with surgical methods of intervention.

Example. Patient L., 1982, the history of the disease No. 1199 was admitted to the Department of Thermal Injury and Reconstructive Surgery with the diagnosis: Consequences of severe spinal trauma. Vertebral fracture L1. Spinal cord contusion. Neurotrophic ulcer defects of the lumbar, sacrum, buttocks, both heels. Lower Paraplegia. Dysfunction of the pelvic organs in the form of retention.

Date of hospitalization: 25.01.2012.

Date of discharge: 07.03.2012.

On admission to the hospital the patient complained of the presence of wounds on the sacrum, buttocks, heels.

Anamnesis of illness: the patient considers himself to have been ill for six months, when he was injured falling from the height at the construction site. He has had the course of complex treatment in the neurosurgical department. In the postoperative period there were bedsores in the area of sacrum, heels. The patient was hospitalized to the department of thermal trauma for further treatment. Local examination of the sacrum area showed wound defect 10x10 cm with straight edges and active granulations, in the area of both heels there is necrosis.

The patient received the course of antibacterial, infusion therapy, exercise therapy, massage, debridement of wound defects.

21.06.12 – operative intervention was performed – closure of the neurotrophic wound defect of the sacral area with a rotation two-lobe fasciocutaneous flap. Sutures were removed on the 14<sup>th</sup> day.

02.11.11 – necrectomy of the marginal necrosis of the flap, secondary suturing, autoplasty.

18.11.11 – autoplasty of wound defects of heels.

13.12.11 – epicycstostoma surgery.

19.01.12 – autoplasty of residual wound defects.

The patient is again hospitalized with residual wound defects in the area of the sacrum and heels and new neurotrophic defects in the buttocks.

After the course of antibacterial therapy, defects debridement

15.02.12 – autoplasty of wound defects was performed.

From 08.02.12 the course of injection 1.5 % solution of hyaluronic acid started. In the dressing room, the patient's wound defect area was debrided with an antiseptic solution. The size of the defect was measured with the centimeter tape before the beginning of the therapy. Completely ready-to-use glass Luer-lock syringe filled beforehand and an additional needle with a solution of non-structured hyaluronic acid with succinate (concentration of hyaluronic acid 15 mg/ml) was used. Indenting from the edge of the ulcer for 0.5 cm, 0.1–0.2 ml solution is injected intracutaneously once by the tunnel method. Spacing between the injections is 0.5 cm.

A sterile gauze bandage was applied on the wound defect. The procedure was repeated 2 times a week with the obligatory measurement of the wound defect and its photographing. The course of treatment was 2 weeks. After the treatment course, the complete epithelization of wound defects in the area of both heels and the buttocks was noted.

The clinical experience of using hyaluronic acid preparation has been scientifically substantiated by the studies

performed in accordance with the program of joint scientific research of the Department of Medicine of Catastrophes, Military Medicine, Anesthesiology and Intensive Care, and the Institute of Clinical Pathology, ZSMU, dated Nov 20, 2015 on the base of the Institute of Clinical Pathology, ZSMU.

During the complex pathomorphologic examination of the skin biopsy material from the para-wound zone in 25 (33.3 %) patients with neurotrophic defects of the integumentary tissues, who had been treated by the method of using hyaluronic acid 1.5 % with sodium succinate, it was found that the epidermis in these areas had a different morphology from the epidermis of healthy skin, which was represented by a stratified epithelium and consisted of several layers of keratinocytes. During maturation, these cells move from the proliferative state in the basal layer to the differentiated state, acquire stratified structure, lose their nuclei and form enucleated corneal layer.

In pathohistological examination of the skin biopsy material stained with hematoxylin and eosin, in this group of patients after the injections of hyaluronic acid preparation, the signs of healing wounds were revealed. In most cases, they were characterized by the formation of a thick, hyperproliferative epidermis containing mitotic active cells not only in the basal but also in the supra-basal layers, which according to some literature data is the result of activation and excessive expression of c-myc [9]. Furthermore, the other differences were found – the presence of hyperkeratosis (thick corneal layer) and parakeratosis (the presence of nuclei in the corneal layer), which can give evidence of the incomplete differentiation of keratinocytes and often characterizes the epidermis of chronic ulcers [7]. It is known that induction of c-myc and suppression of K6/K16 can lead to inhibition of keratinocytes migration in human skin, which contributes to the incomplete activation of keratinocytes and possibly the development of chronic wounds [8,9]. In some cases, the restricted areas of granulation tissue formation were identified and the areas of pseudoepitheliomatous hyperplasia, that is often revealed in chronic defects' edges and caused by chronic injury of the damaged areas.

At the histochemical studies of the skin fragments in this group of patients, stained according to Van Gieson's method, the areas of sclerosed dermis with intensely developed collagen framework were revealed as unsystematically arranged thin and thick bundles of collagen fibers and inflammatory cell infiltration between them. In some cases, the normal structure of the dermis with a neat and orderly network of collagen was detected, which was covered with a thin layer of epidermis. It is known that the initial phase of wound healing is characterized by the release of IL-1 and TNF $\alpha$  by keratinocytes that acting autocrinely, increase the migration and proliferation of keratinocytes, activate adjacent fibroblasts and increase the secretion of FGF (fibroblast growth factor), which in turn promotes the migration of fibroblasts and the accumulation of ECM components, primarily collagens [12]. The other important signaling molecule produced by both keratinocytes and fibroblasts is TGF- $\beta$ . Its expression induces the formation of granulation tissue, reepithelization and tissue reconstruction [5].

In the parallel immunohistochemical examination of these skin fragments, using monoclonal antibodies to collagen types I and III in most cases its marked expression was revealed with considerable accumulation in the form of wavy pale and intensely colored single and collected in fascicles, sometimes interwoven with each other fibrillary structures in all the layers of the dermis. During photodigital skin fragments morphometry in patients with neurotrophic ulcers it was determined that the relative area of collagen type I deposition is 28.15 (24.35; 35.24) % and collagen type III – 23.01 (20.94; 25.95) %.

Thus, it was determined that in the dermal structures of most patients in this group there was a denser accumulation of collagen type I than collagen type III, that according to the findings of other studies may be the result of an imbalance between the processes of synthesis and degradation of proteins of extracellular matrix and leads to the pathological scarring [10,14]. According to some studies, it has been established that chronic inflammatory infiltration in the zones of skin damage is accompanied by activation of leukocytes, cytokines and matrix metalloproteinases, which support the inflammatory reaction, stimulate pathologic production of collagen by fibroblasts, their proliferation and pathological fibrosis, as well as lipodermatosclerosis [10].

In the complex microscopic examination of skin tissue sections stained with hematoxylin and eosin and according to Van Gieson's method in the control group of patients (20 ones with wound defects of the integumentary tissues of the trunk and extremities without damage to the nervous structures) the areas with intensive development of the dermal collagen framework covered with a thin layer of the epidermis, that contained mitotic active keratinocytes in the supra-basal layers, often with flattening of the dermally-epidermal junction. Fibroblast clusters and a focal lymphocytic infiltration were revealed among collagen bundles. In the analysis of digital images of skin samples with immune positive zones in this group of patients it was also observed an intense accumulation of collagens types I and III as pale and dark brown fibrous structures of thin single and organized into bundles fibrils in all dermal layers. In this case, the relative area of accumulation of collagen type I was lower than in the previous group and amounted to 19.01 (14.80; 22.73) % and collagen type III – 26.67 (25.11; 33.01) %. This way it was found that in the dermis of the most patients in this group a significant accumulation of collagen type III was observed, which usually occurs at the early stages of regeneration than collagen type I that according to the data of the other studies is revealed in immature connective tissue [13] and is explained by the early stages of surgical interventions and the intake of skin biopsy material after tissue damage in this group of patients.

### Conclusions:

1. The choice of the method of corrective intervention and the closure of the defect depended on the size, depth of the wound and the functional characteristics of the damaged site.
2. The new method of treatment of neurotrophic ulcers of the lower extremities using hyaluronic acid preparation



with sodium succinate enhances the prospects for treatment of patients with integumentary tissues defects.

3. Pathomorphological examination of skin fragments in patients with neurotrophic ulcers revealed signs of healing with hyperproliferative processes in the epidermis, hyperkeratosis, parakeratosis, and the excessive accumulation of collagen type I which characterizes pathological scarring and is often determined in the epidermis in chronic ulcers.

4. Differential approach to the selection of the method of closing wound surfaces associated with damage to the central and peripheral nervous systems makes it possible to achieve positive results in 98.1 % of cases.

## References

- [1] Pedachenko, Ye. H., Polishchuk, M. Ye., Huk, A., & Nykyforova, A. M. (2017) *Neirokhirurhiia v Ukraini: vid zizdu do zizdu* [Neurosurgery in Ukraine: from the congress to the congress]. Abstracts of Papers of the VI Congress of Neurosurgeons of Ukraine. Kharkiv. [in Ukrainian].
- [2] Ponomarenko, O. V., & Virskiy, M. V. (patentee) (2011) Patent. 65158 Ukraina, MPK A61K 31/00. Sposib likuvannia likuvannia trofichnykh vyrazok nyzhnikh kintsivok [Patent. 65158 Ukraine, IPC A61K 31/00. Method of treatment of trophic ulcers of the lower extremities]. *Biuletyn*, 22. [in Ukrainian].
- [3] Piedachenko, Ye. H., Ipatov, A. V., & Tarasenko, O. M. (2012) Statystychnyi analiz invalidnosti pry travmi khrebtu ta spynnoho mozku [Statistical analysis of disability in the spine and spinal cord injury]. *Zaporozhye medical journal*, 6(75), 21–23. [in Ukrainian].
- [4] Yamynskiy, Yu. Ya. (2017) Rekonstruktyvno – vidnovne likuvannia khvorykh z naslidkamy travmatychnoho ushkodzhennia spynnoho mozku [Restoration Treatment of Patients with Consequences of Traumatic Damage of the Spinal Cord]. Abstracts of Papers of the VI Congress of Neurosurgeons of Ukraine. Kharkiv. [in Ukrainian].
- [5] Morimoto, N., Yoshimura, K., Niimi, M., Ito, T., Tada, H., Teramukai, S., et al. (2012) An exploratory clinical trial for combination wound therapy with a novel medical matrix and fibroblast growth factor in patients with chronic skin ulcers: A study protocol. *Am. J. Transl. Res.*, 4, 52–59.
- [6] Dabbs, D. J. (2010). *Diagnostic Immunohistochemistry*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- [7] Usui, M. L., Mansbridge, J. N., Carter, W. G., Fujita, M., & Olerud, J. E. (2008) Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem*, 56, 687–696. doi: 10.1369/jhc.2008.951194.
- [8] Lan, L., Hayes, C. S., Laury-Kleintop, L., & Gilmour, S. K. (2005) Suprabasal induction of ornithine decarboxylase in adult mouse skin is sufficient to activate keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 124(3), 602–614. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23620.x.
- [9] Stojadinovic, O., Brem, H., Vouthounis, C., Lee, B., Fallon, J., Stallcup, M., et al. (2005) Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol.*, 167(1), 59–69.
- [10] Puri, V., Venkateshwaran, N., & Khare, N. (2012) Trophic ulcers – Practical management guidelines. *Indian J Plast Surg*, 45(5), 340–351. doi: 10.4103/0970-0358.101317.
- [11] Rasband, W. S., & Image, J. (1997) National Institutes of Health. Bethesda, Maryland. Retrieved from USA – <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016.
- [12] Sogabe, Y., Abe, M., Yokoyama, Y., & Ishikawa, O. (2006) Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen*, 14(4), 457–462. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00143.x.
- [13] Shi, H. X., Lin, C., Lin, B. B., Wang, Z. G., Zhang, H. Y., Wu, F. Z., et al. (2013) The Anti-Scar Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on the Wound Repair In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 8(4), e59966. doi: 10.1371/journal.pone.0059966.
- [14] Xue, M., & Jackson, Ch. J. (2015) Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3). 119–136. doi: 10.1089/wound.2013.0485.

## Information about the authors:

Ponomarenko E. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Medicine of Catastrophes, Military Medicine, Anesthesiology and Intensive Care, Zaporizhzhia State Medical University, Head of the Regional Center of Thermal Injuries and Plastic Surgery, Ukraine.

Kovalenko I. S., MD, PhD, Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

## Відомості про авторів:

Пономаренко О. В., канд. мед. наук, доцент каф. медицини катастроф, військової медицини, анестезіології та інтенсивної терапії, Запорізький державний медичний університет, зав. обласного центру термічної травми та пластичної хірургії, Україна.

Коваленко І. С., канд. мед. наук, асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет. Україна.

## Сведения об авторах:

Пономаренко Е. В., канд. мед. наук, доцент каф. медицины катастроф, военной медицины, анестезиологии и интенсивной терапии, Запорожский государственный медицинский университет. Украина, зав. областным центром термической травмы и пластической хирургии, Украина.

Коваленко И. С., канд. мед. наук, ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 01.06.2017

Після доопрацювання / Revised: 12.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 13.06.2017

# Особенности иммуногистохимической экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки

В. А. Туманский, З. А. Пирогова

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

## Ключевые слова:

шейка матки, новообразования шейки матки, вирус папилломы человека, антиген Ki-7.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 202–208

DOI: 10.14739/2310-1237.2017.2.109298

E-mail: tumanskiy@zsmu.zp.ua, zoya050390@gmail.com

Рак шейки матки (РШМ) является распространённой опухолью у женщин, её развитию предшествует ряд патологических процессов, среди которых ключевую роль играет цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN).

**Цель работы** – изучение особенностей иммуногистохимической (ИГХ) экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в эпителии шейки матки (ШМ) с диспластическими изменениями различной степени тяжести (CIN I–III) и в опухолевых клетках плоскоклеточного РШМ.

**Материалы и методы.** Проведено патогистологическое и ИГХ исследование биопсий ШМ матки 53 больных 18–45 лет, из которых 34 женщины страдали CIN I–III, у 9 диагностирован плоскоклеточный РШМ, в 10 случаях изучена ШМ обычной структуры.

**Результаты.** Установлено, что при лёгкой CIN I дисплазии эпителий ШМ характеризуется низким уровнем пролиферации по экспрессии Ki-67 (Me = 17,87 % (13,76; 22,44)) и крайне низким уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 0,00 (0,00; 29,64)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN I составляет 27,27 %. При средней CIN II дисплазии эпителиоциты ШМ характеризуется средним уровнем пролиферации (Me Ki-67 = 44,96 % (34,91; 55,41)) и умеренным уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 75,71 (51,24; 82,41)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN II составляет 71,43 %. При тяжёлой CIN III дисплазии эпителий ШМ характеризуется высоким уровнем пролиферативной активности (Me Ki-67 = 74,62 % (68,50; 84,67)) и высоким уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 117,47 (95,38; 123,93)); доля HPV16-положительных пациенток с CIN III составляет 77,78 %. У всех больных РШМ в опухолевых клетках выявлена ядерно-цитоплазматическая экспрессия HPV16, а также высокий уровень экспрессии Ki-67 и p16<sup>INK4a</sup>. Имеются прямые корреляционные связи между уровнями экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16, а также показателями степени тяжести CIN.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что с нарастанием тяжести диспластических изменений многослойного плоского эпителия ШМ возрастает и экспрессия эпителиоцитами Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16. Отсутствие статистически значимых различий между показателями экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в эпителии ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ свидетельствует о том, что эти маркеры не играют решающей роли в дифференциальной диагностике тяжёлой дисплазии и плоскоклеточного РШМ.

## Ключові слова:

шийка матки, новоутворення шийки матки, вірус папіломи людини, антиген Ki-67.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 202–208

## Особливості імуногістохімічної експресії Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 у цервікальній інтраепітеліальній неоплазії та карциномі шийки матки

В. О. Туманський, З. О. Пирогова

Рак шийки матки (РШМ) є поширеною пухлиною в жінок, її розвитку передують низка патологічних процесів, серед котрих ключову роль відіграє цервікальна інтраепітеліальна неоплазія (CIN).

**Мета роботи** – вивчення особливостей імуногістохімічної (ІГХ) експресії Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в епітелії шийки матки (ШМ) із диспластичними змінами різного ступеня тяжкості (CIN I–III) та в пухлинних клітинах плоскоклітинного РШМ.

**Матеріали та методи.** Здійснили патогістологічне та ІГХ дослідження біопсій ШМ матки 53 хворих 18–45 років. 34 жінки страждали CIN I–III, у 9 діагностований плоскоклітинний РШМ, у 10 випадках вивчена шийка матки звичайної структури.

**Результати.** Встановили, що при легкій CIN I дисплазії епітелій ШМ характеризується низьким рівнем проліферації за експресією Ki-67 (Me = 17,87 % (13,76; 22,44)) і вкрай низьким рівнем експресії p16<sup>INK4a</sup> (Me = 0,00 (0,00; 29,64)); частка HPV16-положительних пацієнток із CIN I становить 27,27 %. При середній CIN II дисплазії епітеліоцити ШМ характеризуються середнім рівнем проліферації (Me Ki-67 = 44,96 % (34,91; 55,41)) і помірним рівнем експресії p16<sup>INK4a</sup> (Me = 75,71 (51,24; 82,41)); частка HPV16-положительних пацієнток із CIN II становить 71,43 %. При важкій CIN III дисплазії епітелій ШМ характеризується високим рівнем проліферативної активності (Me Ki-67 = 74,62 % (68,50; 84,67)) і високим рівнем експресії p16<sup>INK4a</sup> (Me = 117,47 (95,38; 123,93)); частка HPV16-положительних пацієнток із CIN III становить 77,78 %. У всіх хворих на РШМ у пухлинних клітинах виявлена ядерно-цитоплазматична експресія HPV16, а також високий рівень експресії Ki-67 і p16<sup>INK4a</sup>. Наявні прямі кореляційні зв'язки між рівнями експресії Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16, а також показниками ступеня тяжкості CIN.

**Висновки.** Дані, що отримали, свідчать: із наростанням тяжкості диспластичних змін багатослоєвого плоского епітелію ШМ зростає й експресія епітеліоцитами Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16. Відсутність статистично значущих відмінностей між показниками експресії Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в епітелії ШМ із важкої CIN III дисплазією та в пухлинних клітинах РШМ свідчить про те, що ці маркери не відіграють вирішальної ролі в диференціальній діагностиці важкої дисплазії та плоскоклітинного РШМ.

## Immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer

V. A. Tumanskiy, Z. A. Pyrogova

Squamous cervical cancer (SCC) is a common tumor in women, which is preceded by the series of pathological processes, among which the key role is played by cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

**Aim.** To study the characteristics of immunohistochemical (IHC) expression of Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 in squamous cervical epithelium (SCE) with dysplastic changes of varying degree (CIN I–III) and also in the tumor cells of SCC.

**Materials and methods.** Pathohistological and IHC studies of uterine cervix biopsies from 53 patients (the age ranged from 18 to 45 years) were performed.

**Results.** It was found that SCE with CIN I is characterized by the low Ki-67 expression level (Me = 17.87 % (13.76, 22.44)) and the extremely low p16<sup>INK4a</sup> expression level (Me = 0.00 CUOD (0.00; 29.64)). The proportion of HPV16-positive patients with CIN I is 27.27 %. CIN II is characterized by the average proliferation level in SCE (Me = 44.96 % (34.91, 55.41)) and the moderate p16<sup>INK4a</sup> expression level (Me = 75.71 CUOD (51.24, 82, 41)). The proportion of HPV16-positive patients with CIN II is 71.43 %. CIN III is characterized by the high proliferation level (Me = 74.62 % (68.50, 84.67)) and by the high p16<sup>INK4a</sup> expression level of in SCE (Me = 117.47 CUOD (95.38, 123, 93)); the proportion of HPV16-positive patients with CIN III is 77.78%. In all the patients with SCC, nuclear and cytoplasmic expression of HPV16 was detected in the tumor cells. High expression levels of Ki-67 and p16<sup>INK4a</sup> were detected in the tumor cells. There are direct correlations between the expression levels of Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 and CIN degree.

**Conclusions.** These data indicate that the expression levels of Ki-67, p16<sup>INK4a</sup> and HPV16 increase with the increasing of CIN grade. The absence of statistically significant differences between the expression levels of Ki-67, p16<sup>INK4a</sup> and HPV16 in CIN III and the same levels in the tumor cells of SCC indicates that these markers cannot be used for differential diagnosis between CIN III and SCC.

Рак шейки матки (РШМ) является одним из самых распространённых онкологических заболеваний в развитых странах мира [8]. По данным Национального канцер-реестра Украины, заболеваемость РШМ занимает 2 место в структуре онкозаболеваемости женщин в возрасте 30–54 лет, а также 2 место в структуре смертности от злокачественных новообразований женщин в возрасте 18–54 лет [1].

В настоящее время доказано, что основным этиологическим фактором РШМ является вирус папилломы человека (ВПЧ) [8, 10]. При этом способность индуцировать злокачественный рост имеют только онкогенные штаммы ВПЧ: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 70 типа [7]. Кроме того, известно, что ВПЧ 16 типа и филогенетически родственные 31, 33, 35, 52, 58 типы вируса индуцируют развитие плоскоклеточного РШМ, в то время как ВПЧ 18 типа и ВПЧ 39, 45, 59 и 68 типов индуцируют развитие аденокарциномы шейки матки (ШМ) [13].

С развитием РШМ тесно связана проблема предопухолевых патологических процессов ШМ. Ключевую роль среди них играет цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN), которая градуируется по степени тяжести на лёгкую (CIN I), средней степени (CIN II) и тяжёлую CIN III [5]. Своевременное выявление инфицирования онкогенными штаммами ВПЧ и наличия CIN разной степени тяжести важно для снижения заболеваемости и смертности от РШМ. Несмотря на известные микроскопические критерии, которые дают возможность определять степень тяжести CIN, в настоящее время углублённо изучаются иммуногистохимические (ИГХ) маркеры, позволяющие уточнить прогностическое значение CIN разной степени тяжести для развития РШМ. С этой целью определяются уровни экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67, применяющегося для отличия CIN от доброкачественных реактивных

изменений ШМ [11], а также белка p16, препятствующего образованию комплекса Cyclin D/Cdk4,6 и G<sub>1</sub>-S переходу в клеточном цикле [3], повышенная экспрессия которого в многослойном плоском эпителии ШМ ассоциирована с инфицированием онкогенными штаммами ВПЧ [4, 14]. Кроме того, существуют моноклональные антитела к определённым типам ВПЧ, в том числе и к ВПЧ 16 типа (HPV16), который играет важную роль в трансформации CIN в плоскоклеточный РШМ. Однако данные об уровне экспрессии перечисленных маркеров в CIN различной степени тяжести и их взаимосвязи с вероятностью развития РШМ противоречивы.

### Цель работы

Изучить особенности иммуногистохимической экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в цервикальной интраэпителиальной неоплазии различной степени тяжести и в плоскоклеточном раке шейки матки у женщин, инфицированных вирусом папилломы человека.

### Материалы и методы исследования

Проведено комплексное патоморфологическое исследование биопсийного материала ШМ 43 пациенток 18–45 лет, у которых при ПЦР исследовании было обнаружено инфицирование ВПЧ. По степени тяжести дисплазии эпителия ШМ (CIN) выделено 4 группы: 1 группа – 11 биоптатов ШМ со слабой CIN I дисплазией, 2 группа – 14 биоптатов ШМ с умеренной CIN II дисплазией, 3 группа – 9 биоптатов ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией, 4 группа – 9 биоптатов плоскоклеточного РШМ. В контрольной группе исследован материал 10 биоптатов ШМ обычной гистоструктуры у женщин, не инфицированных ВПЧ.

**Key words:**  
cervix uteri,  
uterine cervical  
neoplasms,  
human papilloma  
virus,  
Ki-67 antigen.

**Pathologia**  
2017; 14 (2), 202–208

В парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, оценивали структуру экзоцервикса, а также наличие и степень тяжести CIN в соответствии с гистологической классификацией опухолей женской половой системы [5]. ИГХ-исследование проводили по стандартной методике [9] с использованием моноклональных антител Mo a-Hu Ki-67 Antigen, *Clone MIB-1*, (DAKO, Дания), Mo Anti-p16(INK4) Antigen, *Clone G175-405* (BioGenex, США), Mo Antibody to Human Papilloma Virus type 16, *Clone Camvir-1* (Diagnostic BioSystems, США), а также системы визуализации DAKO EnVision+ System с диаминобензидином (DAKO, Дания).

Уровень экспрессии Ki-67 эпителием и опухолевыми клетками ШМ оценивали в баллах по B. Risberg et al. (2002) путём подсчёта процента клеток с иммунопозитивными (ИМПЗ) ядрами в 5 полях зрения микроскопа Axioplan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении  $\times 200$ . При этом 0–5 % клеток с ИМПЗ ядрами составляли 0 баллов, 6–25 % ИМПЗ клеток – 1 балл, 26–50 % ИМПЗ клеток – 2 балла, 51–75 % ИМПЗ клеток – 3 балла и 76–100 % ИМПЗ клеток – 4 балла. Ноль и 1 балл соответствовали низкому уровню экспрессии Ki-67, 2 и 3 балла – среднему уровню, 4 балла – высокому уровню экспрессии Ki-67.

Уровень экспрессии p16<sup>INK4a</sup> эпителием и опухолевыми клетками ШМ измеряли методом фотоцифровой морфометрии [2]. ИГХ-микропрепараты фотографировали цифровой камерой «Olympus 3040» (Япония) в микроскопе Axioplan 2 («Carl Zeiss», ФРГ) при увеличении  $\times 200$  в 5 полях зрения, интенсивность экспрессии оценивали в плагине Colour Deconvolution программы обработки цифровых изображений ImageJ в баллах (от 0 – белый до 255 – черный) и градуировали на 4 уровня: негативная реакция – 0–20 баллов; низкий уровень экспрессии – 21–50 баллов; умеренный – 51–100 баллов; высокий

уровень экспрессии – более 100 баллов.

При оценке результатов ИГХ-реакции на HPV16 учитывали наличие либо отсутствие позитивной реакции в эпителии и опухолевых клетках ШМ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану уровня экспрессии (Me), нижний и верхний квартили (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>). Для анализа различий экспрессии ИГХ маркеров в биоптатах ШМ с диспластическими изменениями и в биоптатах ШМ нормальной гистологической структуры рассчитывали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Анализ различий экспрессии исследованных ИГХ маркеров в CIN различной степени тяжести проводили при помощи непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Наличие связей между уровнями экспрессии исследуемых ИГХ маркеров и градацией CIN определяли с помощью расчёта коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

В результате ИГХ-исследования установлено, что у женщин, не инфицированных ВПЧ, многослойный плоский эпителий ШМ имеет обычную структуру и характеризуется низким уровнем пролиферации: медиана экспрессии Ki-67 составляет 5,46 % (4,96; 6,03). Ядерная экспрессия Ki-67 имеет место в одиночных эпителиоцитах базального и парабазального слоев экзоцервикса. Экспрессия p16<sup>INK4a</sup> и HPV16 в многослойном плоском эпителии ШМ обычной гистоструктуры не выявляется. Это соответствует данным современной научной литературы, по которым в многослойном плоском эпителии ШМ уровень экспрессии Ki-67 колеблется в пределах 3–10 %, а экспрессия маркеров p16<sup>INK4a</sup> и HPV16 не определяется [6, 15, 16].

В биоптатах ШМ пациенток 1 группы с патологическим диагнозом CIN I многослойный плоский эпителий ШМ характеризуется низким уровнем пролиферации: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 17,87 % (13,76; 22,44). Ядерная экспрессия Ki-67 имеет место в эпителиоцитах парабазального слоя и в единичных клетках промежуточного слоя. У 27 % пациенток 1 группы с CIN I в промежуточном и поверхностном слоях эпителиального пласта ШМ выявляется ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16<sup>INK4a</sup> крайне низкого уровня: медиана экспрессии p16<sup>INK4a</sup> составляет 0,00 (0,00; 29,64). У 27,27 % пациенток с CIN I выявлена экспрессия HPV16 в ядрах одиночных койлоцитов (эпителиоцитов, подвергшихся койлоцитарной трансформации), локализованных преимущественно в парабазальном и промежуточном слоях экзоцервикса.

При ИГХ исследования биоптатов ШМ пациенток 2 группы с CIN II установлено, что Ki-67-иммунопозитивные клетки занимают от 1/3 до 2/3 толщи эпителиального пласта ШМ (рис. 1).

Многослойный плоский эпителий ШМ с диспластическими изменениями средней степени тяжести характеризуется средним уровнем пролиферативной

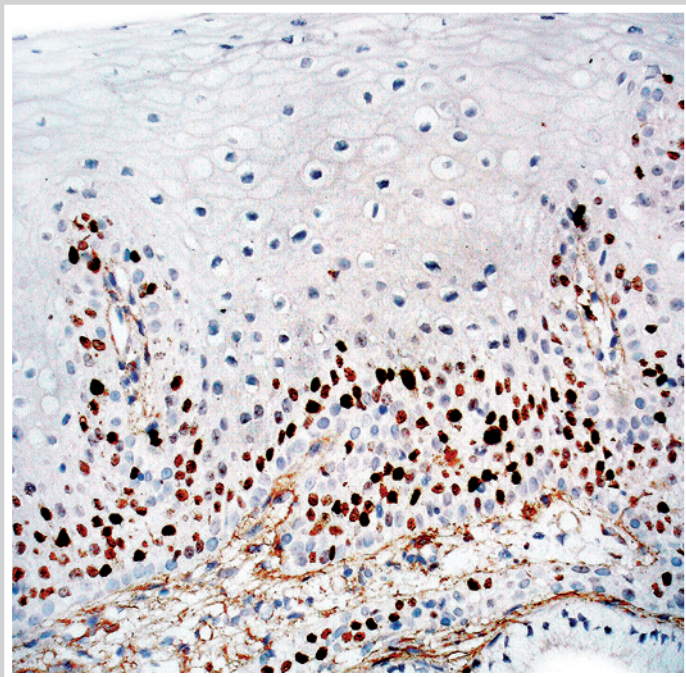


Рис. 1. Умеренный уровень экспрессии Ki-67 эпителием шейки матки при CIN II.  $\times 200$ .

активности: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 44,96 % (34,91; 55,41). Разница между низким уровнем экспрессии Ki-67 в эпителиоцитах ШМ с лёгкой CIN I дисплазией и средним уровнем экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ со средней CIN II дисплазией статистически значима ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

У 12 (86 %) пациенток 2 группы с CIN II в эпителиоцитах парабазального и промежуточного слоёв экзоцервикса имеет место ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16<sup>INK4a</sup>, у 2 (14 %) пациенток – негативная ИГХ-реакция на белок p16<sup>INK4a</sup> в эпителии шейки матки. Медиана уровня экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в эпителии ШМ с CIN II составляет 75,71 (51,24; 82,41), что соответствует умеренному уровню экспрессии данного маркера. Разница между уровнями экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в эпителии шейки матки с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией статистически значима ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

У 71,43 % пациенток 2 группы со средней CIN II дисплазией эпителия ШМ в койлоцитах, локализованных в парабазальном и промежуточном слоях экзоцервикса, определяется ядерная HPV16 (рис. 4). Разница между уровнями экспрессии данного маркера в эпителии ШМ с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией статистически значима ( $p < 0,05$ ).

При ИГХ исследовании биоптатов ШМ пациенток 3 группы с тяжёлой CIN III дисплазией эпителия Ki-67-иммунопозитивные эпителиоциты выявляются во всех слоях экзоцервикса. Многослойный плоский эпителий ШМ с тяжёлыми диспластическими изменениями CIN III характеризуется средним уровнем пролиферации: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 74,62 % (68,50; 84,67). Разница между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ с лёгкой CIN I, средней CIN II и тяжёлой CIN III дисплазией статистически значима ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). В эпителиоцитах всех слоёв экзоцервикса ШМ с CIN III определяется высокий уровень ядерно-цитоплазматической экспрессии p16<sup>INK4a</sup>, медиана которой составляет 117,47 (95,38; 123,93). Разница между уровнями экспрессии белка p16<sup>INK4a</sup> в эпителии ШМ с лёгкой CIN I, средней CIN II и тяжёлой CIN III дисплазией статистически значима ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

У 77,78 % пациенток 3 группы с CIN III в койлоцитах, локализованных во всех слоях экзоцервикса, определяется ядерная экспрессия HPV16. Разница между уровнями экспрессии данного маркера в эпителии ШМ с лёгкой CIN I, средней CIN II и тяжёлой CIN III дисплазией статистически значима ( $p < 0,05$ ).

При ИГХ-исследовании биоптатов ШМ пациенток 4 группы с патогистологическим диагнозом РШМ установлено, что Ki-67-ИМП3 опухолевые клетки хаотично располагаются на протяжении всей толщи опухолевого пласта (рис. 5). Опухолевые клетки характеризуются средним уровнем пролиферации: медиана уровня экспрессии Ki-67 составляет 75,10 % (44,92; 80,36). Разница между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией, а также в опухолевых клетках РШМ статистически значима ( $p < 0,05$ ), в то же время медианы экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ статистически достоверно не отличаются ( $p > 0,05$ ) (рис. 2).

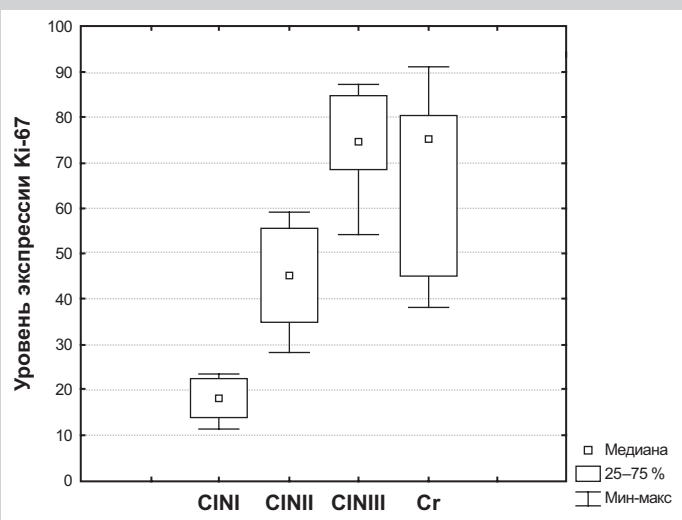


Рис. 2. Уровень экспрессии Ki-67 в многослойном плоском эпителии шейки матки с лёгкой CIN I, средней CIN II, тяжёлой CIN III дисплазией и в плоскоклеточном раке шейки матки (Cr coli uteri).

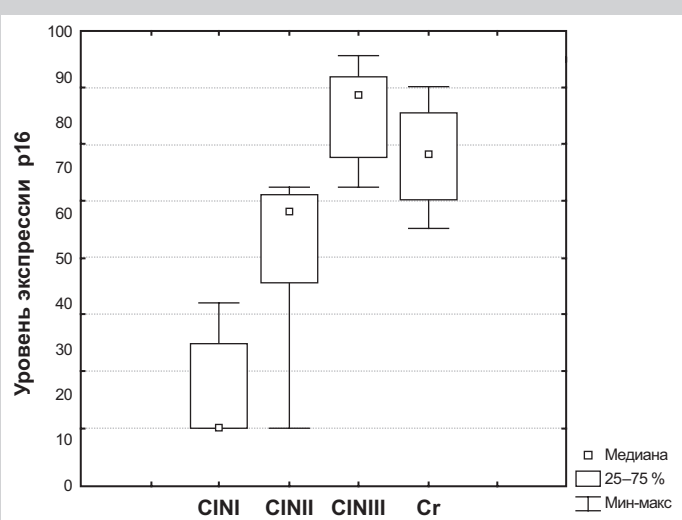


Рис. 3. Уровень экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в многослойном плоском эпителии шейки матки с лёгкой CIN I, средней CIN II, тяжёлой CIN III дисплазией и в плоскоклеточном раке шейки матки (Cr coli uteri).

В опухолевых клетках плоскоклеточного РШМ у всех пациенток 4 группы определяется ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16<sup>INK4a</sup> (рис. 6), медиана которой составляет 96,31 (80,32; 111,25), что соответствует умеренному уровню экспрессии данного маркера.

Разница между уровнями экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в эпителии ШМ с лёгкой CIN I и средней CIN II дисплазией, а также в опухолевых клетках РШМ статистически достоверна ( $p < 0,05$ ), в то время как между медианами экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в эпителии ШМ с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ статистически значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ) (рис. 3).

Кроме того, у всех больных РШМ в опухолевых клетках выявляется ядерная экспрессия HPV16. Разница между показателями экспрессии данного маркера в эпителии ШМ с лёгкой CIN I дисплазией

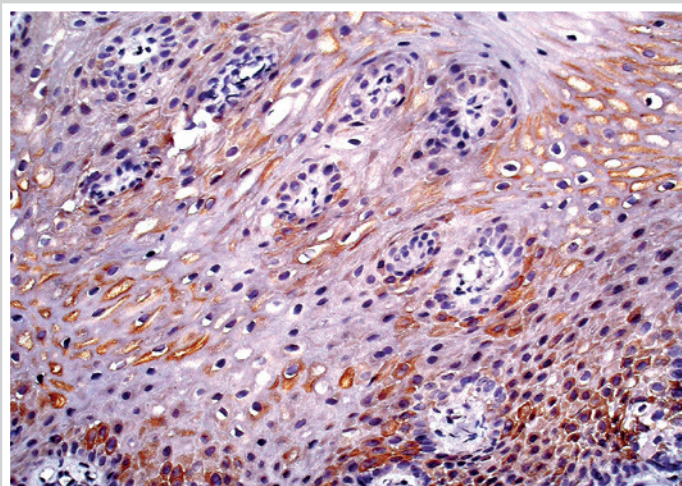


Рис. 4. Экспрессия HPV16 в койлоцитах и в эпителии экзоцервикса при CIN II. x200.

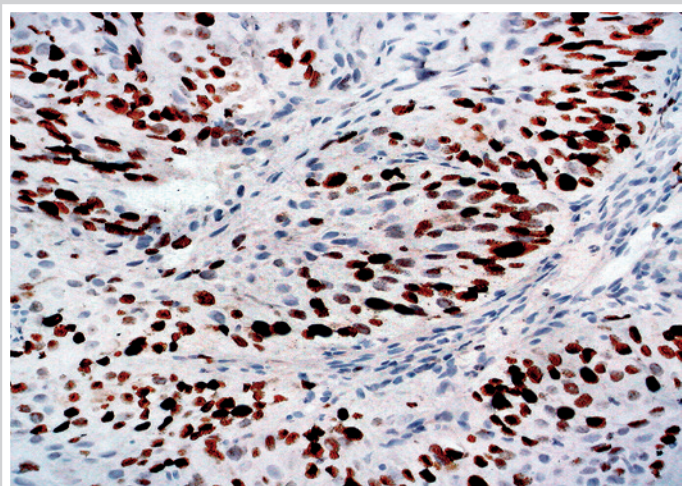


Рис. 5. Ki-67-иммунопозитивные опухолевые клетки в плоскоклеточном раке шейки матки. x250.

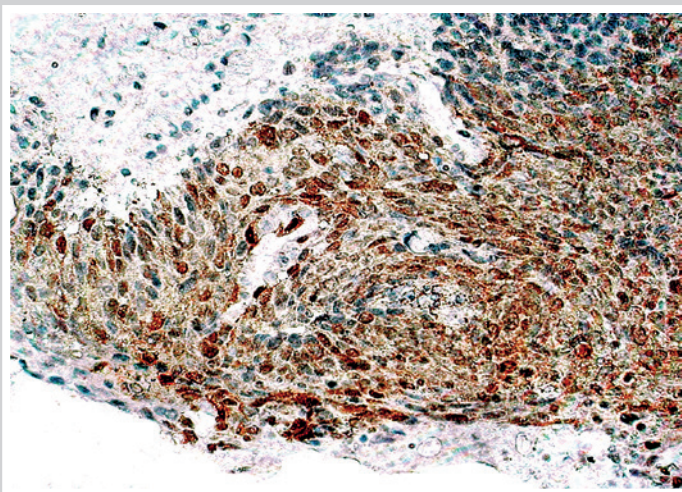


Рис. 6. Ядерно-цитоплазматическая экспрессия p16<sup>INK4a</sup> в опухолевых клетках плоскоклеточного рака шейки матки. x200.

и в опухолевых клетках РШМ статистически значима ( $p < 0,05$ ), в то время как медианы ядерной экспрессии HPV16 в эпителии ШМ со средней CIN II дисплазией и в опухолевых клетках РШМ достоверно не отличаются, также не выявлено статистически значимых различий в экспрессии этого маркера в эпителии ШМ с тяжелой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках РШМ ( $p > 0,05$ ).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии статистически значимых различий между возрастанием уровня клеточной пролиферации, определяемого по экспрессии Ki-67, и возрастанием степени тяжести дисплазии эпителии ШМ в последовательности CIN I – CIN II – CIN III. K. Gupta et al. [6] также обнаружили статистически значимые различия между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ при дисплазии разной степени: CIN I, CIN II и CIN III. В то же время M. Panjkoviæ, T. Ivkoviæ-Kapicl [15] нашли статистически значимые различия между уровнями экспрессии Ki-67 в эпителии ШМ при легкой CIN I и средней CIN II дисплазии, но не обнаружили статистически значимой разницы между уровнями экспрессии этого маркера в эпителии ШМ при средней CIN II и тяжелой CIN III дисплазии. Полученные нами данные о возрастании уровня экспрессии маркера p16<sup>INK4a</sup> и частоты выявления положительной реакции с HPV16 при возрастании дисплазии эпителии в последовательности CIN I – CIN II – CIN III согласуются с результатами исследований A. Godoy, K. Bazzo, F. Pasqualotto [12] и M. G. Donà et al. [16]. Л. М. Захарцева и Е. А. Пекур (2013) возрастание экспрессии p16<sup>INK4a</sup> в неоплазиях ШМ рассматривают как косвенный признак интеграции ВПЧ высокого риска в клеточный геном с последующей опухолевой трансформацией эпителиальных клеток [5].

При анализе полученных результатов был выявлен ряд корреляций между уровнями экспрессии маркеров Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16, а также показателем степени тяжести дисплазии эпителии ШМ (табл. 1).

Установлено, что в эпителии ШМ с легкой CIN I, средней CIN II и тяжелой CIN III дисплазией имеется прямая сильная корреляционная связь между уровнями экспрессии эпителиоцитами Ki-67 и белка p16<sup>INK4a</sup> (коэффициент корреляции Спирмена = 0,95), а также между уровнем экспрессии эпителиоцитами Ki-67 и показателем степени тяжести дисплазии эпителии шейки матки CIN (коэффициент корреляции Спирмена = 0,92). M. Panjkoviæ, T. Ivkoviæ-Kapicl (2006) также нашли наличие корреляции между уровнем экспрессии эпителием ШМ Ki-67 и показателем степени тяжести дисплазии CIN [15]. Нами получены данные о тесной взаимосвязи между инфицированием клеток экзоцервикса HPV16 и возрастанием пролиферации эпителиоцитов ШМ, о чём свидетельствует прямая корреляционная связь средней силы между уровнями экспрессии Ki-67 и маркера HPV16 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,63), что соответствует данным других исследователей [12]. Кроме того, была выявлена прямая корреляционная связь средней силы между уровнями экспрессии маркеров p16<sup>INK4a</sup> и HPV16 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,66), а также между уровнями экспрессии HPV16 и показате-

лем степени тяжести CIN (коэффициент корреляции Спирмена = 0,40). Между уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> и показателем степени тяжести CIN была выявлена прямая сильная корреляционная связь (коэффициент корреляции Спирмена = 0,88).

Белок p16<sup>INK4a</sup> представляет собой ингибитор циклин-зависимых киназ и играет важную роль в регуляции клеточного цикла, повышенная экспрессия p16<sup>INK4a</sup> может запускать остановку клеточного деления [5]. Многие опухоли характеризуются инактивацией гена *p16INK4a*, что приводит к нарушению регуляции клеточного цикла и к неконтролируемой пролиферации клеток. В опухолях, связанных с трансформирующим действием ВПЧ, отмечается возрастание экспрессии p16<sup>INK4a</sup>, которое оказывается неэффективным для регуляции клеточного цикла [5]. Среди них A. Godoy et al. (2014) сообщали о наличии взаимосвязи между инфицированием HPV16 эпителия шейки матки, возрастанием уровня экспрессии им p16<sup>INK4a</sup> и возрастанием степени тяжести дисплазии CIN [17]. Кроме того, ИГХ маркеры HPV16 и p16<sup>INK4a</sup> были предложены рядом авторов в качестве биомаркеров, приемлемых для оценки степени тяжести диспластических изменений в ШМ [12, 18]. В то же время P. Zhong et al. (2015) не обнаружили корреляций между уровнями экспрессии HPV16 и p16<sup>INK4a</sup> в эпителии шейки матки с CIN различной степени тяжести [16].

A. Godoy et al. (2008) получили данные о том, что экспрессия маркеров p16 и Ki-67 прогрессивно нарастает с возрастанием степени дисплазии и достигает максимума при тяжёлой CIN III дисплазии и при РШМ [12]. Однако полученные нами данные об отсутствии статистически значимых различий между показателями экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 в эпителии шейки матки с тяжёлой CIN III дисплазией и в опухолевых клетках рака шейки матки свидетельствуют о том, что эти маркеры не играют решающей роли в дифференциальной диагностике тяжёлой дисплазии и плоскоклеточного рака шейки матки.

## Выводы

1. При лёгкой CIN I дисплазии эпителий шейки матки характеризуется низким уровнем пролиферации по экспрессии Ki-67 (Me = 17,87 % (13,76; 22,44)) и крайне низким уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 0,00 (0,00; 29,64)); доля HPV16-позитивных пациенток с CIN I составляет 27,27 %.

2. При средней CIN II дисплазии эпителиоциты шейки матки характеризуется средним уровнем пролиферации по экспрессии Ki-67 (Me = 44,96 % (34,91; 55,41)) и умеренным уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 75,71 (51,24; 82,41)); доля HPV16-позитивных пациенток с CIN II составляет 71,43 %.

3. При тяжёлой CIN III дисплазии эпителий шейки матки характеризуется высоким уровнем пролиферативной активности по экспрессии Ki-67 (Me = 74,62 % (68,50; 84,67)) и высоким уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 117,47 (95,38; 123,93)); доля HPV16-позитивных пациенток с CIN III составляет 77,78 %.

4. У всех больных раком шейки матки в опухолевых клетках выявлена ядерная экспрессия HPV16. Опухо-

**Таблица 1.** Характеристика корреляционных связей между уровнями экспрессии Ki-67, p16<sup>INK4a</sup>, HPV16 и показателем степени тяжести дисплазии эпителия шейки матки CIN

	Ki-67	p16 <sup>INK4a</sup>	HPV16	CIN
Ki-67	1,00	0,95*	0,63*	0,92*
p16 <sup>INK4a</sup>	0,95*	1,00	0,66*	0,88*
HPV16	0,63*	0,66*	1,00	0,40*
CIN	0,92*	0,88*	0,40*	1,00

\*: наличие корреляционной связи.

левые клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии Ki-67 (Me = 75,10 % (44,92; 80,36)) и высоким уровнем экспрессии p16<sup>INK4a</sup> (Me = 96,31 (80,32; 111,25)).

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госбюджетной НИР «Дослідження інвазивно-метастатичних властивостей пухлин та їх раннє прогнозування в біоптатах хворих» (0114U000967) 2014–2016, которая финансировалась МЗ Украины.

**Funding.** The research was carried out within the state budget scientific-research work “Research of invasive-metastatic properties of tumors and their early prognosis in biopsies of patients” (0114U000967), 2014–2016, funded by the Ministry of Health of Ukraine.

## Список литературы

- Захворюваність та смертність від злоякісних новоутворень. Стан онкологічної допомоги населенню / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. І. Михайлович та ін. // Рак в Україні, 2013–2014 : бюлетень Національного канцер-реєстру України. – 2015. – №16. – С. 1–6.
- Пат. 99314 Україна, МПК 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / В. О. Туманський, А. В. Євсєєв, І. С. Коваленко, М. Д. Зубко ; заявк. і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т; заявл. 29.12.14.; опубл. 25.05.15 // Бюлетень. – №10.
- Буртушкина Н. К. Структура неопухолевих захворювань шейки матки / Н. К. Буртушкина, А. Ф. Куперт, Е. Г. Кокунова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 102. – №3. – С. 121–123.
- Должиков А. А. Иммуноморфологическое исследование метаболитических и пролиферативных маркеров при плоскоклеточном раке шейки матки / А. А. Должиков // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – №1. – С. 233.
- Захарцева Л. М. Частота экспрессии белка p16INK4a и наличие вируса папилломы человека при дисплазии шейки матки / Л. М. Захарцева, Е. А. Пекур // Онкология. – 2013. – Т. 15. – №1. – С. 9–13.
- Apoptotic Index and Mib-1 Antibody Expression in Premalignant and Malignant Lesions of Uterine Cervix / K. Gupta, K. Alam, V. Maheshwari et al. // Gynecology & Obstetrics. – 2013. – Vol. 3. – P. 117–22.
- Albero G. Human Papillomavirus and Related Diseases Report / G. Albero, L. Barrionuevo-Rosas, F. X. Bosch. – ICO HPV Information Centre, 2016. – P. 245–255.
- Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases / X. F. Bosch, T. R. Broker, F. David et al. // Vaccine. – 2013. – №31. – H1–H31.
- Dabbs D. J. Diagnostic Immunohistochemistry / D. J. Dabbs. – 3rd ed. – New York: Ch. Livingstone, 2010. – 941 p.
- Developing role of HPV in cervical cancer prevention / H. C. Kitchener, K. Denton, K. Soldan, E. J. Crosbie // BMJ. – 2013. – №347. – P. 4781–4789.
- Ki-67 Quantitative Evaluation as a Marker of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Human Papillomavirus Infection / M. Marko, T. Sjeana, K. Goran, et al. // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2010. – Vol. 20. – Issue 1. – P. 116–119.
- Godoy A. HPV pathogenesis and biomarkers of viral progression and cervical cancer: A literature review / A. Godoy, K. Bazzo, F. Pasqualotto // World Journ. of Biology and Biological Sc. – 2014. – Vol. 2. – №1. – P. 26–33.
- HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: A population-based study / K. Sigurdsson, F. J. Taddeo, K. R. Benediktsdottir et al. // Int. J. Cancer. – 2007. – №121. – P. 2682–2687.
- P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1 / P. Zhong, J. Li, Y. Gu et al. // Int. J. Clin. and Experim. Path. – 2015. – Vol. 8. – №3. – P. 2979–2986.

- [15] p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA / A. E. Godoy, J. Mandelli, F. H. Oliveira et al. // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* – 2008. – Vol. 41. – P. 583–588.
- [16] p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy / M. G. Donà, A. Vocaturo, M. Giuliani et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2012. – №126. – Issue 2. – P. 198–202.
- [17] Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology / K. U. Petry, D. Schmidt, S. Scherbring et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – №121. – P. 505–509.
- [18] Comprehensive cervical cancer control / WHO // *A guide to essential practice*. Second edition, 2014. – P. 12–14.
- [17] Petry, K. U., Schmidt, D., Scherbring, S., Luyten, A., Reinecke-Lüthge, A., Bergeron, C., et al. (2011) Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecologic Oncology*, 121, 505–9. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.033.
- [18] WHO (2014). Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice, 12–14.

#### Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, проректор по научной работе, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный деятель науки и техники Украины.  
ORCID ID 0000-0001-8267-2350.

Пирогова З. А., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

#### Відомості про авторів:

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, проректор із наукової роботи, Запорізький державний медичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.  
ORCID ID 0000-0001-8267-2350.

Пирогова З. О., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

#### Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Pro-rector for Scientific Work, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Science and Engineering Worker of Ukraine.  
ORCID ID: 0000-0001-8267-2350.

Pirigova Z. A., Assistant, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University.

#### Конфликт интересов: отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 19.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 23.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 26.05.2017



## Проблемні питання лікування ендометріюїдних кіст яєчників у жінок репродуктивного віку

О. С. Шаповал

ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти Міністерства охорони здоров'я України»

Поширення ендометріюїдної хвороби, труднощі в діагностиці, виборі тактики лікування зумовлюють наявні проблеми менеджменту ендометріозу. Відсутність настання періоду стійкої ремісії, висока частота рецидиву захворювання дають підставу вважати цю проблему актуальною у групі пацієнток репродуктивного віку, особливо серед жінок із раніше реалізованим репродуктивним потенціалом, оскільки саме вагітність вважається важливим принципом у лікуванні ендометріюїдної хвороби.

**Мета роботи** – вивчення ефективності різних схем лікування ендометріюїдних кіст яєчників у пацієнток із раніше реалізованим репродуктивним потенціалом.

**Матеріали та методи.** Обстежили 44 жінки у віці 17–49 років: перша група – 25 здорових невагітних жінок, друга – 19 жінок з ендометріюїдними кістами яєчників, які отримували традиційне (підгрупа 2а) та комплексне (підгрупа 2б) лікування.

**Результати.** Виявлено, що в пацієнток, які отримували традиційну терапію, після завершення курсу лікування спостерігалась вихідна активація гуморальної ланки імунної системи, що вказувало на необхідність застосування імунокорекції. У хворих, які отримували комплексну терапію, відзначалась нормалізація імуногомеостазу організму, стабілізація процесів апоптозу та проліферації – основних ланок етіопатогенезу ендометріюїдної хвороби, що свідчило про підвищення ефективності лікування. Здійснюючи контрольну УЗД у динаміці через 1 і 3 місяці в пацієнток, які продовжували прийом комплексної терапії, відзначали зменшення розміру патологічного утворення та виражений антипроліферативний ефект на гіперпластично змінений ендометрій, що діагностований до початку лікування у 21,05 % хворих. Через 3 місяці лікування необхідності в біопсії ендометрію в цій групі пацієнток не було.

**Висновки.** При використанні комплексного підходу до лікування ендометріюїдних кіст яєчників відзначається нормалізація показників імуногомеостазу організму, регрес ендометріюїдних утворень яєчників і відсутність гіперпластичних процесів ендометрію, що дає можливість рекомендувати таку схему для дальшого використання.

### Ключові слова:

ендометріюїдні кісти яєчників, імунодіагностика, ультразвукове дослідження.

**Патологія.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 209–213

**DOI:** 10.14739/2310-1237.2017.2.109669

**E-mail:** shapoval\_olga@ukr.net

## Проблемные вопросы лечения эндометриозидных кист яичников у женщин репродуктивного возраста

О. С. Шаповал

Широкое распространение эндометриозидной болезни, трудности в диагностике и выборе тактики лечения обуславливают существующие проблемы менеджмента эндометриоза. Отсутствие наступления периода стойкой ремиссии, высокая частота рецидива заболевания позволяют считать данную проблему актуальной в группе пациенток репродуктивного возраста, и особенно среди женщин с ранее реализованным репродуктивным потенциалом, поскольку именно беременность считается важным принципом в лечении эндометриозидной болезни.

**Цель работы** – изучение эффективности различных схем лечения эндометриозидных кист яичников у пациенток с ранее реализованным репродуктивным потенциалом.

**Материалы и методы.** Обследовано 44 женщины в возрасте 17–49 лет: первая группа – 25 здоровых небеременных женщин, вторая группа – 19 женщин с эндометриозидными кистами яичников, получавших традиционное (подгруппа 2а) и комплексное (подгруппа 2б) лечение.

**Результаты.** Вывявлено, что у пациенток, получавших традиционную терапию, по окончании курса лечения наблюдалась исходная активация гуморального звена иммунной системы, что указывало на необходимость применения иммунокоррекции. У больных, получавших комплексную терапию, отмечалась нормализация иммуногомеостазу организма, стабилизация процессов апоптоза и пролиферации – основных звеньев этиопатогенеза эндометриозидной болезни, что свидетельствовало о повышении эффективности проводимого лечения. При проведении контрольного УЗИ в динамике через 1 и 3 месяца у пациенток, которые продолжали приём комплексной терапии, отмечалось уменьшение размера патологического образования и выраженный антипролиферативный эффект на гиперпластически изменённый эндометрий, диагностированный до начала лечения у 21,05 % больных. Через 3 месяца лечения необходимости в проведении биопсии эндометрия в данной группе пациенток не было.

**Выводы.** При использовании комплексного подхода к лечению эндометриозидных кист яичников отмечается нормализация показателей иммуногомеостазу организма, регресс эндометриозидных кист яичников и отсутствие гиперпластических процессов эндометрия, что позволяет рекомендовать данную схему для дальнейшего использования.

### Ключевые слова:

эндометриозидные кисты яичников, иммуно-диагностика, ультразвуковое исследование.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 209–213

## Problematic issues of treatment of ovarian endometriomas in women of reproductive age

O. S. Shapoval

**Introduction.** The wide spread of endometriosis disease, difficulties in diagnosing and choosing the tactics of its treatment cause the existing problems of management of endometriosis. Absence of the onset of the period of stable remission, high

### Key words:

endometriosis, immunologic tests, ultrasonography.

**Pathologia** 2017; 14 (2), 209–213

frequency of recurrence of the disease make it possible to consider this problem actual in the group of patients of reproductive age, and especially among women with previously realized reproductive potential, since pregnancy is considered to be the important principle of treatment of endometriosis.

**The aim of the study** was to study the effectiveness of various treatment regimens for endometriomas in patients with previously realized reproductive potential.

**Materials and Methods.** 44 women aged from 17 to 49 years were examined: the first group consisted of 25 healthy nonpregnant women, the second group included 19 women, with endometriomas receiving the traditional (subgroup 2a) and complex (subgroup 2b) treatment.

**Results.** It was revealed that in patients receiving traditional therapy, in the end of the course of treatment, the initial activation of the humoral unit of the immune system was observed, which indicated the need for immunocorrection. In patients receiving complex therapy, normalization of the body's immune homeostasis, stabilization of the processes of apoptosis and proliferation, the main links in the etiopathogenesis of endometriosis were noted, which indicated an improvement in the effectiveness of the treatment. The control ultrasound in the dynamics in 1 and 3 months in patients who continued to receive complex therapy, revealed a decrease in the size of pathological formation and a pronounced antiproliferative effect on the hyperplastically altered endometrium, diagnosed before the start of treatment in 21.05 % of patients. After 3 months of treatment, there was no need for an endometrial biopsy in this group of patients.

**Conclusions.** With the use of a comprehensive approach to the treatment of endometriomas normalization of the body's immunodeficiency parameters, regression of the endometriomas and the absence of hyperplastic endometrial processes are noted, which allows to recommend this scheme for further use.

Поширення ендометріюїдної хвороби, труднощі в діагностиці, виборі методу лікування зумовлюють наявні проблеми менеджменту ендометріозу. Довготривала консервативна терапія з вірогідною конверсією в оперативні методики накладають відбиток на ритм життя сучасної жінки й супроводжуються матеріальними, психологічними втратами [1]. Найпоширенішими формами ендометріозу вважаються ендометріоз яєчників та аденоміоз, частота яких, за даними дослідників, варіює від 12 до 40 % [2,3]. Особливості такої локалізації, високий відсоток злукоутворення обтяжують ступінь безпліддя, котре, за даними ряду авторів, при ендометріозі діагностується у 20–50 % жінок репродуктивного віку [4,5]. Дисбаланс між процесами проліферації та апоптозу, швидкість появи нових гетеротопій, імунологічні порушення також впливають на повноцінне функціонування органів репродуктивної системи, особливо на процеси овуляції [1,4,6,7]. Наявні методи лікування ендометріюїдних кіст яєчників дають змогу досягти стану тимчасової ремісії. Виконані в минулому оперативні втручання без протирецидивної реабілітаційної терапії продемонстрували свою неефективність. Так, протягом перших 5 років після цистектомії частота рецидивів становить 50–55 % [4,7]. Тому актуальними залишаються проблеми вивчення та корекції нових аспектів ланок етіопатогенезу ендометріюїдної хвороби.

### Мета роботи

Вивчення ефективності різних схем лікування ендометріюїдних кіст яєчників у пацієнток із реалізованим репродуктивним потенціалом.

### Матеріали і методи дослідження

Обстежили 80 жінок у віці 17–49 років. Першу групу (контрольну) становили 25 здорових невагітних жінок репродуктивного віку без ознак гінекологічної та хронічної соматичної патології, які реалізували свою репродуктивну функцію та звернулися до лікувального закладу з питань вибору контрацепції. До другої групи

увійшли 19 жінок, які народили і в яких на УЗД діагностована ендометріюїдна кіста яєчника. Залежно від проведеної терапії хворих поділили на 2 підгрупи. Підгрупа 2a (9 жінок) – пацієнтки, які отримували традиційне лікування препаратами прогестерону та протизлукову терапію. Підгрупа 2b (10 жінок) – пацієнтки, які отримували комплексне лікування, що передбачало поряд із традиційною терапією використання препаратів з імуномодулюючим та антипроліферативними ефектом.

Для оцінювання ефективності терапії всі пацієнтки пройшли сонологічне дослідження органів малого таза до початку лікування та через 1 і 3 місяці. У всіх пацієнток вивчали показники адаптивного імунітету. Визначення субпопуляційного складу лімфоцитів здійснювали за допомогою використання моноклональних антитіл до антигенів CD<sub>3</sub><sup>+</sup> (загальна кількість Т-лімфоцитів), CD<sub>4</sub><sup>+</sup> (Т-хелпери), CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (Т-супресори), CD<sub>19</sub><sup>+</sup> (В-лімфоцити) виробництва НВО «Гранум» (м. Харків). Визначали показники гуморальних факторів (IgA, IgM, IgG) із використанням моноспецифічних сироваток проти відзначених імуноглобулінів за методом Mancini G.

Статистичне опрацювання даних виконали з використанням комп'ютерних програм пакета Statistica (StatSoft Statistica v.6.0). Статистичну значущість відмінностей порівнюваних показників із нормальним розподілом встановлювали з використанням t-критерію Стьюдента для середніх величин. У випадках, коли характер розподілу аналізованих показників за критерієм згоди Колмогорова–Смирнова не відповідав нормальному закону, статистичну значущість порівнюваних показників встановлювали з використанням критерію серій Вальда–Вольфовіца при рівні значущості  $p < 0,05$ . Аналізовані дані представлені як медіана (Me) та міжквартильний розмах (RQ), що являє собою різницю між значеннями 75 та 25 перцентилей ( $RQ = 75\% UQ - 25\% LQ$ ), де UQ – верхній квартиль; LQ – нижній квартиль.

### Результати та їх обговорення

Дані, що отримані при сонологічному дослідженні до лікування, виявили вірогідне збільшення лінійних розмірів

матки щодо жінок контрольної групи, а саме – довжини – в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ), товщини – в 1,57 раза ( $p < 0,05$ ). Відзначалось вірогідне збільшення лінійних показників довжини та товщини обох яєчників. Показники об'єму здорових яєчників були збільшені в 2,54 раза у групах порівняння, що хоч не було статистично вірогідно, але клінічно свідчило про розвиток гіперплазії органа. Об'єм яєчників з ендометріомою був вірогідно збільшений у 5,53 раза порівняно з контрольною групою. Мінімальні розміри ендометріодних вогнищ сонологічно розпізнавалися як включення у тканині яєчника, максимальні розміри становили 74,3 мм. Показники М-ехо були вірогідно збільшені в 1,53 раза, що свідчило про активізацію процесів проліферації. У 15,79 % хворих відзначалась неоднорідність М-ехо. Загалом у другій групі у 21,05 % жінок виявлені міома матки та фонова патологія ендометрія. Локалізація ендометріодних гетеротопій, крім яєчників, сонологічно встановлена практично в кожному п'ятому випадку. Це зумовлює складність лікування таких пацієнток і необхідність пошуку комплексного підходу до терапевтичної корекції.

Раніше під час дослідження імунного статусу в жінок з ендометріодною хворобою виявили зміни, які характеризувались збереженням кількості Т-лімфоцитів та їхніх субпопуляцій, незначним збільшенням кількості В-лімфоцитів, гіперглобулінемією [8]. Грунтуючись на цих результатах, здійснили порівняльний аналіз стану імунного статусу в жінок, які отримували традиційне та комплексне лікування (табл. 1).

У результаті дослідження встановили, що вміст лімфоцитів із фенотипом  $CD_3^+$  і  $CD_4^+$  у жінок 2а підгрупи відповідав показникам контролю, водночас відзначалось несуттєве підвищення на 13 % кількості лімфоцитів із фенотипом  $CD_8^+$  і зниження лімфоцитів із фенотипом  $CD_{16}^+$  на 18 % (табл. 1).

У жінок 2б підгрупи загальна кількість Т-лімфоцитів із фенотипом  $CD_3^+$ , рівень Т-лімфоцитів із хелперною функцією ( $CD_4^+$ ) і Т-кілерів ( $CD_8^+$ ) не змінювались щодо відповідних значень контрольної групи. Вміст НК-клітин ( $CD_{16}^+$ ) був знижений на 41 % відносно групи контролю.

Вміст лімфоцитів із фенотипом  $CD_{19}^+$  у жінок 2а підгрупи збільшувався на 25 % стосовно контролю. Показники концентрації IgA та IgM перевищували значення контрольної групи на 19 % і 64 % відповідно, на тлі практично не зміненого рівня IgG (табл. 2).

У жінок 2б підгрупи рівень лімфоцитів із фенотипом  $CD_{19}^+$  збільшувався на 13 % щодо контролю. Концентрація IgA, IgM та IgG перевищувала значення контрольної групи на 31 %, 27 %, 10 % відповідно.

Отже, в жінок 2а підгрупи спостерігався дисбаланс Т-клітинної системи, котрий на цьому етапі можна трактувати як «прихований імунodefіцитний стан», що перебігає на тлі запального процесу, котрий, вочевидь, потребує комплексного лікування з застосуванням імунomodельючої терапії.

У жінок 2б підгрупи відзначався дисбаланс Т-клітинної системи, який супроводжується, вочевидь, транзиторним аутоімунним компонентом, що свідчить про збіг патогенетичної структури імунних порушень зі спектром імунoактивності препаратів, котрі застосовували.

Результати дослідження свідчать: при традиційній терапії в лікуванні ендометріодних кіст яєчників

**Таблиця 1.** Стан Т-клітинної ланки імунної системи в жінок з ендометріодними кістами залежно від напрямку терапії, Ме (75 % Q–25 % Q = RQ)

Показник, одиниці вимірювання	1 група (n = 25)	2а підгрупа (n = 9)	2б підгрупа (n = 10)
$CD_3^+$ , %	64 (66 – 64 = 2)	64 (66 – 60 = 6)	64 (68 – 60 = 8)
$CD_4^+$ , %	38 (40 – 36 = 4)	38 (46 – 36 = 10)	40 (42 – 38 = 4)
$CD_8^+$ , %	22 (32 – 18 = 14)	25 (28 – 19 = 9)	22 (32 – 20 = 12)
$CD_{16}^+$ , %	17 (25 – 12 = 13)	14* (22 – 9 = 13)	10* (19 – 5 = 14)

\*: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо контрольної групи;

†: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо 2а підгрупи.

**Таблиця 2.** Стан гуморальної ланки імунної системи в жінок з ендометріодними кістами залежно від напрямку терапії, Ме (75 % Q–25 % Q = RQ)

Показник, одиниці вимірювання	1 група (n = 25)	2а підгрупа (n = 9)	2б підгрупа (n = 10)
$CD_{19}^+$ , %	16 (20 – 14 = 6)	20 (23 – 18 = 5)	18 (24 – 14 = 10)
Ig A, r/l	1,6 (1,9 – 1,2 = 0,7)	1,9* (2,2 – 1,8 = 0,4)	2,1* (2,4 – 1,9 = 0,5)
Ig M, r/l	1,1 (1,4 – 0,8 = 0,7)	1,8* (2,0 – 1,2 = 0,8)	1,4 (1,7 – 1,1 = 0,6)
Ig G, r/l	10 (12 – 8 = 4)	10 (12 – 9 = 3)	11* (12 – 9 = 3)

\*: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо контрольної групи;

†: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо 2а підгрупи.

зберігаються імунні порушення, зокрема, активація гуморальної ланки імунної системи, що надалі може призвести до розвитку вторинних бактеріальних інфекцій. Це диктує необхідність застосування препаратів з імунomodельюючим ефектом.

З метою корекції імунних порушень пацієнтки підгрупи 2б приймали амінодигідрофталазидіон натрію в режимі 0,1 г 2 рази на добу 20 днів. Препарат має імунomodельюючий і протизапальний ефект унаслідок зменшення активності гіперактивованих макрофагів, пригнічення синтезу прозапальних цитокінів, стимуляції фагоцитозу та покращення мікробіцидної функції нейтрофілів гранулоцитів. Виражений вплив відбувається на антителогенез, особливо підвищується синтез Ig G. Комплексне лікування доповнювалося призначенням антипроліферативного комбінованого препарату індол-3-карбінол, який містив індол-3-карбінол – 90 мг, екстракт броколі – 10 мг, суміш овочів сімейства хрестоцвітних – 238 мг, аскорбінову кислоту – 50 мг у режимі 1 капсула 2 рази на добу під час їжі протягом 3 місяців. Препарат блокує гормон-залежні та гормон-незалежні механізми, які активізують патологічний клітинний ріст, впливає на клітини з високим проліферативним потенціалом. Антипроліферативний ефект реалізується внаслідок нормалізації метаболізму та балансу естрогенів, зниження утворення патологічного метаболіту 16 $\alpha$ -гідроксіестрону шляхом активації певних ізоформ цитохрому P450. Також відбувається вплив на систему цитоплазматичних протеїнази, пригнічення ефектів прозапальних цитокінів.

Оцінювання ефективності терапії здійснювали на підставі визначення даних ультразвукового обстеження через 1 і 3 місяці на тлі курсу лікування. Результати дослідження наведені в таблиці 3.

**Таблиця 3.** Дані ультразвукового обстеження в динаміці у групах порівняння через 1 і 3 місяці терапії (M ± m, мм)

Параметри	1 група (n = 25)	підгрупа 2a (n = 9)	підгрупа 2b (n = 10)
<b>Результати через 1 місяць терапії</b>			
Параметри матки			
Довжина	51,58 ± 0,48	46,0 ± 1,9*	45,0 ± 1,7*
Ширина	46,42 ± 0,62	44,02 ± 1,12*	42,17 ± 1,54*
Товщина	35,08 ± 0,54	37,44 ± 1,26	37,12 ± 1,38
M-ехо	6,12 ± 0,75	7,37 ± 0,67	7,34 ± 0,63
Параметри контрлатеральних яєчників			
Довжина, мм	30,32 ± 0,17	35,33 ± 1,32*	34,31 ± 1,17*
Ширина, мм	28,14 ± 0,13	24,11 ± 1,98*	23,75 ± 1,08*
Товщина, мм	16,72 ± 0,17	26,17 ± 1,36*	25,24 ± 1,15*
Об'єм, см <sup>3</sup>	7,44 ± 0,67	15,23 ± 2,23*	14,32 ± 1,57*
Параметри яєчників з ендометріодною кістою			
Довжина, мм	30,32 ± 0,17	46,34 ± 2,14*	44,17 ± 2,35*
Ширина, мм	28,14 ± 0,13	36,28 ± 2,19*	34,72 ± 2,15*
Товщина, мм	16,72 ± 0,17	29,26 ± 3,23*	27,32 ± 3,48*
Об'єм, см <sup>3</sup>	7,44 ± 0,67	28,17 ± 3,43*	25,54 ± 3,53*
<b>Результати через 3 місяці терапії</b>			
Параметри матки			
Довжина	51,58 ± 0,48	45,82 ± 0,85*	44,13 ± 0,85*
Ширина	46,42 ± 0,62	43,16 ± 0,43**	41,14 ± 0,47**
Товщина	35,08 ± 0,54	36,45 ± 1,12	35,42 ± 1,14
M-ехо	6,12 ± 0,75	6,28 ± 0,34 †	5,18 ± 0,33†
Параметри контрлатеральних яєчників			
Довжина, мм	30,32 ± 0,17	34,32 ± 1,17*	32,61 ± 1,32
Ширина, мм	28,14 ± 0,13	24,09 ± 1,08*	23,35 ± 1,16*
Товщина, мм	16,72 ± 0,17	25,94 ± 1,15*	23,76 ± 1,23*
Об'єм, см <sup>3</sup>	7,44 ± 0,67	14,32 ± 1,57*	13,28 ± 1,32*
Параметри яєчників з ендометріодною кістою			
Довжина, мм	30,32 ± 0,17	45,22 ± 1,34*	42,35 ± 1,65*
Ширина, мм	28,14 ± 0,13	35,75 ± 1,38*	32,58 ± 1,34*
Товщина, мм	16,72 ± 0,17	28,37 ± 2,37*	24,37 ± 2,43*
Об'єм, см <sup>3</sup>	7,44 ± 0,67	27,91 ± 4,76*	22,93 ± 4,73*

\*: статистично значуща різниця (p &lt; 0,05) щодо контрольної групи;

†: статистично значуща різниця (p &lt; 0,05) щодо підгрупи 2a.

Виявлено зменшення лінійних розмірів матки в групах порівняння, а також вірогідне зменшення показника M-ехо через 3 місяці лікування в підгрупі 2b. Це свідчить про стабілізацію проліферативного потенціалу клітин, а тканина ендометрію, як найактивніше проліферуюча структура в організмі, підтверджує цей факт. Через 1 і 3 місяці терапії відзначалось також зменшення лінійних розмірів та об'єму обох яєчників. Виявлені клінічні відмінності між підгрупами. Отже, результати свідчать про ефективність комплексного підходу до лікування ендометріодної хвороби та дають можливість рекомендувати цю схему лікування лікарям акушерам-гінекологам.

## Висновки

1. Для пацієнток з ендометріодними кістами яєчників характерними є порушення в імунній системі, які характеризуються підвищенням кількості В-лімфоцитів та основних груп імуноглобулінів, що свідчить про порушення механізмів імунного захисту та підтверджує їхню участь у патогенезі ендометріодної хвороби.

2. На тлі традиційного лікування ендометріодних кіст яєчників після завершення курсу те-

рапії зберігається активація гуморальної ланки імунної системи, що зумовлює необхідність проведення імунокорекції.

3. У 21,05 % пацієнток з ендометріозом діагностуються гіперпластичні процеси ендометрію, що свідчить про підвищений проліферативний потенціал та зумовлює необхідність призначення препаратів з антипроліферативним ефектом.

4. У групі пацієнток з ендометріозом яєчників, які отримували комплексну терапію, відзначалася нормалізація показників імуногемостазу організму, регрес ендометріодних утворень яєчників і відсутність гіперпластичних процесів ендометрію, що дає можливість рекомендувати цю схему для використання.

**Перспективи подальших наукових досліджень** полягають у розробці алгоритму обстеження та прогнозування перебігу захворювання з метою початкового вибору консервативного або оперативного методу лікування.

## Список літератури

- [1] Баскаков В.П. Эндометриодная болезнь / В.П. Баскаков, Ю.В. Цвелев, Е.Ф. Кира. – СПб., 2012. – 452 с.
- [2] Унанян А.Л. Активный и неактивный аденомиоз: клинико-морфологические варианты развития, дифференцированный подход к терапии / А.Л. Унанян, И.С. Сидорова, Е.А. Коган // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2012. – Т. 6. – №2. – С. 25–30.
- [3] Авраменко Н.В. Эндометриоз: патогенез, классификация, диагностика, современные аспекты терапии / Н.В. Авраменко // Патология. – 2014. – №2(31). – С. 4–11.
- [4] Brosens I. Endometriosis in adolescents is a hidden, progressive and severe disease that deserves attention, not just compassion / I. Brosens, S. Gordts, G. Benagiano // Human Reproduction. – 2013. – Vol. 28. – P. 2026–2031.
- [5] Эндометриоз и фертильность. Ключевые моменты лечения / С.А. Гаспарян, Р.М. Ионова, О.С. Попова, А.А. Хрипунова // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2015. – Т. 9. – №4. – С. 66–72.
- [6] Sourial S. Theories on the Pathogenesis of Endometriosis / S. Sourial, N. Tempest, D.K. Hapangama // International Journal of Reproductive Medicine. – 2014. – Vol. 14. – P. 187–196.
- [7] Ковалева Л.А. Особенности терапии эндометриоза (клиническая лекция) / Л.А. Ковалева // Гинекология. – 2013. – Т. 15. – №4. – С. 19–22.
- [8] Шаповал О.С. Состояние клеточного и гуморального звеньев иммунной системы у женщин репродуктивного возраста с новообразованиями яичников / О.С. Шаповал, Л.П. Воронцова // Патология. – 2014. – №3(32). – С. 83–87.

## References

- [1] Baskakov, V. P., Cvelev, Yu. V., & Kira, E. F. (2012). *Endometrioidnaya bolezn' [Endometriosis disease]*. Saint Petersburg. [in Russian].
- [2] Unanyan, A. L., Sidorova, I. S., & Kogan, E. A. (2012). Aktivnyi i neaktivnyi adenomioz: kliniko-morfologicheskie varianty razvitiya, differencirovannyi podkhod k terapii [Active and inactive adenomiosis: clinicomorphologic variables of development and differential approach to treatment]. *Akusherstvo, ginekologiya i reprodukcija*, 6(2), 25–30. [in Russian].
- [3] Avramenko, N. V. (2014). Endometrioz: patogenez, klassifikaciya, diagnostika, sovremennye aspekty terapii [Endometriosis: etiology, pathogenesis, diagnostics, modern aspects of treatment]. *Pathologia*, 2(31), 4–11. doi: <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1237.2014.2.28543>. [in Russian].
- [4] Brosens, I., Gordts, S., & Benagiano, G. (2013). Endometriosis in adolescents is a hidden, progressive and severe disease that deserves attention, not just compassion. *Human Reproduction*, 28, 2026–2031. doi: 10.1093/humrep/det243.
- [5] Gasparyan, S. A., Ionova, R. M., Popova, O. S., & Khripunova, A. A. (2015). Endometrioz i fertill'nost'. Klyucheveye momenty lecheniya [Endometriosis and fertility. Key moment of treatment]. *Akusherstvo, ginekologiya i reprodukcija*, 9(4), 66–72. doi: 10.17749/2070-4968.2015.9.4.066-072. [in Russian].
- [6] Sourial, S., Tempest, N., & Hapangama, D. K. (2014). Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *International Journal of Reproductive Medicine*, 14, 187–196.

- [7] Kovaleva, L. A. (2013). Osobennosti terapii e'ndometrioza (klinicheskaya lekciya) [Endometriosis therapy features (clinical lecture)]. *Ginekologiya*, 15(4), 19–22. [in Russian].
- [8] Shapoval, O. S., & Vorontsova, L. L. (2014). Sostoyanie kletchnogo i gumoral'nogo zven'ev immunnoj sistemy u zhenschin reproduktivnogo vozrasta s novoobrazovaniyami yaichnikov [State of cellular and humoral immune system in women of reproductive age with tumor-like ovary formations]. *Pathologia*, 3(32), 83–87. doi: <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1237.2014.3.36982>.

---

**Відомості про автора:**

Шаповал О. С., канд. мед. наук, доцент каф. акушерства та гінекології, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України».

**Сведения об авторе:**

Шаповал О. С., канд. мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии, ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

**Information about author:**

Shapoval O. S., PhD, Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, SI "Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education", Ukraine.

---

**Конфлікт інтересів:** відсутній.**Conflicts of Interest:** author has no conflict of interest to declare.

---

Надійшло до редакції / Received: 10.04.2017

Після доопрацювання / Revised: 03.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 15.06.2017

# The effectiveness of GenoType MTBDRplus using in the diagnosis of tuberculosis in Zaporizhzhia region

R. M. Yasynskiy<sup>1</sup>, O. M. Raznatovska<sup>1</sup>, O. V. Konakova<sup>1</sup>, O. M. Kamysnyi<sup>1</sup>,  
N. A. Rokhmanova<sup>2</sup>, A. V. Klymenko<sup>2</sup>, Jean-Luc Berland<sup>3</sup>, Marie Gauhier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, <sup>2</sup>MI "Zaporizhzhia Regional Antituberculous Clinical Dispensary", Ukraine,

<sup>3</sup>Fondation Mérieux, Emerging Pathogens Laboratory, France

## Key words:

tuberculosis,  
diagnostic  
techniques  
and procedures,  
genotype,  
efficiency.

## Pathologia

2017; 14 (2), 214–218

## DOI:

10.14739/2310-1237.  
2017.2.109670

## E-mail:

phthisiologist@  
gmail.com

The method GenoType MTBDRplus, v.2 allows to study clinical material from positive and negative smears, to examine patients with new and previously treated cases of tuberculosis pulmonary and extrapulmonary localization. But now there is a small amount of researches concerning the use of this method in the diagnosis of tuberculosis.

**Aim.** To evaluate the effectiveness of GenoType MTBDRplus, v.2 method using in clinical material research due to the diagnosis of tuberculosis in the Zaporizhzhia region in comparison with standard methods of investigation.

**Materials and methods.** The analysis of 52 results of studies of clinical material using the GenoType MTBDRplus test system, v.2 from patients who were examined and treated in dispensaries of the Zaporizhzhia region in 2016 was carried out. There were 67.3 % of men and 32.7 % of women among the patients. The mean age of the patients was 46.0 ± 1.9 years. The study of the clinical material using the GenoType MTBDRplus test, v.2 was performed according to the standard instructions.

**Results.** The results were positive in 12.5 % of the cases when tested by GenoType MTBDRplus, v.2 ( $p < 0.05$ ) among negative results of the microscopy of the clinical material. The proportion of coincidence between the cultural and molecular genetic methods was 90 % for sputum and 100 % for other clinical material. In the presence of multiresistance, both methods of investigation coincided in the number of detected cases (50 % for the GenoType MTBDRplus method, v.2 and 42.9 % for the cultural method, respectively,  $p < 0.05$ ). In comparison with the results of the cultural method, the GenoType MTBDRplus test, v.2 made it possible to establish resistance to rifampicin in 35.7 % ( $p < 0.05$ ) of patients whose resistance was not determined. False-positive and false-negative results are due, perhaps, to the heterogeneity of strains of mycobacterium tuberculosis in clinical specimens, the absence of viable mycobacteria, the absence of phenotypic manifestations of mycobacterium tuberculosis genetic mutations, and errors in the investigations. The sensitivity of the GenoType MTBDRplus test, v.2 is about 78 %, but the specificity reaches 97 %. At the same time, the sensitivity of the test for multidrug resistance determining reaches 100 %, the specificity is about 89 %. The greater positive predictive value for cases in which the DNA of mycobacteria is determined and the negative predictive value is for cases in which multidrug resistance is determined.

**Conclusions.** This indicates that the using of the GenoType MTBDRplus test, v.2, together with the cultural method of investigation, has a high diagnostic value, high sensitivity (100 %) and specificity (89 %) for the definition of multiresistance, and makes it possible to obtain a result in a short time compared to culture.

## Ключові слова:

туберкульоз,  
діагностичні  
технології,  
тест генотипу,  
ефективність.

Патологія. – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 214–218

## Ефективність застосування методу GenoType MTBDRplus у діагностиці туберкульозу в Запорізькій області

Р. М. Ясинський, О. М. Разнатовська, О. В. Коначова, О. М. Камишний,  
Н. А. Рохманова, А. В. Клименко, Жан-Люк Берланд, Марі Гуйєр

Метод GenoType MTBDRplus 2 версії (GenoType MTBDRplus, v.2) дає можливість досліджувати клінічний матеріал із позитивних і негативних мазків, обстежувати хворих із новими та повторними випадками туберкульозу легень і позалегенової локалізації. Але нині кількість досліджень щодо використання цього методу в діагностиці туберкульозу невелика.

**Мета роботи** – оцінити ефективність застосування методу дослідження клінічного матеріалу з використанням методу GenoType MTBDRplus, v.2 у діагностиці туберкульозу в Запорізькій області порівняно зі стандартними методами дослідження.

**Матеріали та методи.** Здійснили аналіз 52 результатів досліджень клінічного матеріалу за допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 від пацієнтів, які обстежувалися та лікувалися в диспансерах Запорізької області у 2016 році. Серед пацієнтів було 67,3 % чоловіків і 32,7 % жінок. Середній вік хворих становив 46,0 ± 1,9 року. Дослідження клінічного матеріалу з використанням тесту GenoType MTBDRplus, v.2 здійснили за стандартом, відповідно до інструкції виробника.

**Результати.** При негативних результатах мікроскопії клінічного матеріалу у 12,5 % випадках результати виявилися позитивними під час дослідження за допомогою методу GenoType MTBDRplus, v.2 ( $p < 0,05$ ). Частка збігів між культуральним і молекулярно-генетичним методами становила 90 % для харкотиння та 100 % для іншого клінічного матеріалу. За наявності мультирезистентності обидва методи дослідження майже збігалися за кількістю виявлених випадків (50,0 % для методу GenoType MTBDRplus, v.2 та 42,9 % для культурального методу відповідно,  $p > 0,05$ ). Порівняно з результатами культурального методу, тест GenoType MTBDRplus, v.2 дав можливість встановити стійкість до рифампіцину у 35,7 % ( $p < 0,05$ ) пацієнтів, у яких не визначалася стійкість. Хибно-позитивні та хибно-негативні результати зумовлені, можливо, гетерогенністю штамів мікобактерій туберкульозу у клінічних зразках, відсутністю життєздатних мікобактерій, фенотипічних

проявів генетичних мутацій мікобактерій туберкульозу, помилками під час дослідження тощо. Чутливість тесту GenoType MTBDRplus, v.2 становить майже 78 %, але специфічність сягає 97 %. Натомість чутливість тесту щодо встановлення мультирезистентності сягає 100 %, специфічність – майже 89 %. Більша прогностична цінність позитивного результату для випадків, у яких визначаються ДНК МБТ, а прогностична цінність негативного результату – для випадків, у яких визначається мультирезистентність.

**Висновки.** Застосування тесту GenoType MTBDRplus, v.2. поряд із культуральним методом дослідження має високу діагностичну цінність, високу чутливість (100 %) і специфічність (89 %) щодо визначення мультирезистентності й дає змогу отримати результат у коротший термін порівняно з культуральним дослідженням.

## Эффективность использования метода GenoType MTBDRplus в диагностике туберкулёза в Запорожской области

Р. Н. Ясинский, Е. Н. Разнатовская, О. В. Конакова, А. М. Камышный,  
Н. А. Рохманова, А. В. Клименко, Жан-Люк Берланд, Мари Гуйер

Метод GenoType MTBDRplus, v.2 позволяет исследовать клинический материал с положительных и отрицательных мазков, обследовать больных с новыми и повторными случаями туберкулёза лёгких и внелёгочной локализации. Но в настоящее время количество исследований касательно использования данного метода в диагностике туберкулёза невелико.

**Цель работы** – оценить эффективность использования метода исследования клинического материала с применением метода GenoType MTBDRplus, v.2 в диагностике туберкулёза в Запорожской области в сравнении со стандартными методами исследования.

**Материалы и методы.** Проведён анализ 52 результатов исследований клинического материала с использованием тест-системы GenoType MTBDRplus, v.2 от пациентов, которые обследовались и лечились в диспансерах Запорожской области в 2016 году. Среди пациентов – 67,3 % мужчин и 32,7 % женщин. Средний возраст больных составлял  $46,0 \pm 1,9$  года. Исследование клинического материала с использованием теста GenoType MTBDRplus, v.2 проводили по стандарту, согласно инструкции.

**Результаты.** При отрицательных результатах микроскопии клинического материала в 12,5 % случаев результаты оказались положительными при исследовании методом GenoType MTBDRplus, v.2 ( $p < 0,05$ ). Доля совпадений между культуральным и молекулярно-генетическим методами составила 90 % для мокроты и 100 % для другого клинического материала. При наличии мультирезистентности оба метода исследования совпадали по количеству выявленных случаев (50 % для метода GenoType MTBDRplus, v.2 и 42,9 % для культурального метода соответственно,  $p < 0,05$ ). В сравнении с результатами культурального метода, тест GenoType MTBDRplus, v.2 позволил установить устойчивость к рифампицину у 35,7 % ( $p < 0,05$ ) пациентов, у которых устойчивость не определялась. Ложно-положительные и ложно-отрицательные результаты обусловлены, возможно, гетерогенностью штаммов микобактерий туберкулёза в клинических образцах, отсутствием жизнеспособных микобактерий, фенотипических проявлений генетических мутаций микобактерий туберкулёза, ошибками при проведении исследования. Чувствительность теста GenoType MTBDRplus, v.2 составляет около 78 %, но специфичность достигает 97 %. В то же время чувствительность теста по определению мультирезистентности достигает 100 %, специфичность – около 89 %. Большая прогностическая значимость положительного результата для случаев, в которых определяются ДНК микобактерий, а прогностическая значимость отрицательного результата – для случаев, в которых определяется мультирезистентность.

**Выводы.** Это свидетельствует о том, что использование теста GenoType MTBDRplus, v.2 вместе с культуральным методом исследования имеет высокую диагностическую ценность, высокую чувствительность (100 %) и специфичность (89 %) по определению мультирезистентности и даёт возможность получить результат в более короткий срок сравнительно с культуральным исследованием.

Molecular-genetic (MG) test system GenoType MTBDRplus, v.2 allows simultaneously identifying *M. tuberculosis* complex (MBT) in a clinical material (sputum, pleural fluid, bronchial aspirate, liquor from, etc.) and its resistance to rifampicin (R), isoniazid (H) [1,2,5]. The complex polymerase chain reaction and followed hybridization on the strips and determination of mutations in different parts of the *rpoB* gene, causing the appearance of resistance to R, as well as in areas of gene *katG* and *inhA*, leading to the appearance of resistance to H are principles of the this method [2,5].

GenoType MTBDRplus, v.2 method in contrast to v. 1 allow examination of clinical material not only from positive but also negative smears, in patients with newly diagnosed and recurrent cases of pulmonary tuberculosis and extrapulmonary localizations of tuberculosis [5].

According to the foreign author's researches, test

system GenoType MTBDRplus, v.2 has high sensitivity, specificity, predictive value of positive and negative results allows to get results in the first 2 days of inspection, thereby increasing the efficiency of diagnosis chemo-resistant forms of tuberculosis [3,6,7,9,10].

But these researches regarding method's sensitivity and specificity are different, there is a small amount of national investigations relating to the application GenoType MTBDRplus, v.2 method in the diagnosis of tuberculosis, this resulted in the necessity of our own research.

### The aim

To evaluate the effectiveness of GenoType MTBDRplus, v.2 method using in clinical material research due to the diagnosis of tuberculosis in the Zaporizhzhia region in comparison with standard methods of investigation.

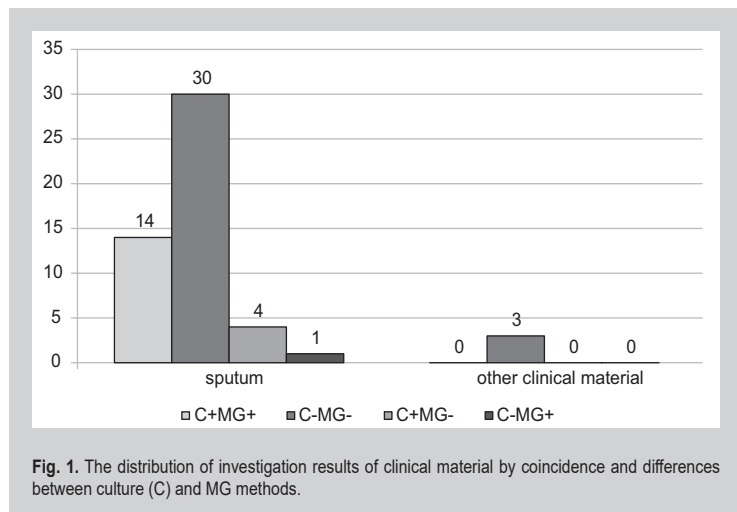
**Ключевые слова:**  
туберкулёз,  
диагностические  
технологии,  
тест genotypе,  
эффективность.

**Патология. – 2017. –**  
**Т. 14, № 2(40). –**  
**С. 214–218**

**Table 1.** The results of investigation by cultural and molecular genetic methods compared with the results of microscopy of clinical material

The method	Result	The results of microscopy				
		negative	1-9 AFB	1+	2+	3+
Cultural	Positive	7*	1	3	2	5
	Negative	33	1	0	0	0
Geno Type MTBDRplus, v.2	Positive	5*	0	3	2	5
	Negative	35	2	0	0	0
In total, n = 52		40	2	3	2	5

\*: significant difference between the results of the cultural, MG with smear microscopy results ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1.** The distribution of investigation results of clinical material by coincidence and differences between culture (C) and MG methods.

## Materials and methods

The analysis of 52 results of studies of clinical material using the GenoType MTBDRplus test system, v.2 from patients who were examined and treated in dispensaries of the Zaporizhzhia region in 2016 was carried out. There were 67.3 % of men and 32.7 % of women among the patients. The mean age of the patients was  $46.0 \pm 1.9$  years. Comparison of the received results by using the GenoType MTBDRplus, v.2 test was performed with standard methods of MBT identification: Ziehl-Neelsen staining method, microbiological method using an automated system BACTEC MGIT 960, seeding on solid culture media Lowenstein-Jensen and Finn II (the data of BACTEC MGIT 960 results in all cases coincide with the results on solid nutrient media, so their total results regarded as a cultural investigation results) with a further determination of resistance to drugs [4]. Results of smear microscopy were evaluated as negative – in cases of absence of acid-fast bacilli (AFB), 1–9 AFB – the presence of the appropriate number of AFB in smear microscopy, “1+” – in the presence of 10–99 AFB in smear, “2+” – in the presence of 1–10 AFB in each vision’s field of smear, “3+” – in the presence of more than 10 AFB in each vision’s field of smear [8].

In order to master the technique and for permission to perform this technique, physician-bacteriologist from Community institution “Zaporizhzhia regional clinical tuberculosis dispensary” was trained in the laboratory of new pathogens, Fondation Merieux (Lyon, France) from 12.01.2014 to 12.12.2014 in topic: “The identification of Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) and de-

termine its resistance to rifampicin and/or isoniazid using GenoTypeMTBDRplus” and received the certificate.

The study of the clinical material using the GenoType MTBDRplus test, v.2 was performed according to the standard instructions [2,5].

Statistical analysis was performed by using “Statistica® for Windows 6.0” (StatSoft Inc., № AXXR712D833214-FAN5). Statistical significance of differences between groups in qualitative indicators was determined by the one-tailed Fisher’s exact criterion. For the levels of statistical significance values of the probability of the difference between the groups ( $p$ ) levels of less than 0.05 were taken. We determined the sensitivity, specificity, predictive value of positive and negative results and their confidence intervals.

## Results and discussion

The results of the Geno Type MTBDRplus, v.2 test data with culture investigation data of clinical material comparatively with the microscopy results were compared (Table 1).

We determined that the results of these tests coincided with the microscopy result “3+”, “2+” and “1+” in 100 % of cases. If the result of microscopy was “1–9 AFB” there was a coincidence of results with cultural test in 50 % of cases. The results were positive in 17.5 % of the cases when tested by cultural method and in 12.5 % of the cases when tested by GenoType MTBDRplus, v.2 ( $p < 0.05$ ) among negative results of the microscopy of the clinical material. Thus, in negative results of smear microscopy of clinical material GenoType MTBDRplus, v.2 test and the cultural method have significant diagnostic value.

We found that presence of MBT DNA in clinical material was not detected by cultural test in 1 case, MBT were diagnosed only by using test system GenoType MTBDRplus, v.2 when comparing the results of diagnostic methods. In 4 cases MBT were found only by cultural method, and MG test system Geno Type MTBDRplus, v.2 showed negative results (Fig. 1).

The proportion of coincidence between the culture and molecular genetic methods was 90 % for sputum and 100 % for other clinical material.

False-positive and false-negative results are due, perhaps, to the heterogeneity of strains of mycobacterium tuberculosis in clinical specimens, the absence of viable mycobacteria, the absence of phenotypic manifestations of mycobacterium tuberculosis genetic mutations, and errors in the investigations.

When analyzing coincidence of positive results between test GenoType MTBDRplus, v.2 and cultural method we found that resistance to anti-tuberculosis drugs (H/R) by the cultural method was determined in 64 % of patients (Table 2). Mutations in the genotype of MBT that are responsible for resistance to H/R were determined in 93 % of patients by the GenoType MTBDRplus, v.2 method.

In the presence of drug resistance HR (multiresistance), both methods of investigation coincided in the number of detected cases (50 % for the GenoType MTBDRplus method, v.2 and 42.9 % for the cultural method, respectively,  $p > 0.05$ ). But the use of MG test allows you to receive the result within two days, which proves its diagnostic value.



In comparison with the results of the cultural method, the GenoType MTBDRplus test, v.2 made it possible to establish resistance to rifampicin in 35.7 % ( $p < 0.05$ ) of patients whose resistance was not determined.

That is, in a positive result of GenoType MTBDRplus, v.2 test its informativeness in determine resistance to drugs exceeded cultural method by almost 30 %. The difference between the results of MG and cultural methods, perhaps, due to the fact that not always the mutations that cause the occurrence of resistance to drugs appear phenotypically, as well as heterogeneity of strains of the pathogen.

Sensitivity, specificity and predictive value of Geno Type MTBDRplus, v.2 method was established compared to cultural results (Table 3).

According to the preliminary results of the investigation we found, that the sensitivity of the GenoType MTBDRplus test, v.2 is about 78 %, but the specificity reaches 97 %. At the same time, the sensitivity of the test for multidrug resistance determining reaches 100 %, the specificity is about 89 %. The greater positive predictive value for cases in which the DNA of MBT is determined and the negative predictive value is for cases in which multidrug resistance is determined.

## Conclusions

1. According to the preliminary results of the investigation we found, that the use of GenoType MTBDRplus, v.2 test system allows determining additional 12.5 % of patients with bacterial excretion among patients with negative smears,  $p < 0.05$ . The proportion of coincidence between the cultural and molecular genetic methods is 90 % for sputum and 100 % for other clinical material.

2. Test system GenoType MTBDRplus, v.2 allows establishing resistance to rifampicin in 35.7 % ( $p < 0.05$ ) patients, in comparison with the results of the cultural method. The proportion of multi-resistance detection is almost the same, but the diagnostic value of molecular genetic test is explained by much greater speed of results receiving (within two days versus to 2–3 weeks by use an automated system BACTEC MGIT 960 and 2–3 months – while use solid cultural media).

3. The specificity of positive result of GenoType MTBDRplus test, v.2 is 97 %, the sensitivity of the test for multidrug resistance determining reaches 100 %. The greater positive predictive value has MG method (93.3 %), and the negative predictive value – multidrug resistance determining (100 %).

**Perspectives of further researches.** Further investigation of clinical material from patients with pulmonary tuberculosis I and II categories of dispensary observation in Zaporizhzhia region by using a Geno Type MTBDRplus, v.2 test system according to the project Fondation Merieux (France and ZSMU, Ukraine). It is planned to add this method with determination of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs 2, identification of nontuberculous MBT.

**Funding:** material and technical support of research has been granted by Fondation Mérieux (France) on the basis of a memorandum between Zaporizhzhia State Medical University (Ukraine) and Fondation Mérieux (France), 2015.

**Table 2.** The distribution of investigation results of resistance to drugs by coincidence and differences between cultural and MG methods

Positive results of cultural methods, N = 14		resistance	Positive results of Geno Type MTBDRplus, v.2 method, N = 14	
abs.	%		abs.	%
5	35.7	H “-”, R “-”	1	7.2
0	0	H “-”, R “+”	5	35.7*
3	21.4	H “+”, R “-”	1	7.1
6	42.9	H “+”, R “+”	7	50.0

\*: significant difference between the results of cultural and MG methods ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Sensitivity, specificity and predictive value of Geno Type MTBDRplus, v.2 method

Parameters	Positive test	Resistance to HR
Sensitivity (confidence interval)	77.8 % (59.6–83.0 %)	100.0 % (61.6–100.0 %)
Specificity (confidence interval)	97.1 % (87.4–99.8 %)	88.9 % (63.3–88.9 %)
Predictive value of positive result (confidence interval)	93.3 % (71.5–99.6 %)	85.7 % (52.8–85.7 %)
Predictive value of negative result (confidence interval)	89.2 % (80.3–91.7 %)	100.0 % (71.2–100.0 %)

## References

- [1] Pustovyi, Yu. H., Baranova, V. V., Hritsova, N. A., & Dolynska, M. H. (2013). Vykorystannia molekuliarno-henetychnoho metodu GENO-TYPE® MTBDRPLUS dlia rannoi diahnozyky multyrezystentnogo tuberkulozu [Using of molecular genetic methods GENO-TYPE® MTBDRPLUS for early diagnosis of MDR TB]. *Ukrainskyi pulmonologichnyi zhurnal*, 3, 130. [in Ukrainian].
- [2] Barbova, A. I., Zhurylo, O. A., Zherebko, N. M., & Chaika, A. O. (2014). Porядok vykorystannia molekuliarno-henetychnykh metodiv u laboratoriiakh z diahnozyky tuberkulozu v Ukraini [The procedure of using molecular genetic techniques in the laboratory diagnosis of tuberculosis in Ukraine]. Kyiv. [in Ukrainian].
- [3] Nosova, E. Y., Krasnova, M. A., Galkina, K. Y., Makarova, M. V., Litvinov, V. I., Moroz, A. M. (2013). Sravnitel'naya oценка e'fektivnosti molekulyarnykh test-sistem «TB-Biochip», «Xpert MTB/Rif» i «GenoType MTBDRplus» dlya bystrogo opredeleniya mutacij, otvetstvennykh za lekarstvennuyu ustojchivost' Mycobacterium tuberculosis complex (v respiratornom materiale pacientov Moskovskogo regiona) [Comparative analysis of TB-Biochip, Xpert MTB/RIF, and GenoType MTBDRplus test systems for rapid determination of mutations responsible for drug resistance of M. tuberculosis complex (in sputum from patients in Moscow region)]. *Molekulyarnaya biologiya*, 47(2), 236–241. [in Russian].
- [4] Zhurylo, O. A., Barbova, A. I., Hlushkevych, T. H., & Tretiakova, L. V. (2012). Standarty bakteriologichnoi diahnozyky tuberkulozu v laboratoriiakh protytuberkuloznykh zakladiv Ukrainy [The standards of bacteriological diagnosis of tuberculosis in the laboratory TB facilities in Ukraine: study guide]. Kyiv. [in Ukrainian].
- [5] Alenova, A. X., Abyldaev, T. Sh., Zhumadylov, Zh. Sh., Berykova, E. A., Terlykbaeva, A. M., Berykhanova, K. E., et al. (2013). Struktura i algoritmy novyeshikh molekulyarno-geneticheskikh tekhnologij e'kspres diagnostiki tuberkuleza i lekarstvennoj ustojchivosti v Respublike Kazahstan [Structure and algorithms of the newest molecular genetic technologies for the rapid diagnosis of tuberculosis and drug resistance in the Republic of Kazakhstan]. Almaty. [in Russian].
- [6] Seifert, M., Ajbani, K., Georghiou, S. B., Catanzaro, D., Rodrigues, C., Crudo, V., et al. (2016). A performance evaluation of MTBDRplus version 2 for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 20(5), 631–637. doi: 10.5588/ijtld.15.0788.
- [7] Lyu, J., Kim, M. N., Song, J. W., Choi, C. M., Oh, Y. M., Lee, S. D., et al. (2013). GenoType® MTBDRplus assay detection of drug-resistant tuberculosis in routine practice in Korea. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 17(1), 120–124. doi: 10.5588/ijtld.12.0197.
- [8] European centre for disease prevention and control (2016) Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. Stockholm.
- [9] Simons, S. O., Van der Laan, T., De Zwaan, R., Kamst, M., Van Ingen, J., Dekhuijzen, P. N. R., et al. (2015). Molecular drug susceptibility testing in the Netherlands: performance of the MTBDRplus and MTBDRsl assays. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 19(7), 828–833. doi: 10.5588/ijtld.15.0043.

[10] Singh, L. S., Mazumder, P. B., & Sharma, G. D. (2014). Analysis of mutational pattern in multidrug resistant tuberculosis (MDR TB) in a geographically isolated northeastern region of India. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(1), 04–10. doi: 10.9790/3008-09130410.

Жан-Люк Берланд, дослідник, Фонд Мерсьє, Лабораторія патогенних збудників, Франція.  
Марі Гуйєр, дослідник, Фонд Мерсьє, Лабораторія патогенних збудників, Франція.

### Information about authors:

Yasinskyi R. N., MD, PhD, Assistant of the Department of Phthysiology and Pulmonology Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Raznatovska O. M., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Phthysiology and Pulmonology Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Konakova O. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Infectious Diseases Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Kamyshnyi O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Rokhmanova N. A., doctor-bacteriologist of the bacteriological department of the clinical diagnostic laboratory of the municipal institution «Zaporizhzhia Regional Antituberculous Clinical Dispensary», Ukraine.

Klymenko A. V., laboratory assistant of the bacteriological department of the clinical diagnostic laboratory of the municipal institution «Zaporizhzhia Regional Antituberculous Clinical Dispensary», Ukraine.

Jean-Luc Berland, Researcher, Fondation Mérieux, Emerging Pathogens Laboratory (EPL), France.

Marie Gauhier, Researcher, Fondation Mérieux, Emerging Pathogens Laboratory (EPL), France.

### Відомості про авторів:

Ясинський Р. М., канд. мед. наук, асистент каф. фізйатрії і пульмонології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Разнатовська О. М., д-р мед. наук, доцент, професор каф. фізйатрії і пульмонології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Конакова О. В., канд. мед. наук, доцент каф. дитячих інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Камішний О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Рохманова Н. А., лікар-бактеріолог бактеріологічного відділу клініко-діагностичної лабораторії КУ «Запорізький обласний протитуберкульозний клінічний диспансер», Україна.

Клименко А. В., лаборант-бактеріолог бактеріологічного відділу клініко-діагностичної лабораторії КУ «Запорізький обласний протитуберкульозний клінічний диспансер», Україна.

Жан-Люк Берланд, дослідник, Фонд Мерсьє, Лабораторія патогенних збудників, Франція.

Марі Гуйєр, дослідник, Фонд Мерсьє, Лабораторія патогенних збудників, Франція.

### Сведения об авторах:

Ясинский Р. Н., канд. мед. наук, ассистент каф. физиотри и пульмонологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Разнатовская Е. Н., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. физиотри и пульмонологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Конакова О. В., канд. мед. наук, ассистент каф. детских инфекционных болезней, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Рохманова Н. А., врач-бактериолог бактериологического отдела клинко-диагностической лаборатории КУ «Запорожский областной противотуберкулезный клинический диспансер», Украина.

Клименко А. В., лаборант-бактериолог бактериологического отдела клинко-диагностической лаборатории КУ «Запорожский областной противотуберкулезный клинический диспансер», Украина.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 31.03.2017

Після доопрацювання / Revised: 14.04.2017

Прийнято до друку / Accepted: 19.04.2017

## NSAIDs: can the presence of infectious agent influence the choice of analgesic drug?

O. A. Podpletnya, O. V. Khomiak, I. P. Koshova

SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine", Dnipro

**Purpose.** Considering the significant prevalence of comorbid pathology there is a high probability of NSAID use in patients with concomitant infection. In view of this screening of antimicrobial properties of their main groups was conducted for the purpose of selecting the most promising ones for further in-depth study.

**Materials and methods.** The study of microorganisms' sensitivity was conducted using standard research methods – the method of "wells" and by determining the antibacterial properties of drugs, using tablets, based on the ability of the drug to diffuse into agar, used for sowing the test-culture. As the test cultures *S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. Coli*, isolated from patients who were treated in hospital were used. Predominant blocker of COX-1 (acetylsalicylic acid, ASA), nonselective blockers of COX-1 and COX-2 (ketorolac, diclofenac sodium, ibuprofen, mefenamic acid, dexketoprofen), predominant blockers of COX-2 (meloxicam and nimesulide), selective blockers of COX-2 (celecoxib), selective blockers of COX-3 (COX-1 in the brain) paracetamol and metamizole were tested.

**Results.** The studies found that most of the tested NSAIDs have antimicrobial activity. Leader drugs in expressiveness of antimicrobial effects are drugs that have sufficient COX-1 (3) - activity: ASA, diclofenac, dexketoprofen, metamizole and lesser extent – paracetamol. Tested NSAIDs showed the highest activity against gram-positive coccal flora, mostly affecting *S. Pyogenes*. Blockers of COX-3 paracetamol and metamizole, unlike other studied drugs, showed stronger antipseudomonal (both – moderate) and antistaphylococcal action (metamizole).

**Conclusions.** NSAIDs with antimicrobial activity can potentially increase the activity of antiinfectious therapy. At the same time, the antimicrobial activity of NSAIDs, theoretically, can promote microbial resistance because of existence of microorganisms in a medium with subthreshold concentrations of drugs with antimicrobial activity. Considering this, further clinical and pharmacological research of this problem has a great practical importance.

**Key words:**  
NSAIDs,  
comorbidity,  
analgesics.

**Pathologia**  
2017; 14 (2), 219–223

**DOI:**  
10.14739/2310-1237.  
2017.2.109671

**E-mail:**  
koshevaya.ip@  
gmail.com

### НПЗП: чи може наявність інфекційного агента впливати на вибір знеболювального препарату?

O. A. Подплетня, O. B. Хомяк, I. П. Кошова

**Мета роботи** – у зв'язку із значною поширеністю коморбідної патології великою є ймовірність застосування НПЗП у хворих, що мають супутній інфекційний процес. З урахуванням цього здійснено скринінгове дослідження антимікробних властивостей основних груп цих препаратів із ціллю відбору найперспективніших із них для дальшого поглибленого вивчення.

**Матеріали та методи.** Чутливість МО вивчали з використанням стандартних методів дослідження: методу «колодязів» і методу визначення антибактеріальних властивостей препаратів за допомогою таблеток, що заснований на здатності лікарської речовини дифундувати в агар, на який висівали тест-культури. Як тест-культури використовували *S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, що виділені від хворих, які перебували на лікуванні у стаціонарі. Протестовані переважний блокатор ЦОГ-1 (ацетилсаліцилова кислота, АСК), неселективні блокатори ЦОГ-1 і ЦОГ-2 (кеторолак, диклофенак натрію, ібупрофен, мексенамінова кислота, декскетпрофен), переважні блокатори ЦОГ-2 (мелоксикам і німесулід), селективні блокатори ЦОГ-2 (целекоксиб), селективні блокатори ЦОГ-3 (ЦОГ-1 у мозку) парацетамол і метамізол.

**Результати.** Під час досліджень встановили, що більшість тестованих НПЗП має антимікробну активність. Препаратами-лідерами з виразності протимікробних ефектів є препарати, що мають достатню ЦОГ-1(3)-активність: АСК, диклофенак, декскетпрофен, метамізол, меншою мірою – парацетамол. Найбільшу активність тестовані НПЗП проявляли щодо грампозитивної кокової флори, більшою мірою впливаючи на *S. pyogenes*. Блокатори ЦОГ-3 парацетамол і метамізол, на відміну від інших препаратів, що вивчалися нами, сильніше проявляли антисиньогнійну (обидва – помірну) та антистафілококову дію (метамізол).

**Висновки.** НПЗП з антимікробною активністю потенційно можуть підвищувати активність протиінфекційної терапії. Водночас антимікробна активність НПЗП теоретично може сприяти розвитку резистентності мікроорганізмів унаслідок наявності останніх у середовищі з підпороговими концентраціями засобів із протимікробною активністю. З урахуванням цього велике практичне значення має здійснення дальших клініко-фармакологічних досліджень проблеми.

**Ключові слова:**  
НПЗП,  
коморбідність,  
анальгетики.

**Патологія.** – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 219–223

### НПВС: может ли наличие инфекционного агента влиять на выбор обезболивающего препарата?

E. A. Подплетня, E. B. Хомяк, И. П. Кошова

**Цель работы** – в связи со значительной распространенностью коморбидной патологии велика вероятность применения НПВС у больных, имеющих сопутствующий инфекционный процесс. С учетом этого проведено скрининговое исследование

**Ключевые слова:**  
НПВС,  
коморбидность,  
анальгетики.

**Патология.** – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 219–223

вание антимикробных свойств основных групп этих препаратов с целью отбора наиболее перспективных из них для дальнейшего углубленного изучения.

**Материалы и методы.** Исследование чувствительности МО проводилось с использованием стандартных методов исследования – метода «колодцев» и метода определения антибактериальных свойств препаратов с помощью таблеток, основанного на способности лекарственного вещества диффундировать в агар, на который проводится высев тест-культуры. В качестве тест-культур использовали *S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, выделенные от больных, находившихся на лечении в стационаре. Протестированы преимущественный блокатор ЦОГ-1 (ацетилсалициловая кислота, АСК), неселективные блокаторы ЦОГ-1 и ЦОГ-2 (кеторолак, диклофенак натрия, ибупрофен, мефенаминовая кислота, декскетопрофен), преимущественные блокаторы ЦОГ-2 (мелоксикам и нимесулид), селективные блокаторы ЦОГ-2 (целекоксиб), селективные блокаторы ЦОГ-3 (ЦОГ-1 в мозге) парацетамол и метамизол.

**Результаты.** В ходе исследований установлено, что большинство тестируемых НПВС обладает антимикробной активностью. Препаратами-лидерами по выраженности противомикробных эффектов являются препараты, обладающие достаточной ЦОГ-1 (3)-активностью: АСК, диклофенак, декскетопрофен, метамизол, в меньшей степени – парацетамол. Наибольшую активность тестируемые НПВС проявляли в отношении грамположительной кокковой флоры, в большей степени – влияя на *S. pyogenes*. Блокаторы ЦОГ-3 парацетамол и метамизол, в отличие от других препаратов, изучаемых нами, сильнее проявляли антисинегноиную (оба – умеренную) и антистафилококковую активность (метамизол).

**Выводы.** НПВС с антимикробной активностью потенциально могут повышать активность противoinфекционной терапии. В то же время антимикробная активность НПВС теоретически может способствовать развитию резистентности микроорганизмов вследствие существования последних в среде с подпороговыми концентрациями средств с противомикробной активностью. С учетом этого большое практическое значение имеет проведение дальнейших клинико-фармакологических исследований проблемы.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are known to be a large group of drugs widely used in clinical practice, daily, for more than thirty million people worldwide. Taking into account the high prevalence of comorbid pathology under the clinic condition, especially for the elderly, there is a high probability of their taking by patients with concomitant infectious process, taking anti-infectious drugs. Several possible interactions of NSAIDs with anti-infectious agents shall be considered at complex pathology of this kind: 1) the probability of change of therapeutic effect (increase or decrease) due to the direct effects of NSAIDs on the pathogenic flora; 2) the probability of effect of NSAIDs – increase or decrease of the effectiveness of anti-infectious drugs due to changes in the pharmacokinetic characteristics of the last; 3) the probability of the impact of NSAIDs on the development mechanisms of pathogens resistance; 4) the probability of mutual reinforcement of side effects of drugs when used in combinations.

The reference sources contain a number of conflicting data about the direct or indirect effect of NSAIDs upon infectious diseases. On the one hand, acceleration of progression of soft tissue infections of streptococcal etiology (group A) at the application of certain non-selective (ketorolac, ibuprofen and indomethacin), but not COX-2 selective NSAIDs and reduction of efficiency of etiotropic antibiotic therapy were found [1]. On the other hand, *in vitro*, sodium diclofenac was detected to show antibacterial activity against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant strains of microorganisms, including mycobacteria, associated by the authors with the violation of the DNA synthesis of sensitive flora [2], in addition, antimycobacterial properties of diclofenac have been confirmed in an experiment *in vivo* [3]. It is also known, that NSAIDs have direct membranotropic effects, due to which, it seems to us, they can have their own antimicrobial activity, by analogy with membranotropic antibiotics, and also modulate the action of antimicrobial agents (stimulate or weaken) [4]. Currently the systematized data about NSAIDs effect on various clinically relevant microorganisms are not available.

**This thesis was aimed** to conduct screening of antimicrobial properties of the major NSAIDs groups and selection of the most promising ones for further studies.

## Materials and methods

Particular features of pharmacodynamics of drugs (selectivity with respect to different types of COX), as well as the clinical significance and frequency of drug usage according to main indications were taken into consideration at selecting NSAIDs for screening of antimicrobial properties. List of NSAIDs and nonnarcotic analgesic drugs (NAD) is provided in *Table 1*.

5 major clinical strains of microorganisms (MO) were used as testing cultures, i. e., *S. aureus*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, isolated from patients treated in hospital. Selection of MO types was determined by the clinical relevance of the latter.

MO sensitivity study was conducted using the method of «wells» (agar diffusion method) and the method of determining the antibacterial properties of chemotherapeutic agents using the tablets, according to guidelines [5]. The method is based on the ability of the drug to diffuse into the agar, onto which the testing culture is plated.

Sterile Petri dishes were put on a strictly horizontal surface, to pour 20 ml of 2 % meat infusion agar (pH = 7.2–7.4) in order to create an optimal thickness of a layer, equal to 4–5 mm. 5 % blood or serum agar was applied for microbial species that do not grow using meat infusion agar (*Streptococcus*). Dishes with a medium were dried in a thermostat before inoculation.

A thick layer of agar was inoculated with 0.1 ml suspension of the tested MO and triturated with a spatula until uniform distribution of MO over the surface of the Petri dish. Then drill (d = 6 mm) was used to drill holes («wells») at equal distances from each other, to further fill them with the tested objects. Then the plates were placed to thermostat at 37 °C horizontally, to form circular zones. Diameters of inhibition zones were measured in 24 hours.

When determining the properties of antibacterial chemotherapeutics with the tablets, the latter were applied to the agar surface with the test bacteria. After incubation on the place of tablets application, the sterile zones were taken into account; criterion for evaluation was the delay zone of microflora growth: at level up to 10 mm or absence thereof the microorganisms are not sensitive to the drug; 11–15 mm zone shows low sensitivity and more than 15 mm zone refers to sensitive strains. Thus inhibition zones of MO from 5 to 10 mm indicated bacteriostatic effect; inhibition zones exceeding 10 mm indicated bactericidal action.

Statistical processing of the results was carried out with the use of the package of licensed applications Statistica (6.1, AGAR909E415822FA serial number). Type of parameters distribution was analyzed by Shapiro-Wilk test. Significant differences between the indices, taking into account the type of distribution were determined by Student's t-test. The threshold level of statistical significance of the results was  $p < 0.05$ . Results are presented as  $M \pm SD$ .

The results of the study of NSAIDs and NNA antimicrobial properties are presented in Table 2.

Some NSAIDs were detected to have a significant antimicrobial activity. The most pronounced antimicrobial effects are manifested by ASA, diclofenac, dexketoprofen, paracetamol and metamizole (3–4 sensitive pathogens). To a lesser extent, ketorolac, ibuprofen and COX-2 selective NSAIDs (nimesulide, meloxicam and celecoxib) have effect on 1–2 pathogens. There was no antimicrobial activity detected in mefenamic acid.

When comparing the effects of NSAIDs and NAD on individual pathogens, attention is drawn to the high sensitivity of the non-antimicrobial drugs of the beta-hemolytic streptococcus *S. pyogenes*. It reacted substantially to all the NSAIDs except mefenamic acid and paracetamol, and to a greater extent – to ibuprofen and ASA (zone of growth absence is  $16.0 \pm 1.6$  mm); with other drugs the MO inhibition zones were about 12–14 mm (Fig. 1).

Another representative of Streptococcus, alpha-hemolytic streptococcus *S. mutans*, showed greater selectivity as for sensitivity to NSAIDs: the highest efficiency was shown by dexketoprofen (zone of growth absence is  $20.0 \pm 1.7$ ), other drugs were significantly less effective: ASA, diclofenac, metamizole had inhibition zone of MO within 11–12 mm, inhibition zone of paracetamol was at the efficiency limit, i. e., 10 mm.

The sensitivity of *S. aureus* was the highest to diclofenac and metamizole (inhibition zone is 29–31 mm), much lower to ASA (15 mm) and at a low level – to ibuprofen and dexketoprofen (11–12 mm). Inhibition zone of this pathogen in paracetamol was at the efficiency limit, i.e., 10 mm (Fig. 2).

Gram-negative flora was significantly less sensitive to studied NSAIDs and NAD. *E. coli* showed complete resistance to drugs of NSAIDs and NAD, *P. aeruginosa* showed moderate sensitivity to paracetamol (zone  $13.0 \pm 1.2$ ) and weak sensitivity to ASA ( $11.0 \pm 1.2$ ) (Fig. 3).

The study of antimicrobial effect of NSAIDs on the strains of testing cultures, at cultivation using blood agar, detected hemolytic effect of varying intensity of some NSAIDs (ASA, ibuprofen, nimesulide, diclofenac, paracetamol) (Fig. 4), which may indicate the effect of NSAIDs on erythrocyte membranes.

**Table 1.** List of NSAIDs and NNAs used in the research

Group	International name	Trade name
Predominant COX-1 blockers	Acetylsalicylic acid (ASA)	Aspirine
Nonselective COX-1 and COX-2 blockers	Ketorolac	Ketorol Ketanov
	Ibuprofen	Nurofen
	Diclofenac sodium	Voltaren Dicloberl
	Dexketoprofen	Dexalgin
	Mefenamic acid	Mefenamic acid
Predominant COX-2 blockers	Nimesulid	Nimesil
Selective COX-2 blockers	Meloxicam	Movalis
	Celecoxibe	Celebrex
Selective COX-3 blockers (COX-1 in the brain)	Paracetamol	Panadol Efferalgan
	Metamizole	Analgin

**Table 2.** Indicators of MO growth delay at testing NSAIDs and NNA

Growth delay zones of test-strains, mm ( $M \pm SD$ , n = 6)						
№	Drug name	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	ASA	$15,0 \pm 1,2$	$12,0 \pm 1,4$	$16,0 \pm 1,6$	$8,0 \pm 0,7$	$11,0 \pm 1,2$
2	Ketorolac	0	$6,5 \pm 0,6$	$13,5 \pm 1,2$	0	0
3	Ibuprofen	$11,0 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,1$	$16,0 \pm 1,7$	0	0
4	Diclofenac sodium	$29,0 \pm 1,7$	$11,0 \pm 1,0$	$12,0 \pm 1,0$	$4,0 \pm 0,6$	0
5	Dexketoprofen	$12,0 \pm 0,9$	$20,0 \pm 1,7$	$13,0 \pm 1,0$	0	0
6	Mefenamic acid	0	0	0	0	0
7	Nimesulid	0	0	$13,0 \pm 1,1$	0	0
8	Meloxicam	$4,0 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,9$	$13,0 \pm 1,1$	0	0
9	Celecoxibe	$6,0 \pm 0,4$	0	$12,0 \pm 1,1$	0	0
10	Paracetamol	$10,0 \pm 1,1$	$10,0 \pm 1,2$	$8,0 \pm 0,9$	$3,0 \pm 0,4$	$13,0 \pm 1,2$
11	Metamizole	$31,0 \pm 1,9$	$11,0 \pm 1,2$	$14,0 \pm 1,2$	0	0

To certain extent our findings explain the data of available reference sources related to this subject, or correlate with it. Thus, interesting clinical data concerning the positive effects of preferential blocker of COX-1 acetylsalicylic acid (ASA) are given in the study of Low-Dose Acetylsalicylic Acid Treatment and Impact on Short-Term Mortality in Staphylococcus aureus Bloodstream Infection, carried out by M. Osthoff, J. A. Sidler, B. Lakatos in 2016 [6], showing that patients with staphylococcosis (excluding sepsis caused by *E. coli*) had lower mortality risks at receipt of ASA low-dose ( $12.1\%$  vs  $27.4\%$ ,  $p < 0.001$ ). There was also the decrease detected in cytotoxicity of *S. aureus* ratio concerning bone tissue and reduction of the risk of osteomyelitis at testing of salicylic acid derivative, i. e., diflunisal; it is associated with decreased synthesis of virulence factors of staphylococci due to effect on their accessory gene regulator (*agr*) [7].

Data in reference sources are insufficient for ibuprofen and ketorolac: controlled studies [1] detected acceleration of the progression of the soft tissue infections of streptococcal etiology (group A) at their application, as well as reduction of the effectiveness of etiotropic antibiotic therapy. Within our study ketorolac and ibuprofen showed no antimicrobial activity against *S. mutans* (the latter, according to our data, in general, was less sensitive to the inhibitory effects of NSAIDs), but were effective (more pronounced for ibuprofen) against *S. pyogenes*,

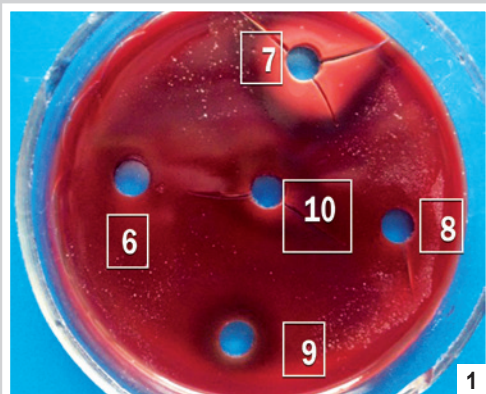


Fig. 1. Effect of NSAIDs on *S. pyogenes*.

Fig. 2. Effect of NSAIDs on *S. aureus*.

- 1: ASA;
- 2: Ibuprofen;
- 3: Celecoxibe;
- 4: Nimesulid;
- 5: Paracetamol;
- 6: Ketorolac;
- 7: Diclofenac sodium;
- 8: Meloxicam;
- 9: Dexketoprofen;
- 10: Metamizole.

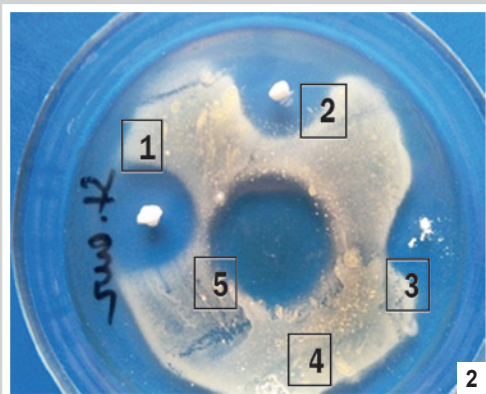
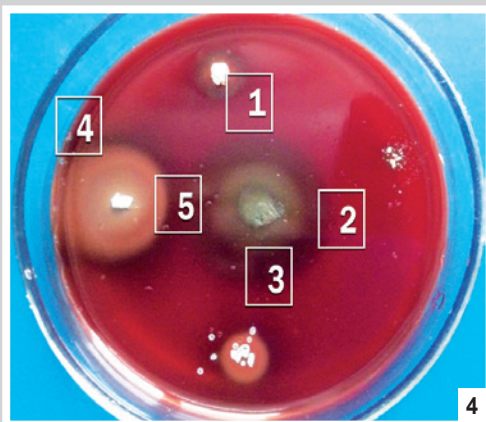
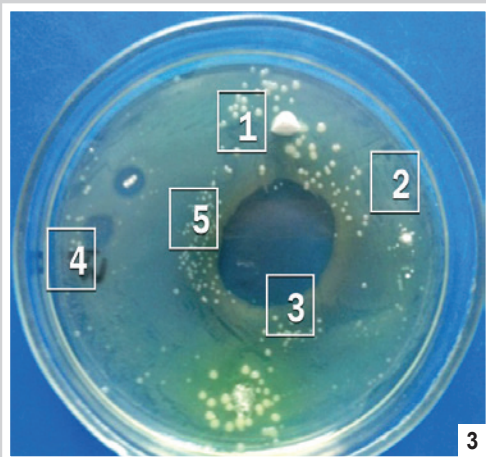


Fig. 3. Effect of NSAIDs on *P. aeruginosa*.

Fig. 4. Hemolytic effect of NSAIDs.

- 1: ASA;
- 2: Ibuprofen;
- 3: Celecoxibe;
- 4: Nimesulid;
- 5: Paracetamol.



which is known to have a high sensitivity to antimicrobial agents of different groups and slowly develop resistance to them.

According to the reference sources sodium diclofenac showed antibacterial activity against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant strains of listeria and mycobacteria, explained with impaired DNA synthesis of sensitive flora [2]. Use of 30–50 mg/20 g diclofenac for mice reliably protected them from infection caused by gram-negative *Salmonella typhimurium* [8]; under conditions of our experiment it had practically no effect on gram-negative flora.

We found no data about the presence of the antimicrobial effect of ketoprofen and its dextrarotary isomer dexketoprofen on gram-positive cocci (as shown in our experiments), though there is available information about the use of ketoprofen in addition to enrofloxacin for intratracheal infection of pigs with gram-negative *Haemophilus parasuis*, while NSAIDs significantly improved vital signs of animals compared to the group receiving fluoroquinolone only [9].

No data about the direct impact of selective COX-2 blockers on gram-positive pathogenic flora are found, but there is an evidence of potentiating effect of celecoxib on sensitivity of *S. aureus* to antibiotics through increasing of SIRT1 protein regulatory level in macrophages [10] and through inhibiting efflux of antibiotics from a microbial cell [11].

In contrast to other studied drugs, COX-3 blockers, i. e., paracetamol and metamizole, showed stronger pseudomonas (both-moderate) and antistaphylococcal effect (metamizole).

The more pronounced overall antimicrobial activity of nonselective anti-COX drugs is probably due to the fact that one of the NSAIDs effect mechanisms on the development of MO resistance may be an impact on the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2), as PGE2 is shown to be the stimulation factor of staphylococci resistance development [12].

Treatment of comorbidity shall also consider that NSAIDs may mask symptoms of infection process, lowering body temperature, which can lead to an incorrect evaluation of the efficacy of anti-infectious effect at their combined use.

### Conclusions

1. The studies revealed the majority of the tested NSAIDs to have an antimicrobial activity.
2. Leader-drugs of antimicrobial effects are preparations with sufficient COX-1(3)-activity: ASA, diclofenac, dexketoprofen, metamizole, and paracetamol to a lesser extent.
3. Tested NSAIDs had the greatest activity against gram-positive cocci flora, mostly affecting *S. Pyogenes*.
4. Significance of antimicrobial activity of NSAIDs may be evaluated as a factor potentially enhancing the activity of anti-infectious therapy.
5. Antimicrobial activity of NSAIDs can theoretically contribute to the development of MO resistance due to the existence of the latter in a medium with sub-threshold concentrations of agents with antimicrobial

activity. From this perspective, further clinical and pharmacological studies of the problem are of great practical importance.

## References

- [1] Bryant, A. E., Bayer, C. R., Aldape, M. J., & Stevens, D. L. (2015). The roles of injury and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the development and outcomes of severe group A streptococcal soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis*, 28(3), 231–239. doi: 10.1097/QCO.0000000000000160.
- [2] Mazumdar, K., Mazumdar Dastidar, S. G., Park, J. H., & Dutta, N. K. (2009). The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: an antibacterial drug target. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28(8), 881–891. doi: 10.1007/s10096-009-0739-z.
- [3] Dutta, N. K., Mazumdar, K., Dastidar, S. G., & Park, J. H. (2007). Activity of diclofenac used alone and in combination with streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Int J Antimicrob Agents*, 30(4), 336–340. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.04.016.
- [4] Habrieva, R. U. (2005). *Rukovodstvo po e'ksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (pre-clinical) study of the new pharmacological substances]*. Moscow. [in Russian].
- [5] Nunes, C., Brezesinski, G., Pereira-Leite, C., Lima, J. L., Reis, S., & Lúcio, M. (2011). NSAIDs interactions with membranes: a biophysical approach. *American Chemical Society*, 27(17), 10847–10858. doi: 10.1021/la201600y.
- [6] Osthoff, M., Sidler, J. A., Lakatos, B., Frei, R., Dangel, M., Weisser, M., et al. (2016). Low-Dose Acetylsalicylic Acid Treatment and Impact on Short-Term Mortality in *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection: A Propensity Score-Matched Cohort Study. *Crit Care Med*, 44(4), 773–781. doi: 10.1097/CCM.0000000000001554.
- [7] Hendrix, A. S., Spoonmore, T. J., Wilde, A. D., Putnama, N. E., Hammerc, N. D., Snyder, D. J., et al. (2016). Repurposing the Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Diflunisal as an Osteoprotective, Antivirulence Therapy for *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 22, 60(9), 5322–5330. doi: 10.1128/AAC.00834-16.
- [8] Dastidar, S. G., Ganguly, K., Chaudhuri, K., & Chakrabarty, A. N. (2000). The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. *Int J Antimicrob Agents*, 14(3), 249–251. doi: https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00159-4.
- [9] Viehmann, M., Postias, S., Balka, G., Sperser, J., Palzer, A., Henning-Pauka, I., et al. (2013). Evaluation of the efficacy of a combination therapy of an antibiotic and a NSAID following an experimental *Haemophilus parasuis* infection in nursery piglet. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 41(4), 225–232.
- [10] Annamandi, M., & Kalle, A. M. (2014). Celecoxib sensitizes *Staphylococcus aureus* to antibiotics in macrophages by modulating SIRT1. *PLoS One*, 9(6), e99285. doi: 10.1371/journal.pone.0099285.
- [11] Arunasree, M. K., & Arshad, Rizvi. (2011). Inhibition of Bacterial Multidrug Resistance by Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(1), 439–442. doi: 10.1128/AAC.00735-10.
- [12] Krause, J., Geginat, G., & Tammer, I. (2015). Prostaglandin E2 from *Candida albicans* Stimulates the Growth of *Staphylococcus aureus* in Mixed Biofilms. *PLoS One*, 10(8), e0135404. doi: 10.1371/journal.pone.0135404.

## Information about authors:

Podpletnya O. A., DSc, Professor, Head of the Department of General and Clinical Pharmacy, SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine", Dnipro.  
 Khomiak O. V., MD, PhD, Lecturer of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine", Dnipro.  
 Koshova I. P., MD, PhD, Associate Professor of the Department of General and Clinical Pharmacy, SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine", Dnipro.

## Відомості про авторів:

Подплетня О. А., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. загальної та клінічної фармації, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.  
 Хомяк О. В., канд. мед. наук, викладач каф. фармакології та клінічної фармакології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

Кошова І. П., канд. мед. наук, доцент каф. загальної та клінічної фармації, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

## Сведения об авторах:

Подплетня Е. А., д-р фарм. наук, профессор, зав. каф. общей и клинической фармации, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.  
 Хомяк Е. В., канд. мед. наук, преподаватель каф. фармакологии и клинической фармакологии, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.  
 Кошева И. П., канд. мед. наук, доцент каф. общей и клинической фармации, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

## Конфлікт інтересів: відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 29.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 07.06.2017

Прийнято до друку / Accepted: 12.06.2017

## Особливості стану цитокинового статусу в інфертильних чоловіків на тлі токсокарозної інвазії

Л. Л. Воронцова, М. І. Дуб, В. А. Коваленко, М. Є Журавльова

ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України»

### Ключові слова:

цитокіни,  
токсокарозна  
інвазія,  
фрагментація ДНК  
сперматозоїдів,  
чоловіче безпліддя.

Патологія. – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 224–229

### DOI:

10.14739/2310-1237.  
2017.2.109672

### E-mail:

zmapo32@gmail.com

**Мета роботи** – враховуючи, що механізми взаємодії між організмом господаря та паразитом до кінця остаточно не з'ясовані, тим більше поглиблені механізми впливу на репродуктивну систему чоловіка, метою дослідження стало вивчення стану цитокинового статусу в чоловіків із порушенням репродуктивної функції на тлі токсокарозної інвазії.

**Матеріали та методи.** Обстежили 77 чоловіків у віці від 20 до 45 років, котрих поділили на 5 груп. Контрольну групу становили 12 фертильних чоловіків. До групи порівняння увійшли 27 інфертильних пацієнтів із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і з відсутністю антитіл до токсокар; до третьої групи – 12 інфертильних чоловіків із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар; до четвертої – 14 інфертильних пацієнтів із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і відсутністю антитіл до токсокар; до п'ятої – 12 інфертильних чоловіків із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар. Усім чоловікам здійснили комплексне дослідження, що включало аналіз спермограми за рекомендаціями ВООЗ, визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозної інвазії та оцінювання цитокинового статусу.

**Результати.** Дані дослідження свідчать про певний взаємозв'язок між основними параметрами сперматозоїдів (їхньою концентрацією, рухомістю та морфологією) та частотою фрагментації їхньої ядерної ДНК. Чим важче патозооспермія, тим більша ймовірність того, що частота фрагментації ДНК у сперматозоїдах буде вищою від норми. Результати дослідження цитокинового статусу свідчать: вплив тільки антитіл без підключення Т-клітинної відповіді явно є недостатнім для повного подолання паразитарної інвазії.

**Висновки.** В інфертильних чоловіків на тлі токсокарозної інвазії пусковим механізмом стимуляції імунної відповіді Th2 типу, вочевидь, є компоненти оболонки інвазованих личинок паразита, а приєднання імунної відповіді Th1 типу призводить до формування хронічного процесу (хронічного протікання інвазії), що негативно впливає на розвиток адекватної імунної відповіді.

### Ключевые слова:

цитокіни,  
токсокарозна  
інвазія,  
фрагментація ДНК  
сперматозоїдів,  
мужское  
бесплодие.

Патологія. – 2017. –  
Т. 14, № 2(40). –  
С. 224–229

## Особенности состояния цитокинового статуса у инфертильных мужчин на фоне токсокарозной инвазии

Л. Л. Воронцова, М. И. Дуб, В. А. Коваленко, М. Е. Журавлёва

**Цель работы** – учитывая, что механизмы взаимодействия между организмом хозяина и паразитом до конца окончательно не выяснены, тем более углублённые механизмы влияния на репродуктивную систему мужчины, целью исследования стало изучение состояния цитокинового статуса у мужчин с нарушением репродуктивной функции на фоне токсокарозной инвазии.

**Материалы и методы.** Обследовано 77 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет, которые были разделены на 5 групп. Контрольную группу составили 12 фертильных мужчин. В группу сравнения вошли 27 инфертильных пациентов с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и с отсутствием антител к токсокарам; в третью группу – 12 инфертильных мужчин с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам; в четвёртую – 14 инфертильных пациентов с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и отсутствием антител к токсокарам; в пятую – 12 инфертильных мужчин с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам. Всем мужчинам было проведено комплексное исследование, включавшее анализ спермограммы по рекомендациям ВОЗ, определение уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, наличия токсокарозной инвазии и оценка цитокинового статуса.

**Результаты.** Данные исследования свидетельствуют об определённой взаимосвязи между основными параметрами сперматозоидов (их концентрацией, подвижностью и морфологией) и частотой фрагментации их ядерной ДНК. Чем тяжелее патозооспермия, тем больше вероятность того, что частота фрагментации ДНК в сперматозоидах будет выше нормы. Результаты исследования цитокинового статуса свидетельствуют, что влияние только антител без подключения Т-клеточного ответа, очевидно, является недостаточным для полного преодоления паразитарной инвазии.

**Выводы.** У инфертильных мужчин на фоне токсокарозной инвазии пусковым механизмом стимуляции иммунного ответа Th2 типа, очевидно, являются компоненты оболочки инвазированных личинок паразита, а присоединение иммунного ответа Th1 типа ведёт к формированию хронического процесса (хронического протекания инвазии), что негативно влияет на развитие адекватного иммунного ответа.

### Key words:

cytokines,  
toxocarasis,  
fragmentation DNA,  
male infertility,  
spermatozoa.

## Features of the state of cytokine status in infertile men against the background of toxocarasis

L. L. Vorontsova, M. I. Dub, V. A. Kovalenko, M. Ye. Zhuravlova

**Aim.** Given that the mechanisms of interaction between the host organism and the parasite have not been completely clarified, especially profound mechanisms of influence on the reproductive system of men, the aim of the research was to study the state of cytokine status in men with reproductive disorders against the background of toxocarasis.



**Materials and methods.** For this purpose, 77 men aged 20 to 45 years, who were divided into 5 groups, were examined. The first (control) group consisted of 12 fertile men; the second group (comparison group) – 27 infertile patients with the normal level of fragmentation of sperm DNA and the lack of antibodies to toxocarae; the third group includes 12 infertile men with a high level of fragmentation of sperm DNA and the presence of antibodies to toxocarae; the fourth group included 14 infertile patients with a high level of fragmentation of sperm DNA and the lack of antibodies to toxocarae, and the fifth group included 12 infertile men with a normal level of fragmentation of sperm DNA and the presence of antibodies to toxocarae. All the men underwent a comprehensive study that included analysis of the spermogram according to WHO recommendations, determination of the level of fragmentation of sperm DNA, the presence of toxocarasis and evaluation of the cytokine status.

**Results.** The data obtained from the study indicate a definite relationship between the main parameters of spermatozoa (their concentration, mobility and morphology) and the frequency of fragmentation of their nuclear DNA. The heavier the pathozoospermia, the more likely that the frequency of DNA fragmentation in spermatozoa will be higher than normal. The results of the study of the cytokine status indicate that the effect of only the antibodies without the connection of the T-cell response is obviously insufficient to completely overcome parasitic infestation.

**Conclusions.** Thus, in infertile men against the background of toxocarasis, the triggering mechanism of stimulation of the Th2 type immune response are obviously the components of the shell of the parasite larvae which were invaded in host organism, and the attachment of the Th1 type immune response leads to the formation of the chronic process (chronic invasion), which adversely affects the development of an adequate immune response.

В останні роки відзначається зниження активності сперматогенезу в чоловіків у різних країнах [1]. Приблизно у 25 % із них причину інфертильності не виявляють [2]. Під час спроби пояснити можливі причини таких стрімких темпів порушення чоловічого репродуктивного потенціалу більшість авторів звертають увагу на факти змін у способі життя людини, особливо місця його існування, а також на ендокринні, імунні, генетичні порушення [3–5]. На жаль, проблема паразитарної інвазії перебуває поза увагою багатьох практичних лікарів, науковців, фахівців ветеринарної медицини. Серо-епідеміологічні та клініко-морфологічні обстеження населення України саме на токсокароз виконуються поки недостатньо [6,7].

Сьогодні паразитози розглядають як захворювання, в основі патогенезу яких – складний комплекс взаємозв'язку й взаємозалежності патологічних процесів, що є наслідком не тільки шкідливої дії самих гельмінтів на організм господаря, але і його відповідної реакції, котра має пристосувальний і пошкоджувальний фактор [8].

Гельмінтози можуть викликати різні порушення імунного статусу господаря. Провідним типом регуляції в імунній відповіді є цитокиновий, який впливає на всі види імунокомпетентних клітин, у тому числі на Т- і В-лімфоцити (ключові в набутій імунній відповіді). Механізми взаємодії між організмом господаря та паразитом до кінця остаточно не з'ясовані, тим більше поглиблені механізми впливу на репродуктивну систему чоловіка [9].

Отже, для розроблення нових підходів до діагностики порушень репродуктивного здоров'я чоловіків, що протікають на тлі токсокарозої інвазії, необхідно враховувати стан цитокинового статусу з урахуванням регуляторного впливу Т-хелперів (Th) 1 та 2 типів, котрі відіграють важливу роль у розвитку імунних реакцій, та особливостях імунної відповіді таким чином.

## Meta роботи

Вивчення стану цитокинового статусу в чоловіків із порушенням репродуктивної функції на тлі токсокарозої інвазії.

## Матеріали і методи дослідження

Обстежили 77 чоловіків у віці 20–45 років, які дали інформовану письмову згоду на участь у дослідженні, що схвалене комітетом із біоетики ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України», та відповідно до етичних і морально-правових вимог наказу Міністерства охорони здоров'я України № 281 від 01.11.2000 р. Пацієнтів поділили на 5 груп. Першу (контрольну) групу становили 12 фертильних практично здорових чоловіків, яких обстежували як донорів банку сперми (згідно з наказом № 787 від 09.09.2013 р.). До другої групи (порівняння) увійшли 27 інфертильних пацієнтів із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і з відсутністю антитіл до токсокар. Третю групу становили 12 інфертильних чоловіків із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар. До четвертої групи увійшли 14 інфертильних пацієнтів із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і відсутністю антитіл до токсокар. П'яту групу становили 12 інфертильних чоловіків із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар. У всіх чоловіків третьої, четвертої та п'ятої груп під час бактеріологічного дослідження еякуляту виявлено бактеріоспермію, що зумовлена грамположитивною та грамнегативною флорою.

Усім чоловікам здійснили комплексне дослідження, котре включало аналіз спермограми за рекомендаціями ВООЗ [10], визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозої інвазії, а також виконане оцінювання цитокинового статусу шляхом визначення в сироватці крові вмісту ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІФ-γ та ФНП-α.

Визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів здійснили за допомогою методу Sperm Chromatin Dispersion test (патент РФ № 2373288). За нормальні значення вважали рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів до 30 %, високі – понад 30 % із підрахованих 500 сперматозоїдів.

Наявність токсокарозої інвазії визначали за допомогою виявлення в сироватці крові кількості антитіл ІgG до антигенів токсокар імуноферментним методом (з використанням набору реактивів «Вітротест», Укра-

іна), результат вважали позитивним при значеннях >1,1 МОд/мл.

Вміст цитокінів визначали імуноферментним методом із використанням відповідних моноклональних антитіл, іммобілізованих на поверхні лунок полістеролового планшета з наборів тест-систем «ВЕКТОР-БЕСТ» (Російська Федерація). Концентрацію (в пг/мл) рецепторних антагоністів досліджуваних цитокінів визначали за калібрувальним графіком, що укладений згідно з інструкцією до наборів.

Статистичне опрацювання цифрових результатів виконали за допомогою програми Statistica (StatSoft Statistica v.6.0.; номер ліцензії програми STA 862D175437Q) з використанням тесту Вальда–Вольфовиця (Wald–Wolfowitz runs test) під час порівняння двох незалежних груп. Різниця вважалася вірогідною при досягнутому рівні значущості  $p < 0,05$ . Дані, що аналізувалися, представлені як медіана (Me) та міжквартильний розмах (RQ), який являє собою різницю між значеннями 75 і 25 процентилів ( $RQ = 75\% UQ - 25\% LQ$ ), де UQ – верхній квартиль; LQ – нижній квартиль.

## Результати та їх обговорення

Під час аналізу спермограм чоловіків контрольної групи встановили: відхилень від показників норм, що рекомендовані ВООЗ, не виявили (табл. 1).

Досліджуючи основні показники спермограм у чоловіків 2 групи, відзначали зниження кількості активно рухомих форм на 37 % і збільшення на 110 % нерухомих сперматозоїдів щодо аналогічних показників контрольної групи. Також відзначалось незначне зниження концентрації сперматозоїдів в 1 мл на 14 %, загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті практично відповідала значенням контрольної групи, водночас виявлено зростання кількості патологічних форм сперматозоїдів на 96 % на тлі зниження нормальних форм на 30 % і появи сперматозоїдів зі змішаною патологією та зростання кількості незрілих сперматозоїдів відпо-

відно до аналогічних значень контрольної групи. Але зауважимо, що в чоловіків 2 групи хоч і були виявлені зміни показників щодо контролю, однак майже всі вони відповідали нормам, що рекомендовані ВООЗ. Водночас не можна залишати поза увагою, що чоловіки цієї групи, незважаючи на відносну нормоспермію, не мають дітей. Усе це зумовлює необхідність пошуку інших факторів, що спричиняють порушення репродуктивного потенціалу на тлі нібито нормальних показників спермограми.

У чоловіків 3 та 4 груп відзначались односпрямовані зміни показників спермограми: зниження кількості активно рухомих сперматозоїдів на 42 та 9 % і на 68 і 50 % на тлі збільшення нерухомих форм сперматозоїдів на 160 і 24 % і на 215 і 50 % щодо контролю та 2 групи відповідно. В обох групах з'явилися дискінетичні форми сперматозоїдів.

У чоловіків 3 та 4 груп концентрація сперматозоїдів в 1 мл знижувалась на 55 і 47 % і на 45 і 35 %, а загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті – на 57 і 40 % і на 52 та 49 % щодо значень контрольної та 2 групи відповідно. При мікроскопічному дослідженні пофарбованих препаратів у чоловіків 3 та 4 груп виявлено зниження кількості нормальних форм сперматозоїдів на 38 та 11 % і на 53 та 32 % на тлі збільшення патологічних форм на 121 і 13 % і на 166 і 36 % щодо показників контрольної та 2 групи відповідно. В обох групах зросла кількість як сперматозоїдів зі змішаною патологією, так і незрілих сперматозоїдів щодо значень контрольної та 2 групи.

Отже, аналізуючи показники спермограми чоловіків 3 та 4 груп, відзначили астено- та олігозооспермію, незначний дискінезис, виражену тератозооспермію, що сприяє чималому зниженню фертильності еякуляту чоловіків цих груп.

У чоловіків 5 групи фіксували зниження кількості активно рухомих сперматозоїдів на 38 % і збільшення нерухомих форм на 90 % щодо контролю; стосовно 2 групи відзначені показники залишалися практично без

**Таблиця 1.** Основні показники спермограми в чоловіків залежно від рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозоїної інвазії, Me (75 % Q – 25 % Q = RQ)

Показник, одиниця вимірювання	1 група (n = 12)	2 група (n = 27)	3 група (n = 12)	4 група (n = 14)	5 група (n = 12)
Активно рухомі сперматозоїди, %	38,0 (48,0 – 32,0 = 16,0)	24,0* (27,0 – 21,0 = 6,0)	22,0* (25,0 – 17,0 = 8,0)	12,0** (19,0 – 9,0 = 10,0)	23,5** (36,0 – 10,5 = 25,5)
Малорухомі сперматозоїди, %	52,0 (55,0 – 50,0 = 5,0)	52,5 (56,0 – 47,5 = 8,5)	54,0 (56,0 – 47,0 = 9,0)	51,5 (54,5 – 48,0 = 6,5)	48,0** (56,0 – 21,5 = 34,5)
Дискінетичні форми, %	0,0 (0,0 – 0,0 = 0,0)	0,0 (2,0 – 0,0 = 2,0)	2,0* (6,0 – 1,0 = 5,0)	3,0* (7,5 – 1,0 = 6,5)	0,0 (1,5 – 0,0 = 1,5)
Нерухомі сперматозоїди, %	10,0 (12,0 – 9,0 = 3,0)	21,0* (26,0 – 16,0 = 10,0)	26,0 (30,0 – 15,0 = 15,0)	31,5* (34,5 – 25,5 = 9,0)	19,0** (60,0 – 14,5 = 45,5)
Кількість сперматозоїдів в 1 мл, ( $\times 10^6$ /мл)	92,0 (106,0 – 78,0 = 28,0)	78,7 (127,5 – 53,7 = 73,7)	41,5* (56,0 – 32,0 = 24,0)	50,8 (78,5 – 28,8 = 49,7)	74,7** (121,2 – 24,2 = 97,0)
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, ( $\times 10^8$ )	285,0 (390,0 – 240,0 = 150,0)	271,3 (380,0 – 131,4 = 248,6)	161,8 (306,0 – 125,5 = 180,5)	137,5* (187,2 – 41,7 = 145,4)	330,3** (549,4 – 111,5 = 437,9)
Нормальні форми сперматозоїдів, %	76,0 (78,0 – 72,0 = 6,0)	53,0* (62,0 – 49,0 = 13,0)	47,0* (58,0 – 41,0 = 17,0)	36,0* (54,0 – 24,5 = 29,5)	54,5** (62,0 – 26,0 = 36,0)
Патологічні форми сперматозоїдів, %	24,0 (26,0 – 20,0 = 6,0)	47,0* (51,0 – 38,0 = 13,0)	53,0* (59,0 – 42,0 = 17,0)	64,0* (75,5 – 46,0 = 29,5)	45,5** (74,0 – 38,0 = 36,0)
Змішана патологія, %	0,0 (0,0 – 0,0 = 0,0)	7,0* (11,5 – 5,5 = 6,0)	9,0* (18,0 – 6,0 = 12,0)	11,5* (30,5 – 7,5 = 23)	14,5** (58,5 – 7,5 = 51,0)
Юні клітини, %	2,0 (3,0 – 2,0 = 1,0)	3,0 (5,0 – 2,0 = 3,0)	3,0 (4,0 – 2,0 = 2,0)	4,5 (7,0 – 2,5 = 4,5)	5,0* (6,5 – 3,5 = 3,0)

\*: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо контрольної групи; \*\*: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо 2 групи.

змін. Концентрації сперматозоїдів в 1 мл знижувалась на 19 і 5 %, у той час як загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті збільшувалась на 16 і 22 % щодо значень контрольної та 2 групи відповідно. Виявлені зниження кількості нормальних форм сперматозоїдів на 38 % і збільшення патологічних форм на 90 % щодо показників контрольної групи. У чоловіків цієї групи була найбільша кількість сперматозоїдів зі змішаною патологією та незрілих сперматозоїдів відносно як контрольної, так і всіх дослідних груп.

Виявлені зміни показників спермограм у чоловіків 5 групи свідчать про наявність астені- та тератозооспермії на тлі відносної полізооспермії, що вказує на зниження фертильності еякуляту.

Враховуючи дані про те, що пошкодження хроматину у сперматозоїдах часто асоційовані зі зниженими показниками спермограми, а сперматозоїд, оцінений як «морфологічно нормальний» (при світловій мікроскопії), може мати пошкоджену ДНК і навпаки [11], представляло інтерес вивчення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів, які асоційовані з токсокарозою інвазією та без її наявності в дослідних групах чоловіків.

У результаті дослідження рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів встановили, що в чоловіків 2 групи хоч і відзначались зміни показників спермограми, але кількість фрагментованих сперматозоїдів становила в середньому 15 %. У чоловіків 3 групи рівень фрагментації ДНК перевищував норму (в середньому становив 40 %), на тлі збільшення антитіл IgG до антигенів токсокар (в середньому 2,5 МОД/мл), що свідчить про наявність токсокарозої інвазії. Дослідження рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів у чоловіків 4 групи виявило незначне зростання цього показника, який в середньому становив 33 %. У чоловіків 5 групи кількість фрагментованих сперматозоїдів не перевищувала нормальні значення та становила в середньому 16 %, у той час як рівень антитіл IgG до антигенів токсокар в середньому становив 1,8 МОД/мл, що свідчило про наявність токсокарозої інвазії.

Отже, дані, що отримали, підтверджують припущення про певний взаємозв'язок між основними параметрами сперматозоїдів (їхньою концентрацією, рухомістю та морфологією) та частотою фрагментації їхньої ядерної ДНК. Встановлено, що ступінь порушення сперматогенезу прямо корелює з частотою фрагментації ДНК у гаметах чоловіків. Чим важче

патозооспермія, тим більша ймовірність того, що частота фрагментації ДНК у сперматозоїдах буде вищою за норму.

Водночас не можна залишати поза увагою дані про те, що серед чоловіків із порушенням репродуктивної функції, у яких були виявлені зміни у провідних показниках спермограми (2 група), є такі, що не мають підвищеного рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах і без наявності антитіл до токсокар, що, своєю чергою, свідчить про наявність впливу інших факторів, котрі викликають зниження репродуктивного потенціалу чоловіків.

Досліджуючи цитокіновий статус у 2 групі (порівняння), виявили зниження показників ІЛ-2 та ІФ-γ на 72 та 71 %, збільшення показників ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 на 3, 18, 63 % щодо групи контролю відповідно, тоді як вміст ФНП-α залишався без змін і відповідав значенням контрольної групи (табл. 2).

У чоловіків 2 групи імунна відповідь Th2 типу (гуморального типу) свідчить і підтверджує встановлену нами наявність бактеріальної інфекції.

У 3 групі відзначали зниження вмісту ІЛ-2, ІЛ-10, ІФ-γ на 72, 61, 68 % щодо контрольної групи відповідно. Збільшення вмісту ІЛ-4, ІЛ-6 та ФНП-α на 53, 17, 40 % і 18, 503, 583 % щодо контрольної групи та групи порівняння відповідно. Вміст ІФ-γ та ІЛ-10 були збільшені на 11 і 17 % тільки щодо групи порівняння, тоді як ІЛ-2 залишався без змін.

Отже, у 3 групі спостерігалось порушення цитокінового балансу через одночасну ініціацію різноспрямованих цитокінових комплексів (Th1, Th2 типів).

У 4 групі спостерігалось зниження рівнів ІЛ-2, ІЛ-10, ІФ-γ та ФНП-α на 69, 55, 61 % і 34 % щодо значень контрольної групи, а ІЛ-6 на 9 % щодо групи порівняння. Відзначалось збільшення вмісту ІЛ-4, ІЛ-6 на 28 і 8 % відповідно до значень контрольної групи, тоді як вміст ІЛ-2, ІЛ-10, ІФ-γ та ФНП-α – на 11, 35, 36 % і 35 % щодо групи порівняння відповідно. ІЛ-4 залишався без змін.

У 4 групі спостерігалась імунна відповідь Th1 типу (клітинний), що свідчить про наявність бактеріальної інфекції. З наших попередніх досліджень відомо, що в цій групі спостерігається незавершений фагоцитоз, тому в цьому випадку превалює клітинна імунна реакція, котра регулюється Т-хелперами 1 типу.

У 5 групі спостерігалось збільшення ІЛ-4 на 17 і 46 %, ІЛ-6 – на 18 і 6 %, ІЛ-10 – на 17 і 105 %, ІФ-γ – 11

**Таблиця 2.** Стан цитокінового статусу в інфертильних чоловіків залежно від рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозої інвазії, Me (75 % Q – 25 % Q = RQ)

Показник, пг/мл	1 група (n = 12)	2 група (n = 27)	3 група (n = 12)	4 група (n = 14)	5 група (n = 12)
ІЛ-2	1,87 (2,28 – 1,5 = 1,13)	0,52* (0,66 – 0,29 = 0,37)	0,52* (0,99 – 0,29 = 0,7)	0,58* (0,76 – 0,29 = 0,47)	0,87*** (1,6 – 0,0 = 1,6)
ІЛ-4	0,53 (1,10 – 0,43 = 0,67)	0,69 (1,04 – 0,56 = 0,48)	0,81* (0,85 – 0,69 = 0,16)	0,68 (0,89 – 0,56 = 0,33)	1,01*** (1,0 – 0,0 = 1,0)
ІЛ-6	1,40 (1,70 – 0,79 = 0,91)	1,66 (2,68 – 1,24 = 1,44)	1,96 (44,06 – 1,09 = 42,97)	1,51 (3,9 – 1,17 = 2,73)	1,77 (1,8 – 1,55 = 0,25)
ІЛ-10	5,88 (8,60 – 4,53 = 4,07)	1,94* (2,87 – 0,64 = 2,23)	2,27 (3,31 – 1,94 = 1,37)	2,68 (2,96 – 1,94 = 1,02)	3,98 (20,1 – 0,09 = 20,01)
ІФ-γ	5,38 (6,17 – 3,20 = 2,97)	1,55* (2,26 – 1,01 = 1,25)	1,72 (2,11 – 1,25 = 0,86)	2,11 (3,12 – 1,01 = 2,11)	1,64 (2,7 – 0,00 = 2,7)
ФНП-α	1,34 (1,46 – 1,17 = 0,29)	1,38 (2,90 – 0,69 = 2,21)	8,08* (32,88 – 0,28 = 32,6)	0,67 (1,71 – 0,67 = 1,04)	0,93** (1,6 – 0,88 = 0,72)

\*: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо контрольної групи; \*\*: статистично значуща різниця ( $p < 0,05$ ) щодо 2 групи.

і 46 % стосовно як до контрольної групи, так і до групи порівняння відповідно. ФНП-а збільшувався на 503 % тільки щодо контрольної групи та був знижений на 31 % щодо групи порівняння. ІЛ-2 щодо контрольної групи знижувався на 54 %, тоді як стосовно групи порівняння відзначалось збільшення на 67 %.

У 5 групі спостерігалось порушення цитокинового балансу Th1 і Th2 типів (гуморального та клітинного).

Результати дослідження свідчать: вплив тільки антитіл без підключення Т-клітинної відповіді явно є недостатнім для повного подолання паразитарної інвазії. Саме активація імунної відповіді Th1 типу сприяє ізоляції паразита, але водночас негативно впливає на розвиток адекватної імунної відповіді. Крім того, виходячи з наукових літературних даних, відомо, що підвищена концентрація цитокинів Th1 типу сприяє зниженню якості сперми [12–14], що спостерігаємо й у наших дослідженнях.

## Висновки

1. Виявлені зміни показників спермограм у чоловіків із порушеннями репродуктивної функції свідчать про наявність астено-, оліго- та тератозооспермії, дискінезису різного ступеня виразності залежно від рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозної інвазії.

2. Ступінь порушення сперматогенезу прямо корелює з рівнем фрагментації ДНК у чоловічих гаметтах. Чим важча патоспермія, тим більша ймовірність того, що частота фрагментації ДНК у сперматозоїдах буде вищою за норму.

3. Дослідження механізмів імунних порушень в інфертильних чоловіків із токсокарозною інвазією свідчить про важливу роль цитокинових медіаторів у підтримці гомеостазу організму.

4. У інфертильних чоловіків на тлі токсокарозної інвазії пусковим механізмом стимуляції імунної відповіді Th2 типу, вочевидь, є компоненти оболонки інвазованих личинок паразита, а приєднання імунної відповіді Th1 типу сприяє ізоляції паразита та призводить до формування хронічного процесу (хронічного протікання інвазії), що негативно впливає на розвиток імунної відповіді.

**Перспективи подальших досліджень.** З огляду на наведені факти, надалі планується комплексне вивчення стану неспецифічної та специфічної ланки імунної системи у фертильних та інфертильних чоловіків з урахуванням рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозної інвазії з метою розроблення нових підходів для діагностики порушень репродуктивної функції чоловіків.

## Список літератури

- 1] Чадаев В. Е. Мужское бесплодие: современные аспекты / В. Е. Чадаев, Н. И. Козуб, М. В. Мироненко // Международный медицинский журнал. – 2007. – №4(13). – С. 80–83.
- 2] Влияние мужского фактора бесплодия на эффективность применения вспомогательных репродуктивных технологий / Э. В. Вартамян, А. В. Маркин, К. А. Цатурова и др. // Вестник Российского университета дружбы народов. – 2009. – №5. – С. 91–96.
- 3] Булыгин К. В. Характеристика оксидантно-антиоксидантной системы эякулята самцов крыс при действии полихлорированных бифенилов / К. В. Булыгин // Экспериментальная медицина и биология. – 2009. – №6(4). – С. 63–67.

- 4] Поворознюк М. В. Фактори, що впливають на стан фертильності у чоловіків з непліддям у шлюбі / М. В. Поворознюк // Медицинские аспекты здоровья мужчины. – 2015. – №2(17). – С. 63–68.
- 5] Farhi J. Distribution of causes of infertility in papatients attending primary fertility clinics in Israel / J. Farhi, A. Ben-Haroush // Isr Med Assoc J. – 2011. – Vol. 13(1). – P. 51–54.
- 6] Захарчук О. І. Сери-епідеміологічна характеристика токсокарозної інвазії у дітей на Буковині / О. І. Захарчук // Інфекційні хвороби. – 2013. – №4(74). – С. 60–63.
- 7] Гасанова Т. А. Токсокароз: распространение и влияние на репродуктивное здоровье / Т. А. Гасанова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2003. – №4. – С. 11–14.
- 8] Паразитозы человека: современные аспекты влияния на реактивность организма и актуальность при риносинуситах у детей / Г. И. Гарюк, Е. И. Бодня, И. В. Филатова, А. Н. Головок // Журнал вушних, носових і горлових хвороб. – 2009. – №4. – С. 72–77.
- 9] Цитокинова регуляція чоловічої плідної функції / А. М. Гаврилюк, В. В. Чоп'як, І. Й. Криль та ін. // Медицинские аспекты здоровья мужчины. – 2013. – №1(7). – С. 28–38.
- 10] WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. – 4th ed. – New York : Cambridge University Press, 1999. – 128 p.
- 11] Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза / С. А. Руднева, Е. Е. Брагина, Е. А. Арифалин и др. // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – №4. – С. 26–33.
- 12] Роль цитокинов в регуляции сперматогенеза: современный взгляд на проблему / Б. И. Айзикович, И. В. Айзикович, О. Ю. Верба, В. А. Козлов // Иммунология. – 2008. – Т. 29. – №3. – С. 191–192.
- 13] A repertoire of cytokines in human seminal plasma / M. Maegava, M. Kamada, M. Irahara et al. // J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 54. – Issues 1–2. – P. 3–42.
- 14] Останин А. А. Цитокиновый профиль семенной плазмы человека / А. А. Останин, Б. И. Айзикович, Е. П. Черных // Проблемы репродукции. – 2006. – №6. – С. 65–74.

## References

- 1] Chadayev, V. E., Kozub, N. I., & Mironenko, M. V. (2007). Muzhskoe besplodie: sovremennye aspekty [Male infertility: contemporary aspects] *Mezhdunarodnyj medicinskij zhurnal*, 4(13), 80–83. [in Russian].
- 2] Markin, A. V., Vartanyan, E. V., Tsaturova, K. A., Kibardina, N. V., & Anikina, T. A. (2009). Vliyaniye muzhskogo faktora besplodiya na e'fektivnost' primeneniya vspomogatelnykh reprodukivnykh tekhnologiy [Influence of male factor infertility on art efficiency]. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov*, 5, 91–96. [in Russian].
- 3] Bulygin, K. V. (2009). Kharakteristika oksidantno-antioksidantnoy sistemy e'yakulyata samcov krysv pri dejstvii polikhlorirovannykh bifenilov [The characterization of the oxidant-antioxidant system of male rats' ejaculate exposed to polychlorinated biphenyls]. *E'ksperimental'naya medicina i biologiya*, 6(4), 63–67. [in Russian].
- 4] Povoroznyuk, M. V. (2015). Faktory, shcho vplyvaiut na stan fertylnosti u cholovikiv z nepliddiam u shliubi [Factors affecting the state of fertility in men with infertility in marriage]. *Medicinskie aspekty zdorov'ya muzhchiny*, 2(17), 63–68. [in Ukrainian].
- 5] Farhi, J., & Ben-Haroush, A. (2011). Distribution of causes of infertility in papatients attending primary fertility clinics in Israel. *Isr Med Assoc J.*, 13(1), 51–54.
- 6] Zakharchuk, O. I. (2013). Sero-epidemiologichna kharakterystyka toksokaroznoi invazii u ditei na Bukovyni [Sero-epidemiological characteristics invasion toxocarasis in children Bukovyna]. *Infektsiini khvoroby*, 4(74), 60–63. doi: <http://dx.doi.org/10.11603/1681-2727.2013.4.2251>. [in Ukrainian].
- 7] Gasanova, T. A. (2003). Toksokaroz: rasprostraneniye i vliyaniye na reproduktivnoye zdorov'e [Toxocarasis: Distribution and Effect on Reproductive Health]. *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*, 4, 11–14. [in Russian].
- 8] Garyuk, G. I., Bodnya, E. I., Filatova, I. V., & Golovko, A. N. (2009). Parazitozy cheloveka: sovremennyye aspekty vliyaniya na reaktivnost' organizma i aktual'nost' pri rinosinusitakh u detey [Human parasitosis: modern aspects of the effect on the reactivity of the organism and the relevance of rhinosinusitis in children]. *Zhurnal vushnykh, nosovykh i horlovykh khvorob*, 4, 72–77. [in Russian].
- 9] Havryliuk, A. M., Chopiak, V. V., Kril, I. I., Vlokh, N. M., Shvalikovska, R. D., & Kurpish, M. (2013). Tsytokinova rehuliatysia cholovichoio plidnoi funktsii [Cytokine regulation of male productive function]. *Medicinskie aspekty zdorov'ya muzhchiny*, 1(7), 28–38. [in Ukrainian].
- 10] (1999). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press.
- 11] Rudneva, S. A., Bragina, E. E., Arifulin, E. A., Sorokina, T. M., Shileyko, L. V., Ermolaeva, S. A., et al. (2014). Fragmentaciya DNK v spermatozoidakh i eyo vzaimosvyaz' s narusheniem spermatogeneza [DNA fragmentation in spermatozoa and its relationship with impaired spermatogenesis]. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*, 4, 26–33. [in Russian].

- [12] Alzlkovlch, B. I., Alzlkovlch, I. V., Verba, O. Yu., & Kozlov, V. A. (2008). Rol' citokinov v regulyatsii spermatogeneza: sovremennyy vzglyad na problemu [Cytokine role in spermatogenesis: modern opinion on problem]. *Immunologiya*, 29(3), 191–192. [in Russian].
- [13] Maegawa, M., Kamada, M., Irahara, M., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Kasai, Y., et al. (2002). A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.*, 54(1–2), 3–42. doi: 10.1016/S0165-0378(01)00063-8.
- [14] Ostanin, A. A., Aisikovich, B. I., & Chernykh, E. R. (2006). Citokinovyy profil' semennoj plazmy cheloveka [Cytokine profile of human seminal plasma]. *Problemy reprodukcii*, 6, 65–74. [in Russian].

#### Відомості про авторів:

Воронцова Л. Л., д-р мед. наук, професор, зав. каф. клінічної лабораторної діагностики, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України».

Дуб М. І., викладач каф. клінічної лабораторної діагностики, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України».

Коваленко В. А., канд. біол. наук, старший викладач каф. клінічної лабораторної діагностики, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України».

Журавльова М. Є., старший викладач каф. клінічної лабораторної діагностики, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України».

#### Сведения об авторах:

Воронцова Л. Л., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. клинической лабораторной диагностики, ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

Дуб М. И., старший преподаватель каф. клинической лабораторной диагностики, ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

Коваленко В. А., канд. биол. наук, старший преподаватель каф. клинической лабораторной диагностики, ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

Журавлёва М. Е., старший преподаватель каф. клинической лабораторной диагностики, ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

#### Information about authors:

Vorontsova L. L., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, State Establishment "Zaporizhzhia Medical Academy of Post Graduate Education of Ministry of Health of Ukraine".

Dub M. I., Senior Lecturer, State Establishment "Zaporizhzhia Medical Academy of Post Graduate Education of Ministry of Health of Ukraine".

Kovalenko V. A., PhD, Senior Lecturer, State Establishment "Zaporizhzhia Medical Academy of Post Graduate Education of Ministry of Health of Ukraine".

Zhuravlova M. Ye., Senior Lecturer, State Establishment "Zaporizhzhia Medical Academy of Post Graduate Education of Ministry of Health of Ukraine".

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 17.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 25.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 11.06.2017

# Магнитно-резонансная холангиопанкреатография в клинической практике

Н. В. Туманская, А. В. Клименко, Т. М. Кичангина, Н. А. Ярешко, И. П. Джос

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

## Ключевые слова:

магнитно-резонансная холангиопанкреатография, жёлчные протоки, диагностика.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 230–235

DOI: 10.14739/2310-1237.2017.2.109675

E-mail: natvatum@gmail.com

В обзоре научной литературы анализируется современная роль магнитно-резонансной томографии (МРТ) в диагностике патологии внутри- и внепечёночных жёлчных протоков. Описаны методология исследования, основные виды магнитно-резонансной холангиопанкреатографии, особенности их проведения. Приведены основные показания к использованию метода, оценены возможности МРТ-холангиографии и факторы, влияющие на проведение исследования и интерпретацию полученных данных.

## Магнітно-резонансна холангіопанкреатографія у клінічній практиці

Н. В. Туманська, А. В. Клименко, Т. М. Кічангіна, Н. О. Ярешко, І. П. Джос

В огляді наукової літератури аналізується сучасна роль магнітно-резонансної томографії в діагностиці патології внутрішньо- та позапечінокових жовчних протоків. Описана методологія дослідження, основні види магнітно-резонансної холангіопанкреатографії, особливості їхнього проведення. Наведені основні показання до використання методу, оцінені можливості МРТ-холангіографії та фактори, що впливають на дослідження, інтерпретацію даних, котрі отримали.

## Magnetic resonance cholangiopancreatography in clinical practice

N. V. Tumanskaya, A. V. Klymenko, T. M. Kichangina, N. A. Yareshko, I. P. Dzhos

The review of the literature analyzes the current role of magnetic resonance imaging (MRI) in diagnosing the pathology of intra- and extrahepatic bile ducts. The methodology of the study, the main types of magnetic resonance cholangiopancreatography, the features of their conduct are described. The main indications for the use of the method are given, the possibilities of MRI-cholangiography and the factors influencing the research and interpretation of the obtained data are estimated.

## Ключові слова:

магнітно-резонансна холангіопанкреатографія, жовчні протоки, діагностика.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 230–235

## Key words:

magnetic resonance, cholangiopancreatography, biliary tract, diagnostics.

Pathologia 2017; 14 (2), 230–235

Магнитно-резонансная холангиопанкреатография (МРХПГ) является методом, который основан на использовании явления ядерного магнитного резонанса для визуализации внутри- и внепечёночных жёлчных протоков и протока поджелудочной железы. Впервые МРХПГ описана в 1986 году Валлнером и соавторами. Методика улучшалась на протяжении многих лет и совершенствуется в наши дни.

Метод магнитно-резонансной холангиопанкреатографии (МРГХГ) позволяет визуализировать жёлчные и панкреатические протоки неинвазивно в их физиологическом состоянии без использования контрастного препарата, может применяться в амбулаторных условиях без лучевой нагрузки на пациента и обслуживающий персонал, седации пациента и каких-либо побочных эффектов и осложнений [1,5,6,21,25].

МРХПГ играет фундаментальную роль в неинвазивном исследовании анатомических особенностей и патологических изменений гепатопанкреатобилиарной системы. Усовершенствованные методики проведения МРХПГ приближаются по точности к специальным инвазивным рентгенологическим методам верификации диагноза, используемым в настоящее время: эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии (ЭРХПГ), чрескожной чреспечёночной холангиографии (ЧХХ), точность которых достигает 90–97 % [1–3].

Однако некоторые авторы считают, что эти методики сопряжены с высоким риском развития осложнений: общее количество осложнений эндоскопической

ретроградной холангиопанкреатографии и, как правило, её неотъемлемой части – эндоскопической папиллосфинктеротомии может достигать 10,6 %, из них 7,3 % – тяжёлых, летальность при ретроградных вмешательствах на протоках составляет 0,1–1 % [3].

## Цель работы

Уточнение показаний и возможности применения магнитно-резонансной холангиопанкреатографии при заболеваниях гепатопанкреатобилиарной области; знакомство широкого круга специалистов с возможностями применения магнитно-резонансной холангиопанкреатографии в клинической практике.

## Методические аспекты исследования

МРХПГ основана на избирательной визуализации медленно текущих жидкостей посредством импульсных последовательностей с сильной T2-взвешенностью. При их длине TE (больше 500 мс) неподвижные жидкости имеют T2-контраст, в 16 раз превышающий сигнал от жира. Это создаёт очень высокую интенсивность сигнала от жидкостей относительно фоновых тканей. Применение этого принципа при исследовании верхней половины брюшной полости позволяет избирательно визуализировать жёлчь и панкреатический секрет относительно фона печени и паренхимы поджелудочной железы [1,4–6].

Традиционно при МРХПГ доступны два метода сбора данных: проекционный метод (МРХПГ толстым слэбом, RARE) и многослойный метод (МРХПГ тонкими слоями).

При проекционной МРХПГ используется импульсная последовательность RARE, разработанная в 1986 году Hennig и соавторами и применённая для МРХПГ в 1995 году Laubenberg и соавторами (hbc/1). RARE выполняется на задержке дыхания со сбором данных от одного слэба тканей толщиной 30–70 мм за несколько секунд после единственного возбуждения. При этом достигается визуализация всех разветвлений жёлчных и панкреатического протоков. Данный метод делает возможным сбор данных за короткое время без постпроцессорной обработки, что обеспечивает визуализацию даже у пациентов с тяжёлым общим состоянием или страдающих клаустрофобией, когда необходимо сократить время исследования [5–9].

Ряд авторов считают, что особенностью многослойного метода является получение множественных изображений тонких слоёв исследуемой зоны, как правило, в аксиальной и фронтальной плоскостях (hbc/2) [1,5,6,21,25]. Получаемые тонкие срезы позволяют лучше дифференцировать минимальные стриктуры, незначительные дефекты наполнения, а также компенсировать артефакты частичного объёма. Наряду с анализом тонких срезов выполняется 3D-реконструкция с использованием MIP-алгоритма для получения проекции максимальной интенсивности. Полученное трёхмерное изображение обеспечивает более чёткую пространственную картину протоковой системы, позволяет точно определить уровень обструкции, улучшает визуализацию сложных стриктур, и более детально планировать выполнение хирургических и эндоскопических вмешательств [5–9].

В настоящее время большое внимание уделяется секретин-стимулированной МРХПГ, широко применяемой при патологических изменениях протока поджелудочной железы. Секретин является эндогенным гормоном, стимулирующим секрецию поджелудочной железы. Применение его синтетического аналога внутривенно (1 мл/10 кг массы тела) улучшает визуализацию протока поджелудочной железы за счёт увеличения его калибра вследствие усиления секреции воды и электролитов, преимущественно бикарбоната. Увеличивая объём выделяемого поджелудочной железой сока, секретин не влияет на образование железистых ферментов. После внутривенного введения секретина проводят сканирование толстым слэбом в коронарной плоскости каждые 15–30 секунд в течение 10–15 минут [1,6]. Эффект секретинной стимуляции начинается почти сразу после внутривенного введения и достигает максимума в течение 2–5 минут. Через 10 минут после инъекции калибр главного панкреатического протока возвращается к исходному значению. Показаниями для этого метода являются оценка анатомического строения панкреатического протока, обнаружение стриктур и дилатации протока, оценка его целостности, выявление панкреатических свищей, а также оценка функции поджелудочной железы и сфинктера Одди [10–13,36].

Ряд авторов описывает ещё одну разновидность МРХПГ: функциональную МРХПГ, которая проводится



Рис. 1. МРХПГ «толстым слэбом». Холецистохоледохолитиаз. Дилатация внутри- и внепечёночных жёлчных протоков. Визуализируются множественные дефекты наполнения неправильной формы в жёлчном пузыре и панкреатической части холедоха.

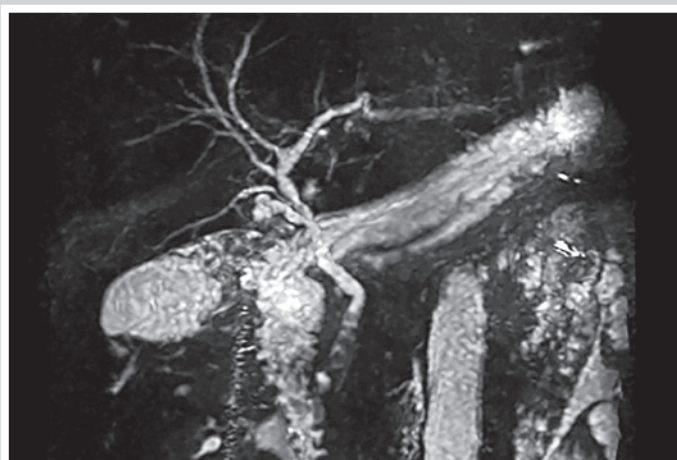


Рис. 2. МРХПГ многослойный метод. Холецистохоледохолитиаз. Визуализируются множественные дефекты наполнения неправильной формы в жёлчном пузыре и панкреатической части холедоха.

с использованием МР-липофильного парамагнитного контрастного вещества, вводимого внутривенно для оценки гепатопанкреато-билиарной экскреции. Исследование проводят в аксиальной и коронарной плоскостях, через 15–120 мин после внутривенного введения контрастного вещества. Исследование проводится в импульсной последовательности T1, при этом жёлчь имеет гиперинтенсивный сигнал. Этот метод может быть использован при аналогичных показаниях, как и для T2-взвешенных MRCP, и в большинстве случаев имеет такую же диагностическую точность, но с несколько большими финансовыми затратами, поскольку используется контрастный препарат. В то же время функциональная МРХПГ имеет ряд преимуществ, а именно: лучше демонстрирует связь между кистозными образованиями и внутрипечёночными жёлчными протоками при диагностике врождённых заболеваний (например, болезнь Кароли). Функциональная МРХПГ позволяет увидеть активную экстравазацию контраста

при подозрении на утечку жёлчи. В тех случаях, когда существует значительная билиарная обструкция с нарушением функции гепатоцитов, возможно проведение отсроченной МРХПГ (до 24 часов), пока контраст не будет видно в жёлчном пузыре и двенадцатиперстной кишке [14–16].

Инвазивную методику исследования жёлчевыводящей системы – гидропрессивную магнитно-резонансную холангиопанкреатографию (ГПМРХПГ) предложили в 2010 году Ю. А. Пархисенко и А. В. Горохов. В сочетании с традиционной МР томографией и МРХПГ ГПМРХПГ является высокоинформативным методом определения причин и уровня билиарной гипертензии. Повышение гидравлического давления в билиарном тракте достигается путём введения через наружное отверстие холангиостомы физиологического раствора со скоростью 0,3 мл/с до появления чувства наполнения (объём – 7–10 мл), что позволяет повысить информативность МРХПГ. Применение разработанного диагностического метода во многих случаях дало возможность отказаться от инвазивных рентгеноконтрастных методик исследования. Полученной информации при ГПМРХПГ практически во всех случаях оказывается достаточно для определения лечебной тактики, вида и объёма оперативного вмешательства. По данным авторов, применение разработанного метода у больных с заболеваниями ЖВП повысило точность диагностики до 97,1 %, поджелудочной железы – до 94,8 % [17].

Многие авторы как в отечественных, так и зарубежных публикациях указывают на высокие возможности МРХПГ в диагностике различной патологии гепатопанкреатобилиарной системы [1,18–21]. Использование метода МРХПГ очень актуально в связи с повышением встречаемости патологии ВЖП и главного панкреатического протока ПЖ. На первом месте по распространённости среди хирургической патологии билиарной зоны стоит ЖКБ. Этим недугом страдает приблизительно каждый десятый житель планеты. Поэтому раннее выявление ЖКБ и её осложнений является одной из самых актуальных проблем современной гастроэнтерологии и хирургии [6,22–25].

Разработаны основные показания для проведения МРХПГ больным с подозрением на ЖКБ: частые эпизоды абдоминального болевого синдрома с локализацией в правом подреберье, эпизоды преходящей желтухи, расширение холедоха, холедохолитиаз по данным УЗИ, необходимость уточнения наличия и количества камней в жёлчном пузыре, оценка их размера и положения. МРХПГ позволяет увидеть конкременты независимо от места их локализации: жёлчный пузырь, пузырный проток, внутрипечёночные и внепечёночные протоки [1,6,18,20–22,25].

МРХПГ имеет большое значение для изучения особенностей анатомического строения гепатобилиарной зоны при подготовке к традиционной и лапароскопической холецистэктомии. МРХПГ также эффективно используется после проведения холецистэктомии. В ранние сроки – для выявления повреждений жёлчных протоков, их уровня и протяжённости, а также для оценки положения и адекватности установки дренажа. В поздние сроки основным показанием для проведе-

ния МРХПГ является установление причин болевого синдрома, билиарной гипертензии, гипербилирубинемии (холедохолитиаз структуры) [19,20,26–29]. По данным ряда авторов, при выявлении холедохолитиаза чувствительность МРХПГ составляет 81–86 %, специфичность – 97–99 %, общая точность – 93–96 %, прогностически положительный ответ – 93–96 %, прогностически отрицательный – 94–98 %. Оправдано использование МРХПГ у пациентов после оперативных вмешательств на жёлчных протоках для диагностики состояния и проходимости анастомозов [25,27–30].

В последнее время МРХПГ играет важную роль в диагностике опухолевого поражения протоковой системы, позволяя оценить протяжённость поражения, степень обструкции, а также состояние протоковой системы проксимальнее места обструкции. По данным зарубежных авторов, чувствительность МРХПГ в распознавании всех типов билиарных осложнений после ортотопической трансплантации печени составила 92–94 %, специфичность – 91–94 %, диагностическая точность – 92–94 %. Чувствительность МРТ в сочетании с МРХПГ при диагностике повреждений жёлчных протоков составляет 99–100 %, специфичность – 98–99 %, общая диагностическая точность – 99–100 % [14,16,30,31].

Некоторые авторы считают обоснованным применение МРХПГ для контроля состояния и функционирования стента после эндоскопического лечения стенозов жёлчных протоков путём стентирования [21,25].

В ряде публикаций говорится о том, что точность МРХПГ в выявлении аномалии панкреатического протока *pancreas divisum* составляет 100 %. Высокое качество и 3D-реконструкция изображений позволяют увидеть изолированный вентральный и дорсальный протоки, открывающиеся на большом и малом дуоденальных сосочках соответственно. При исследовании протоков поджелудочной железы для улучшения визуализации возможно проведение секретин-стимулированной МРХПГ [6,32]. Накопился немалый опыт использования данного метода в диагностике хронического панкреатита. МРХПГ позволяет выявить характерные изменения протоковой системы: неравномерное расширение и сужение протоков, формирование кистообразных расширений боковых ветвей и псевдокист, внутрипротоковое образование камней. В проведённых исследованиях чувствительность, специфичность и точность МРХПГ в определении патологии составила 88 %, 98 %, 91 % соответственно [13,33]. Важным преимуществом МРХПГ в визуализации протоковой системы поджелудочной железы является отсутствие риска возникновения или обострения панкреатита.

Многие авторы считают также неоспоримым то, что МРХПГ является разумной альтернативой диагностической части комплексных инвазивных рентгеноэндоскопических методов (ЭХПГ, ЧЧХГ), которые следует использовать как минимально-инвазивные хирургические методы с лечебной целью и для получения биопсийного материала [1–3].

Обобщённый опыт проведения МРХПГ позволяет обоснованно наметить план адекватного лечения,



определить целесообразность и объём оперативного вмешательства, прогнозировать течение заболевания. Кроме того, использование МРХПГ в обследованиях больных с патологией органов гепатопанкреатобилиарной зоны даёт возможность ограничить применение инвазивных процедур, снизить риск развития осложнений, уменьшить лучевую нагрузку, сократить длительность лечения.

Некоторые авторы обращают внимание, что при визуализации жёлчных протоков есть ряд факторов, приводящих к искажению результатов исследования [1,5,25,28,34].

Факторы, влияющие на качество полученных результатов, можно разделить на три группы:

- связанные с проведением исследования (дыхательные и двигательные артефакты, артефакты реконструкций);

- связанные с внепротоковыми факторами (пульсация сосудов, инородные тела, нормальные анатомические варианты строения и патологические изменения близлежащих органов);

- связанные с протоковыми факторами (пневмобилия, гемобилия, инородные включения, сигнал потока жидкости).

*Факторы, связанные с проведением исследования и постпроцессинговой обработкой полученных данных [5,6,25,34]:*

- артефакты от реконструкции – высокоинтенсивный сигнал от окружающей жёлчи при построении МР-реконструкций из массива «сырых срезов» может полностью скрывать малые дефекты наполнения (мелкие конкременты, полипы);

- дыхательные артефакты – МРХГ по методике тонких срезов требует задержки дыхания; при неполной задержке дыхания, обусловленной беспокойством или тяжёлым состоянием пациента, возможно отсутствие сигнала от отдельных участков протоковой системы, что при выполнении МР-реконструкции может приводить к получению картины разорванных или удвоенных жёлчных протоков, неравномерных сужений или расширений протоков;

- статичность изображения – в отличие от ЭРХПГ, транспечёночной и чрездrenaжной холангиографии, которые являются динамическими исследованиями, МРХПГ – статическая методика. Это затрудняет получение информации об аномалиях соединения панкреатического и общего жёлчных протоков, наличии соустьев между кистозными образованиями и панкреатическими протоками, истинном состоянии жёлчных протоков после чрезпечёночного дренирования для декомпрессии места обструкции.

*Факторы, связанные с внепротоковыми аспектами [5,25,28,34,35]:*

- металлические инородные материалы, такие как хирургические клипсы и стенты, не являются противопоказанием к проведению МРХПГ, но в ряде случаев могут давать потерю сигнала в окружающей их зоне и симулировать обструкцию протоков при расположении их в непосредственной близости от билиарного дерева. Однако следует отметить, что титановые клипсы для лапароскопической холецистэктомии не вызывают подобных артефактов;

- нормальные анатомические варианты строения и патологические изменения близлежащих органов могут симулировать патологию протоков билиарной системы, например, жидкость в желудке или кишечнике может выглядеть как кистозное псевдообразование из-за близкого расположения к панкреатобилиарной зоне; жидкость, расположенная между складками желудка, может быть ошибочно принята за неравномерно расширенный панкреатический проток. Если луковица двенадцатиперстной кишки содержит жидкость и газ, она может быть принята за конкремент; дивертикул двенадцатиперстной кишки может симулировать кистозное образование общего жёлчного протока и поджелудочной железы; кисты почек и жидкость внутри мочевыводящей системы могут выглядеть как кистозные образования поджелудочной железы; наложение кишечного жидкостного содержимого и скопления свободной жидкости в брюшной полости могут ограничивать визуализацию панкреатобилиарной протоковой системы или симулировать их патологические изменения;

- пульсирующая сосудистая компрессия при проведении МРХПГ может дать картину псевдообструкции, при этом наиболее частая локализация таких непатологических сужений — общий печёночный проток и зона конfluence; правая печёночная артерия может сдавливать общий или левый печёночные протоки сзади, тогда как гастродуоденальная артерия может сдавливать центральную часть общего жёлчного протока по правой переднебоковой поверхности (степень такой ложной обструкции жёлчного протока зависит от диаметра артерии).

*Факторы, связанные с протоковыми агентами [5,25,28,34,35]:*

- пневмобилия, гемобилия и инородные включения (паразиты, детрит) могут снижать интенсивность сигнала от жёлчи и восприниматься как жёлчные камни либо затруднять визуализацию жёлчного пузыря или внепечёночных жёлчных протоков;

- иногда сигнал от потока в центральной части протока может приниматься за дефект наполнения, что чаще всего наблюдается при увеличении диаметра протоков, в которых возникает турбулентный ток жидкости, расценивающийся как дефект наполнения.

## Выводы

Несмотря на появление большого количества публикаций, посвящённых МРХПГ, современные представления о её возможностях всё ещё достаточно противоречивы и до конца не изучены. Анализ показал, что процесс освоения этой методики окончательно не завершён и направлен на поиск и разработку оптимальных импульсных последовательностей и технических параметров новых методик проведения с целью получения более достоверной и детальной информации о протоковой системе гепатопанкреатобилиарной зоны.

## Список литературы

- [1] Griffin N. Magnetic resonance cholangiopancreatography: the ABC of MRCP / N. Griffin G. Charles-Edwards, L. A. Grant // Insights Imaging. – 2012. – Vol. 3(1). – P. 11–21.

- [2] MRCP compared to diagnostic ERCP for diagnosis when biliary obstruction is suspected: a systematic review / E. C. Kaltenthaler, S. J. Walters, J. Chilcott, et al. // *BMC Medical Imaging*. – 2006. – Vol. 6. – P. 9–13.
- [3] Sheridan M. B. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography should no longer be used as a diagnostic test: the case in favour / M. B. Sheridan // *Digestive & Liver Disease*. – 2002. – Vol. 34. – P. 370–374.
- [4] Biliary Imaging: Multimodality Approach to Imaging of Biliary Injuries and Their Complications / K. Melamed, C. A. LeBedis, S. W. Anderson, J. A. Soto // *RadioGraphics*. – 2014. – Vol. 34. – P. 613–623.
- [5] Васильев А. Ю. Магнитно-резонансная холангиография в диагностике заболеваний желчевыводящих путей / А. Ю. Васильев, В. А. Ратников. – М.: Медицина, 2006. – 200 с.
- [6] Руммени Э. И. Магнитно-резонансная томография тела: пер. с англ. / Э. И. Руммени, П. Раймер, В. Хайндель. – М.: МЕДпресс-информ, 2014. – 848 с.
- [7] Three-dimensional Fast-Recovery Fast Spin-Echo MRCP: Comparison with Two-dimensional Single-Shot Fast Spin-Echo Techniques / A. Sodickson, K. J. Mortele, M. A. Barish, et al. // *Radiology*. – 2006. – Vol. 238. – Issue 2. – P. 549–59.
- [8] Mandarano G. The diagnostic MRCP examination: overcoming technical challenges to ensure clinical success / G. Mandarano, J. Sim // *Biomed Imaging Interv J*. – 2008. – Vol. 4(4). – e28.
- [9] Magnetic resonance cholangiopancreatography: Comparison of two- and three-dimensional sequences for the assessment of pancreatic cystic lesions / K. Liu, P. Xie, W. Peng, Zh. Zhou // *Oncology Letters*. – 2015. – Vol. 9(4). – P. 917–1921.
- [10] Secretin-enhanced MR Cholangiopancreatography: Spectrum of Findings / T. Tirkes, K. Sandrasegaran, R. Sanyal et al. // *RadioGraphics*. – 2013. – Vol. 33. – P. 1889–1906.
- [11] Autoimmune Pancreatitis: Pancreatic and Extrapancreatic MR Imaging–MR Cholangiopancreatography Findings at Diagnosis, after Steroid Therapy, and at Recurrence / R. Manfredi, L. Frulloni, W. Mantovani, M. Bonatti, et al. // *Radiology*. – 2011. – Vol. 260. – P. 428–436.
- [12] Anomalies, Anatomic Variants, and Sources of Diagnostic Pitfalls in Pancreatic Imaging / P. Borghei, F. Sokhondan, A. Shirkhoda, D. E. Morgan // *Radiology*. – 2013. – Vol. 266. – Issue 1. – P. 28–36.
- [13] Forsmark C. E. The early diagnosis of chronic pancreatitis / C. E. Forsmark // *Clinical Gastroenterology. Hepatol*. – 2008. – Vol. 6. – P. 1291–1293.
- [14] Primary sclerosing cholangitis: meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography / M. Dave, B. J. Elmunzer, B. A. Dwamena, P. D. R. Higgins // *Radiology*. – 2010. – Vol. 256(2). – P. 387–396.
- [15] Review: Advances in magnetic resonance cholangiopancreatography: From morphology to functional imaging / K. Gulati, O. A. Catalano, D. V. Sahani // *Indian Journal of Radiology and Imaging*. – 2007. – Vol. 17. – Issue 4. – P. 247–53.
- [16] Role of MRCP in Differentiation of Benign and Malignant Causes of Biliary Obstruction / M. Suthar, S. Purohit, V. Bhargav, P. Goyal // *Journal of Clinical and Diagnostic Reserch*. – 2015. – Vol. 9. – Issue 11. – TC08–TC12.
- [17] Пархисенко Ю. А. Гидропрессивная магнитно-резонансная холангиопанкреатография: ее место в диагностике болезней гепатопанкреатодуоденальной области / Ю. А. Пархисенко, А. В. Горохов // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. – 2010. – Т. 3. – №4. – С. 344–347.
- [18] Magnetic Resonance Cholangiopancreatography: A Meta-Analysis of Test Performance in Suspected Biliary Disease / J. Romagnuolo, M. Bardou, E. Rahme, L. Joseph, et al. // *Annals of Internal Medicine*. – 2003. – Vol. 139. – Issue 7. – P. 547–57.
- [19] Verma D. EUS vs MRCP for detection of choledocholithiasis / D. Verma, A. Kapadia, G. M. Eisen, D. G. Adler // *Gastrointest Endoscopy*. – 2006. – Vol. 64. – Issue 2. – P. 248–54.
- [20] Internal Clinical Guidelines Team (UK). Gallstone Disease. Diagnosis and Management of Cholelithiasis, Cholecystitis and Choledocholithiasis. NICE Clinical Guidelines. – 2014. – №188.
- [21] Is magnetic resonance cholangiopancreatography the new gold standard in biliary imaging? / V. Shanmugam, G. C. Beattie, S. R. Yule, et al. // *The British Journal of Radiology*. – 2005. – Vol. 78. – Issue 934. – P. 888–893.
- [22] Ledro-Cano D. Suspected choledocholithiasis: endoscopic ultrasound or magnetic resonance cholangio-pancreatography? A systematic review / D. Ledro-Cano // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2007. – Vol. 19. – Issue 11. – P. 1007–1011.
- [23] Diagnostic value of magnetic resonance cholangiopancreatography in choledocholithiasis / W. Chen, J.J. Mo, L. Lin, et al. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21. – Issue. 11. – P. 3351–3360.
- [24] Лучевая диагностика заболеваний желчевыводящих путей / Г. Е. Труфанов, С. Д. Рудь, С. С. Багненко, С. И. Лыткина. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2011. – 416 с.
- [25] MR Cholangiopancreatography / L. Van Hoe, D. Vanbeckeort, K. Mermuys, W. Van Steenberghe. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [26] Adult Bile Duct Strictures: Role of MR Imaging and MR Cholangiopancreatography in Characterization / V. S. Katabathina, A. K. Dasyam, N. Dasyam, K. Hosseinzadeh // *RadioGraphics*. – 2014. – Vol. 34. – P. 565–586.
- [27] Современные лучевые методы (ультразвуковое исследование, рентгеновская компьютерная и магнитно-резонансная томография) в диагностике холедохолитиаза (обзор литературы) / В. А. Ратников, В. М. Черемисин, С. Б. Шейко // *Медицинская визуализация*. – 2002. – №3. – С. 99–106.
- [28] Ратников В. А. Магнитно-резонансная томография при желчно-каменной болезни и её осложнениях: методика проведения и диагностические возможности / В. А. Ратников // *Медицинская визуализация*. – 2002. – №2. – С. 52–59.
- [29] Diagnostic Accuracy of MRCP in choledocholithiasis / A. Guarise, S. Baltier, P. Mainardi, N. Faccioli // *La radiologia medica*. – 2005. – Vol. 109(3). – P. 239–251.
- [30] Value of Magnetic Resonance Cholangiopancreatography in Assessment of Nonanastomotic Biliary Strictures After Liver Transplantation / C. den Dulk, M. N. J. M. Wasser, F. E. J. A. Willemsen, et al. // *Transplantation Direct*. – 2015. – Vol. 1. – Issue 10. – e42.
- [31] Diagnostic value of magnetic resonance cholangiopancreatography for biliary complications in orthotopic liver transplantation: a meta-analysis / Y. B. Xu, Z. G. Min, H. X. Jiang, et al. // *Transplantation Proceedings*. – 2013. – Vol. 45. – Issue 6. – P. 2341–2346.
- [32] Magnetic resonance cholangiopancreatography in the diagnosis of pancreas divisum: a systematic review and meta-analysis / T. Rustagi, B. Njei // *Pancreas*. – 2014. – Vol. 43. – Issue 6. – P. 823–8.
- [33] The Accuracies of Diagnosing Pancreas Divisum by Magnetic Resonance Cholangiopancreatography and Endoscopic Ultrasound: A Systematic Review and Meta-analysis / Zh. Shen, S. Munke, B. Zhou, et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 35389.
- [34] Budigi B. Pitfalls of MRCP: What every radiologist must know! Congress: ECR 2016 / C-1123 / B. Budigi, P. Kala, R. Avantsa // *Congress: ECR 2016*. – Poster № C-1123.
- [35] CT and MR cholangiography: advantages and pitfalls in perioperative evaluation of biliary tree / T. Hyodo, S. Kumano, F. Kushihata, et al. // *An international journal of radiology, radiation oncology and all relation science*. – 2012. – Vol. 85(1015). – P. 887–896.
- [36] Manfredi R. Secretin-enhanced MR Imaging of the Pancreas / R. Manfredi, R. Pozzi Mucelli // *Radiology*. – 2016. – Vol. 279. – Issue 1. – P. 29–43.

References

- [1] Griffin, N., Charles-Edwards, G., & Grant, L. A. (2012). Magnetic resonance cholangiopancreatography: the ABC of MRCP. *Insights Imaging*, 3(1), 11–21. doi: 10.1007/s13244-011-0129-9.
- [2] Kaltenthaler, E. C., Walters, S. J., Chilcott, J., Blakeborough, A., Bravo Vergel, Y., & Thomas, S. (2006). MRCP compared to diagnostic ERCP for diagnosis when biliary obstruction is suspected: a systematic review. *BMC Medical Imaging*, 6, 9–13. doi: 10.1186/1471-2342-6-9.
- [3] Sheridan, M. B. (2002) Endoscopic retrograde cholangiopancreatography should no longer be used as a diagnostic test: the case in favour. *Digestive & Liver Disease*, 34, 370–374. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80132-3.
- [4] Melamed, K., LeBedis, C. A., Anderson, S. W., & Soto, J. A. (2014). Biliary Imaging: Multimodality Approach to Imaging of Biliary Injuries and Their Complications. *RadioGraphics*, 34, 613–623. doi: 10.1148/rg.343130011.
- [5] Vasil'ev, A. Yu., & Ratnikov, V. A. (2006) *Магнитно-резонансная холангиография в диагностике заболеваний желчевыводящих путей [Magnetic resonance cholangiography in the diagnosis of diseases of the bile ducts]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
- [6] Rummeny, E. J., Reimer, P., & Heindel, W. (2014) *Магнитно-резонансная томография тела [MR Imaging of the Body]*. Moscow: MEDpress-inform. [in Russian].
- [7] Sodickson, A., Mortele, K. J., Barish, M. A., Zou, K. H., Thibodeau, S., & Tempny, C. M. (2006). Three-dimensional Fast-Recovery Fast Spin-Echo MRCP: Comparison with Two-dimensional Single-Shot Fast Spin-Echo Techniques. *Radiology*, 238(2), 549–59. doi: 10.1148/radiol.2382032065.
- [8] Mandarano, G., & Sim, J. (2008) The diagnostic MRCP examination: overcoming technical challenges to ensure clinical success. *Biomed Imaging Interv J*, 4(4), e28. doi: 10.2349/biij.4.4.e28.
- [9] Liu, K., Xie, P., Peng, W., & Zhou, Zh. (2015) Magnetic resonance cholangiopancreatography: Comparison of two- and three-dimensional sequences for the assessment of pancreatic cystic lesions. *Oncology Letters*, 9(4), 1917–1921. doi: 10.3892/ol.2015.2935.
- [10] Tirkes, T., Sandrasegaran, K., Sanyal, R., Sherman, S., Schmidt, C. M., Cote, G. A., & Akisik, F. (2013) Secretin-enhanced MR Cholangiopancreatography: Spectrum of Findings. *RadioGraphics*, 33, 1889–1906. doi: 10.1148/rg.337125014.

- [11] Manfredi, R., Frulloni, L., Mantovani, W., Bonatti, M., Graziani, R., & Pozzi Mucelli, R. (2011). Autoimmune Pancreatitis: Pancreatic and Extrapancratic MR Imaging—MR Cholangiopancreatography Findings at Diagnosis, after Steroid Therapy, and at Recurrence. *Radiology*, 260, 428–436. doi: 10.1148/radiol.11101729.
- [12] Borghei, P., Sokhandon, F., Shirkhoda, A., & Morgan, D. E. (2013). Anomalies, Anatomic Variants, and Sources of Diagnostic Pitfalls in Pancreatic Imaging. *Radiology*, 266(1), 28–36. doi: 10.1148/radiol.12112469.
- [13] Forsmark, C. E. (2008). The early diagnosis of chronic pancreatitis. *Clinical Gastroenterology, Hepatol*, 6, 1291–1293.
- [14] Dave, M., Elmunzer, B. J., Dwamena, B. A., & Higgins, P. D. (2010). Primary sclerosing cholangitis: meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology*, 256(2), 387–396. doi: 10.1148/radiol.10091953.
- [15] Gulati, K., Catalano, O. A., & Sahani, D. V. (2007) Review: Advances in magnetic resonance cholangiopancreatography: From morphology to functional imaging. *Indian Journal of Radiology and Imaging*, 17(4), 247–53.
- [16] Suthar, M., Purohit, S., Bhargava, V., & Goyal, P. (2015) Role of MRCP in Differentiation of Benign and Malignant Causes of Biliary Obstruction. *Journal of Clinical and Diagnostic Reserch*, 9(11), TC08–TC12. doi: 10.7860/JCDR/2015/14174.6771.
- [17] Parkhisenko, Yu. A., & Gorokhov, A. V. (2010) Hidropressivnaya magnitno-rezonansnaya kholangiopankreatografiya: eyo mesto v diagnostike boleznj gepatopankreatoduodenal'noj oblasti [Hydropressive magnetic resonance cholangiopancreatography: its place in the diagnosis of hepatopankreatoduodenal diseases]. *Vestnik e'ksperimental'noj i klinicheskoy khirurgii*, 3(4), 344–347. [in Russian].
- [18] Romagnuolo, J., Bardou, M., Rahme, E., Joseph, L., Reinhold, C., & Barkun, A. N. (2003). Magnetic Resonance Cholangiopancreatography: A Meta-Analysis of Test Performance in Suspected Biliary Disease. *Annals of Internal Medicine*, 139(7), 547–57. doi: 10.7326/0003-4819-139-7-200310070-00006.
- [19] Verma, D., Kapadia, A., Eisen, G. M., & Adler, D. G. (2006). EUS vs MRCP for detection of choledocholithiasis. *Gastrointest Endoscopy*, 64(2), 248–54. doi: 10.1016/j.gie.2005.12.038.
- [20] Internal Clinical Guidelines Team (UK). (2014). Gallstone Disease. Diagnosis and Management of Cholelithiasis, Cholecystitis and Choledocholithiasis. *NICE Clinical Guidelines*, 188.
- [21] Shanmugam, V., Beattie, G. C., Yule, S. R., Reid, W., & Loudon, M. A. (2005). Is magnetic resonance cholangiopancreatography the new gold standard in biliary imaging? *The British Journal of Radiology*, 78(934), 888–93. doi: 10.1259/bjr/51075444.
- [22] Ledro-Cano, D. (2007) Suspected choledocholithiasis: endoscopic ultrasound or magnetic resonance cholangio-pancreatography? A systematic review. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(11), 1007–1011. doi: 10.1097/MEG.0b013e328133f30b.
- [23] Chen, W., Mo, J. J., Lin, L., Li, C. Q., & Zhang, J. F. (2015) Diagnostic value of magnetic resonance cholangiopancreatography in choledocholithiasis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(11), 3351–3360. doi: 10.3748/wjg.v21.i11.3351.
- [24] Trufanov, G. Ye., Rud', S. D., Bagnenko, S. S., & Lytkina, S. I. (2011) Luchevaya diagnostika zabollevanij zhelchevyvodyashchikh putej [Radiation diagnosis of bile duct diseases]. Saint Petersburg: ELBI-SPb. [in Russian].
- [25] Van Hoe, L., Vanbeckeort, D., Mermuys, K., & Van Steenberg, W. (2006) MR Cholangiopancreatography. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [26] Katabathina, V. S., Dasyam, A. K., Dasyam, N., Hossein-zadeh, K. (2014). Adult Bile Duct Strictures: Role of MR Imaging and MR Cholangiopancreatography in Characterization. *RadioGraphics*, 34, 565–586. doi: https://doi.org/10.1148/rg.343125211.
- [27] Ratnikov, V. A., Cheremisin, V. M., & Sheiko, S. B. (2002) Sovremennyye luchevye metody (ul'trazvukovoe issledovanie, rentgenovskaya kompyuternaya i magnitno-rezonansnaya tomografiya) v diagnostike kholeodokho litiaza (obzor literatury) [Modern Radiological Methods (US, CT and MRI) in Diagnostics of Choledocholithiasis (Literature Review)]. *Medicinskaya vizualizaciya*, 3, 99–106. [in Russian].
- [28] Ratnikov, V. A. (2002). Magnitno-rezonansnaya tomografiya pri zhelch-nokamennoj boleznj i eyo oslozhneniyakh: metodika provedeniya i diagnosticheskiye vozmozhnosti [Magnetic Resonance Imaging at Bile Stones Disease and her Complications: Technique of Realization and Diagnostic Possibilities]. *Medicinskaya vizualizaciya*, 2, 52–59. [in Russian].
- [29] Guarise, A., Balthieri, S., Mainardi, P., & Faccioli, N. (2005) Diagnostic Accuracy of MRCP in choledocholithiasis. *La radiologia medica*, 109(3), 239–251.
- [30] den Dulk, A. C., Wasser, M. N., Willemsen, F. E., Monraats, M. A., de Vries, M., van den Boom, R., et al. (2015) Value of Magnetic Resonance Cholangiopancreatography in Assessment of Nonanastomotic Biliary Strictures After Liver Transplantation. *Transplantation Direct*, 1(10), e42. doi: 10.1097/TXD.0000000000000556.
- [31] Xu, Y. B., Min, Z. G., Jiang, H. X., Qin, S. Y., & Hu, B. L. (2013). Diagnostic value of magnetic resonance cholangiopancreatography for biliary complications in orthotopic liver transplantation: a meta-analysis. *Transplantation Proceedings*, 45(6), 2341–2346. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.03.031.
- [32] Rustagi, T., & Njei, B. (2014). Magnetic resonance cholangiopancreatography in the diagnosis of pancreas divisum: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas*, 43(6), 823–8.
- [33] Shen, Zh., Munker, S., Zhou, B., Li, L., Yu, Ch., & Li, Y. (2016) The Accuracies of Diagnosing Pancreas Divisum by Magnetic Resonance Cholangiopancreatography and Endoscopic Ultrasound: A Systematic Review and Meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 35389. doi: 10.1038/srep35389.
- [34] Budigi, B., Kala, P., & Avantsa, R. (2016). Pitfalls of MRCP: What every radiologist must know! *Congress: ECR 2016, C-1123*. doi: 10.1594/ecr2016/C-1123.
- [35] Hyodo, T., Kumano, S., Kushihata, F., Okada, M., Hirata, M., Tsuda, T., et al. (2012) CT and MR cholangiography: advantages and pitfalls in perioperative evaluation of biliary tree. *An international journal of radiology, radiation oncology and all relation science*, 85(1015), 887–896. doi: 10.1259/bjr/21209407.
- [36] Manfredi, R., & Pozzi Mucelli, R. (2016). Secretin-enhanced MR Imaging of the Pancreas. *Radiology*, 279(1), 29–43. doi: 10.1148/radiol.2015140622.

### Сведения об авторах:

Туманская Н. В., канд. мед. наук, доцент каф. урологии, лучевой диагностики и терапии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.  
Клименко А. В., д-р мед. наук, профессор каф. факультетской хирургии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.  
Кичангина Т. М., ассистент каф. урологии, лучевой диагностики и терапии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.  
Ярешко Н. А., канд. мед. наук, доцент каф. хирургии и анестезиологии ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.  
Джос И. П., ассистент каф. урологии, лучевой диагностики и терапии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

### Відомості про авторів:

Туманська Н. В., канд. мед. наук, доцент каф. урології, променевої діагностики та терапії, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Клименко А. В., д-р мед. наук, професор каф. факультетської хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Кичангіна Т. М., асистент каф. урології, променевої діагностики та терапії, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Ярешко Н. О., канд. мед. наук, доцент каф. хірургії та анестезіології ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.  
Джос І. П., асистент каф. урології, променевої діагностики та терапії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

### Information about authors:

Tumanskaya N. V., MD, PhD, Associate Professor, Department of Urology, Radiologic Diagnostics and Therapy, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Klymenko A. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Faculty Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Kichangina T. M., Assistant, Department of Urology, Radiologic Diagnostics and Therapy, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Yareshko N. A., MD, PhD, Associate Professor, Department of Surgery and Anesthesiology of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.  
Dzhos I. P., Assistant, Department of Urology, Radiologic Diagnostics and Therapy, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 03.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 17.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 01.06.2017

# Topicality of the problem of combined course of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis with diabetes mellitus

O. M. Raznatovska<sup>1</sup>, Yu. M. Bobrovnycha-Dvizova<sup>1</sup>, S. B. Norejko<sup>2</sup>, N. A. Gricova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, <sup>2</sup>Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine,

<sup>3</sup>Shupik National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine

## Key words:

multidrug-resistant tuberculosis, pulmonary tuberculosis, diabetes mellitus.

## Pathologia

2017; 14 (2), 236–240

## DOI:

10.14739/2310-1237.2017.2.109676

## E-mail:

raznatovskaya@gmail.com

According to the World Health Organization, today in the world among the infectious chronic diseases one of the leading places and causes of death is multi-drug resistant tuberculosis of the lungs, and chronic non-communicable diseases – diabetes mellitus. The situation is complicated by the fact that the number of patients with combined course of these two heavy separate illnesses that complicate each other increases. It is established that with increasing severity of diabetes mellitus, tuberculosis process in the lungs becomes more complicate and deteriorates, and vice versa, the specific process complicates the course of diabetes mellitus, contributing to the development of diabetic complications. Against this background, the effectiveness of treatment of patients suffering from multi-drug resistant tuberculosis of the lungs in our country remains very low, mainly due to the toxic adverse reactions to antimycobacterial drugs of the reserve line, and in the case of adding diabetes mellitus, it deteriorates even more.

**The aim of this study** was to review the scientific literature to determine the relevance of the study of combined course of multi-drug resistant tuberculosis of the lungs with diabetes mellitus and perspectives of innovative methods of diagnosis of diabetes mellitus. Early diagnosis of pre-diabetes, and autoimmune diseases will allow the use of timely correction techniques that prevents the development of diabetes mellitus, depending on its type, and in the future the development of serious irreversible processes, allow timely applying appropriate methods of correction of the revealed violations.

**Results.** Very little amount of work is dedicated to the problem of combined course of multi-drug resistant tuberculosis of the lungs with diabetes mellitus, regardless of its type, the theme is relevant for today, in Ukraine there are no data regarding its study. This combined course of very difficult in the treatment diseases requires not only timely and early diagnosis of autoimmune diseases associated with diabetes mellitus type 1 and pre-diabetes, but also additional complex combined therapy.

## Ключові слова:

мультирезистентний туберкульоз легень, цукровий діабет.

## Патологія. – 2017. –

Т. 14, № 2(40). –

С. 236–240

## Актуальність проблеми поєднаного перебігу мультирезистентного туберкульозу легень із цукровим діабетом

О. М. Разнатовська, Ю. М. Бобровнича-Двізова, С. Б. Норе́йко, Н. А. Грицова

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), сьогодні в усьому світі серед інфекційних хронічних захворювань одне з провідних місць і причин смерті посідає мультирезистентний туберкульоз легень, а неінфекційних хронічних захворювань – цукровий діабет. Ситуація ускладнюється тим, що збільшується кількість пацієнтів із поєднаним перебігом цих двох тяжких поокремо захворювань, які ускладнюють одне одного. Так, встановлено, що під час збільшення ступеня тяжкості цукрового діабету ускладнюється та стає важчим перебіг туберкульозного процесу в легенях, і, навпаки, специфічний процес ускладнює перебіг цукрового діабету, сприяючи розвитку діабетичних ускладнень. На цьому тлі ефективність лікування хворих на мультирезистентний туберкульоз легень у нашій країні залишається дуже низькою, переважно внаслідок токсичних побічних реакцій на антимікобактеріальні препарати резервного ряду, а при приєднанні ще й цукрового діабету вона значуще погіршується.

**Мета роботи** – огляд наукової літератури щодо встановлення актуальності вивчення поєднаного перебігу мультирезистентного туберкульозу легень із цукровим діабетом і перспектив інноваційних методів діагностики цукрового діабету. Встановлено, що рання діагностика предіабету й аутоімунних захворювань дасть можливість застосувати своєчасні методи корекції, що запобігатиме розвитку цукрового діабету залежно від його типу, а надалі – тяжких незворотних процесів, своєчасно застосувати відповідні методи корекції виявлених порушень.

**Висновки.** Проблемі поєднаного перебігу мультирезистентного туберкульозу легень із цукровим діабетом (незалежно від його типу) присвячено дуже мало робіт, тому тема є актуальною сьогодні, а в Україні відсутні дані щодо її вивчення. Такий поєднаний перебіг дуже складних у лікуванні захворювань потребує не тільки своєчасної та ранньої діагностики аутоімунних захворювань, що асоційовані з цукровим діабетом 1 типу, та предіабету, але й додаткової складної комплексної терапії.

## Ключевые слова:

мультирезистентный туберкулёз лёгких, сахарный диабет.

## Патология. – 2017. –

Т. 14, № 2(40). –

С. 236–240

## Актуальность проблемы сочетанного течения мультирезистентного туберкулёза лёгких с сахарным диабетом

Е. Н. Разнатовская, Ю. М. Бобровнича-Двізова, С. Б. Норе́йко, Н. А. Грицова

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), сегодня во всём мире среди инфекционных хронических заболеваний одно из ведущих мест и причин смерти занимает мультирезистентный туберкулёз лёгких, а неинфекционных хронических заболеваний – сахарный диабет. Ситуация осложняется тем, что увеличивается количество пациентов с сочетанным течением этих двух тяжёлых по отдельности заболеваний, которые усложняют друг друга. Так, установлено,

что при увеличении степени тяжести сахарного диабета осложняется и утяжеляется течение туберкулёзного процесса в лёгких, и, наоборот, специфический процесс осложняет течение сахарного диабета, способствуя развитию диабетических осложнений. На этом фоне эффективность лечения больных мультирезистентным туберкулёзом лёгких в нашей стране остаётся очень низкой, преимущественно за счёт токсических побочных реакций на антимикобактериальные препараты резервного ряда, а при присоединении ещё и сахарного диабета она значительно ухудшается.

**Цель работы** – обзор научной литературы на предмет установления актуальности изучения сочетанного течения мультирезистентного туберкулёза лёгких с сахарным диабетом и перспектив инновационных методов диагностики сахарного диабета. Установлено, что ранняя диагностика предиабета и аутоиммунных заболеваний позволит применить своевременные методы коррекции, предупредить развитие сахарного диабета в зависимости от его типа и в дальнейшем – тяжёлых необратимых процессов, своевременно применить соответствующие методы коррекции выявленных нарушений.

**Выводы.** Проблеме сочетанного течения мультирезистентного туберкулёза лёгких с сахарным диабетом независимо от его типа посвящено очень мало работ, тема на сегодня актуальная, а в Украине отсутствуют данные о её изучении. Такое сочетанное течение очень сложных в лечении заболеваний требует не только своевременной и ранней диагностики аутоиммунных заболеваний, ассоциированных с сахарным диабетом 1 типа, и предиабета, но и дополнительной сложной комплексной терапии.

According to the World Health Organization (WHO), today in the world among the infectious chronic diseases one of the leading places and causes of death is multi-drug resistant tuberculosis (MDRTB) of the lungs, and chronic non-communicable diseases – diabetes mellitus (DM) [22,23]. The situation is complicated by the fact that the number of patients with combined course of these two heavy separate illnesses that complicate each other increases. It is established that with increasing severity of diabetes mellitus, tuberculosis process in the lungs becomes more complicate and deteriorates, and vice versa, the specific process complicates the course of diabetes mellitus, contributing to the development of diabetic complications [1–3]. Against this background, the effectiveness of treatment of patients suffering from MDRTB of the lungs in our country remains very low, mainly due to the toxic adverse reactions to antimycobacterial drugs of the reserve line, and in the case of adding diabetes mellitus, it deteriorates even more.

Therefore, **the aim of this study** was to review the scientific literature to determine the relevance of the study of combined course of MDRTB of the lungs with DM and perspectives of innovative methods of diagnosis of DM.

DM is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycaemia which is a consequence of defects in insulin secretion, its action or both these factors [4,5]. DM type 1 is insulin dependent disease developing primarily in childhood and characterized by hyperglycaemia, if it is left untreated, and subsequent high risk are vascular disorders usually developing over decades. DM type 2 is a disease predominantly of slow start, mainly found in adults and associated with signs of metabolic syndrome. It has a very high risk of vascular diseases. Although it is not insulin dependent, many patients with this condition will eventually require insulin therapy to control optimal blood glucose level.

In patients suffering from DM tuberculosis is diagnosed 5 times more often in persons of young working age than in general among the population. Therefore, the DM is referred to the group of risk on tuberculosis disease [6].

At the preliminary analysis of the literature, we found out that in case of tuberculosis of the lungs with retained sensitivity of mycobacteria of tuberculosis (MBT), the characteristics of diabetes depending on type, are [1]:

1. For DM type 1: at mild and medium-severe course – limited forms of the specific process without degradation, and for heavy one – common clinical forms with a expressed

exudative component and the rapid development of caseous (tyroid) necrosis.

2. DM type 2 develops mainly in patients with recurrent tuberculosis cases and is characterized by asymptomatic course and slow progression.

In the literature it was found only a few scientific works devoted to studying features of state and effectiveness of treatment of MDRT of the lungs, including with extended MBT resistance (ERTB), in patients with different types of DM. Thus, O. G. Komissarova et al. (2013, 2015) [7,8] found out that in patients with DM type 1, MDRTB of the lungs develops in 5–10 years and is characterized by severe tuberculous intoxication, a common specific destructive (100 %) infiltrative process in the lungs with the prevalence of cavities up to 2 cm in diameter. In this case the patients were mostly aged from 19 to 29 years. In patients with DM type 2, on the contrary, MRTB of the lungs develops mainly in the first 4 years after the diagnosis of DM, the patients are primarily older than 50 years, and the specific process in the lungs is characterized by a predominance of fibro-cavernous forms with cavities of more than 4 cm in diameter on the background of moderately expressed tuberculous intoxication. In the patients with both types of DM in the early antimycobacterial treatment, decompensation of carbohydrate metabolism is defined, correction of which was held with insular therapy in both groups. The authors additionally used also a variety of pathogenic agents (angioprotectors, heparin and drugs to eliminate side reactions due to the action of antimycobacterial therapy), symptomatic treatment, plasmapheresis, laser- and collapsotherapy. However, against such a massive complex treatment, the authors determine that the effectiveness of therapy in terms of cessation of bacterial excretion was not significantly different depending on the type of DM and accounted for 67–75 %, and according to the healing time, degradation was significantly faster for 1 month in patients with combined course of DM type 1, due to the young age of patients and the nature of the specific process in the lungs.

Thus, in the case of pulmonary tuberculosis with preserved sensitivity, a concomitant DM type 1 has an aggressive character, and DM type 2 has more favourable course due to the following factors. According to the aetiology of the classification of DM by WHO [21], DM type 1 is characterized by the destruction of  $\beta$ -cells leading to absolute insulin deficiency, and DM type 2 – from predominant insulin resistance with relative insulin deficiency to pre-

dominant secretory defect with insulin resistance or without it. It means that on the basis of DM type 2 there is insulin resistance on the background of preserved ability of  $\beta$ -cells to secrete insulin. After all, the complex treatment of patients with combined course of MDRTB of the lungs and DM, which includes the correction of carbohydrate metabolism and diversity of additional pathogenetic and symptomatic drugs against the background of antimycobacterial therapy is more effective in the case of combination with DM type 1, despite its aggressiveness.

As it is known, insulin is a major regulator of carbohydrate, lipid and protein metabolisms in the body. With insufficient insulin, glycogenolysis stimulates in the liver, thereby hyperglycemia develops. The latter, in turn, causes glycosylation of proteins and lipids with the formation of end products.

According to V. N. Titov and Yu. K. Shyryaeva (2011) [9], one of the negative consequences of hyperglycemia is the development of systemic inflammatory response syndrome of the organism, which is strongly marked in patients suffering from pulmonary tuberculosis even without concomitant DM.

After the review of the scientific literature on pathophysiological factors of the adverse effects of DM on the course of pulmonary tuberculosis, O. G. Kaminskaya and R. Yu. Abdullayev (2014) [10] in their scientific article concluded that today established relevance of hyperglycaemia in the development of DM is unquestionable, as it facilitates the launch of a number of the adverse pathophysiological mechanisms which are interrelated and exacerbate each other – it is called oxidative stress, chronic vasculitis, progressive atherogenesis, angiopathy, hypercoagulability syndrome. The majority of these mechanisms are associated with pulmonary tuberculosis.

Today the importance of the definition of prediabetes which involves disorders of carbohydrate metabolism: impaired glucose tolerance (per-oral glucose tolerance test (2 hours after taking 75 g of glucose)  $\geq 7.8$  mmol/l), impaired fasting glycemia (level of glucose in plasma of venous blood  $\geq 6.1$  mmol/l and  $< 7$  mmol/l) [4, 11].

Insulin resistance is one of the links in the genesis of disorders of glucose tolerance and is determined by the disruption of normal transmission of insulin on insulin-dependent cells [10]. It has been proven and substantiated that insulin resistance against the normal insulin level together with periodic hyperglycaemia are factors of stimulation of  $\beta$ -cell function insular apparatus of the pancreas and its depletion [12].

Therefore, the deterioration of insulin secretion and insulin resistance are the trigger mechanisms for the development of DM type 2 and pre-diabetes is the initial stage of it.

T. V. Smurova and S. I. Kovaliova (2007) [13] indicate that violations of all types of metabolism in patients suffering from DM type 2 lead to the accumulation of a large number of substances which stimulate the development of MBT. Ketosis is a cause of infringement of oxidative processes in the body, disruption of phagocytic activity of alveolar macrophages, inhibition of phagocytosis, etc.

It was established experimentally that the progression of tuberculosis correlates with a decrease in the mass of the pancreas and the number of  $\beta$ -cells in its insular apparatus and specific process without DM is accompanied by hyperinsulinemia [10].

Thus, the infectious process in the insolvency of the insular apparatus can provoke disturbance of carbohydrate metabolism, and the more widespread is the infection, the greater are insulin requirements [1]. Therefore, in the case of specific endogenous intoxication in patients with pulmonary tuberculosis, increased need for insulin is one of the first diagnostic signs of the presence of DM.

Combined course of tuberculosis and DM causes profound disruptions of the immune system by stimulating humoral immunity which is the cause of progression of the specific process [13].

G. G. Bayburina (2011) [14] conducted a study of immunological markers of DM in patients on newly diagnosed DM, depending on its type: antibodies to insulin and proinsulin (IAA-insulin autoantibodies, AB-IAA), antibodies to glutamate decarboxylase (GAD-glutamic acid decarboxylase autoantibodies, AB-GAD), antibodies to cytoplasmic antigen of  $\beta$ -cells (ICA-islet-cell antibodies, AB-ICA). These studies were carried out to establish their association with clinical symptoms, indicators of functional activity of  $\beta$ -cells of the pancreas (level of basal C-peptide and fasting insulin) and indicators of lipid profile (total cholesterol,  $\alpha$ -cholesterol, triglycerides, calculation of atherogenic coefficient). The researcher found out that among patients with DM type 1, immunopositive were 93.8 % of patients aged to 30 years and 68.6 % – in the age category of 31–50 years. The most significant and reliable indicators among the immunological markers were high titres of AB-GAD and AB-ICA. Thus, against the background of expressed clinical picture of DM, increasing of titre of immunological markers and decreasing in the level of basal C-peptide, indicators of lipid spectrum and body mass index remained in the normal range. DM type 2 was characterized by the following: immunopositive were 47.5 % of patients (due to the growth of titres AB-IAA and AB-GAD) against the background of normal values of indicators of the functional activity of  $\beta$ -cell of the pancreas and elevated levels of the lipid spectrum (total cholesterol and triglycerides). A direct correlation between all indicators of immunological markers with atherogenic coefficient was established; it allowed making conclusion about the dependence of immunological disorders with a state of fat metabolism. For DM type 2 a characteristic feature is the tendency to develop cardiovascular complications.

Thus, diabetes without concomitant TB, depending on the type of the following is true. For type 1: marked clinical manifestations associated with a predominant increase in titres of at-GAD and al-ISA and the decrease in the level of basal C-peptide. For type 2 – the growth of credits at IAA and at-GAD, levels of the lipid spectrum (total cholesterol and triglycerides) and body mass index between which there is a direct correlation, the tendency to develop cardiovascular complications. However, in literature any works have found on similar studies in the case of co-morbid course of MDRTB of the lungs and DM.

The analysis of literary sources showed that researches all around the world regarding the diagnosis and treatment of DM with different types do not tread water. In 2011 innovations in the diagnosis of MD was the fact that WHO adopted the diagnostic levels of glycosylated (glycated) hemoglobin (Hb) to arrive at diagnosis of DM. Thus, the level of HbA1c  $< 5.7$  % is a norm, at its level between 5.7–6.4 % – the risk of developing DM and  $>$  at its level  $> 6.5$  % – they arrive

to diagnosis of DM [15,22]. This approach allows not only the early diagnose of diabetes, but also to promptly apply preventive measures in high-risk groups, preventing the development of this severe disease.

In levels of glycosylated Hb, blood glucose and glycosuria there are three levels of violation of carbohydrate metabolism [15,23]:

1. Compensated: the level of glycosylated Hb from 6 to 7 %, fasting glucose up to 6 mmol/l and after meals up to 8 mmol/l in the absence of glycosuria.

2. Sub-compensated: the level of glycosylated Hb from 7.1 to 7.5 %, fasting glucose from 6.1 to 6.5 mmol/l and after meals from 8.1 to 9 mmol/l, glycosuria (+).

3. Decompensated: the level of glycosylated Hb above 7.5 %, fasting glucose above 6.5 mmol/l and after meals above 9 mmol/l, glycosuria (+++).

Molecular genetic methods of diagnostics allow timely and quickly detecting different variants of DM that require different kinds of treatment. Thus, V. E. Tytovych et al. (2010) [16] as a result of 11 years of research of contributory and protective gal types (HLA-DRB1, DQ genes) in combination with immunological markers (AB-ICA, AB-IAA and AB-GAD) found the risk of developing DM type 1 which suggests that the presence in healthy sibs DQ-2, DQ-8 of gal types predicts a high risk of its development. And among those who have already got sick with DM type 1 in the initial stages, a high titre of all immunological markers revealed. Therefore, the researchers came to the following conclusion that the assessment of the risk of developing DM type 1 on the basis of molecular-genetic and monitoring of immunological markers is a stage in the development of preventive measures aimed at prevention of the development of the disease.

Today it is found out that one-third of cases of DM type 1 is accompanied by other endocrine and not endocrine autoimmune diseases that influence the degree of its compensation [17]. It is established that on the basis of most autoimmune diseases is the violation of T-cell immunity, which leads to destruction of tissue, atrophy of the organ and reduction of hormone production. The leading place among these diseases is autoimmune thyroiditis (up to 30 % of cases), followed by frequency of development by autoimmune gastritis and/or pernicious anaemia (up to 10 % of cases) [24] and autoimmune hepatitis [18]. Therefore, for early diagnosis of these concomitant autoimmune diseases, the change of which precedes the development of clinical signs, the study of AT is relevant: at autoimmune thyroiditis to thyroperoxide (TPO) and receptor of thyrotropic hormone (rTTH), autoimmune gastritis – AB to parietal cells of the stomach (PCS), autoimmune hepatitis – anti smooth muscle AB (ASMA) and antinuclear AB (ANA).

Today it is found that one-third of cases of type 1 diabetes is accompanied by other endocrine and not endocrine autoimmune diseases that influence the degree of compensation [17]. It is established that at the root of most autoimmune diseases is the violation of T-cell immunity, which leads to destruction of tissue, atrophy of the organ and reduction of hormone production. The leading place among these diseases is autoimmune thyroiditis (up to 30 % of cases), followed by frequency of development are autoimmune gastritis and/or pernicious anaemia (up to 10 % of cases) [24] and autoimmune hepatitis [18]. Therefore, for early diagnosis

of these concomitant autoimmune diseases, which change precedes the development of clinical manifestations relevant is the study of AO: autoimmune treated to triperoxide (TPO) receptor and thyrotropic hormone (rTTH), autoimmune gastritis – antibody to parietal cells of the stomach (PCA), autoimmune hepatitis – antipodal Azov AO (AGMA) and antinuclear (ANA).

It was found out that patients in the initial stages of DM type 1 with the growth of titre AB-GAD, AB TPO are detected [17], while the function of the thyroid gland is not violated. M. Prazny et al. (2005) [25] indicate that excess production of thyroid hormones leads to impairment of glucose uptake and acceleration of gluconeogenesis and glycogenolysis in the liver, and this leads to the development of insulin resistance. K. Vondra et al. (2005) [26] found out that hyperthyreosis in patients with DM type 1 is a cause for the development of ketoacidosis.

V. V. Fadeyev et al. (2006) [19] conducted studies and recommend using determination of the level of the titre rTTH by the method of radio-receptor assay in clinical practice for the diagnosis of autoimmune thyroiditis.

In the literature some works were found devoted to the study of thyroid pathology in patients with pulmonary tuberculosis in Ukraine. Thus, S. L. Matveyeva (2017) [20] in order to diagnose autoimmune thyroiditis was studying the levels of free thyroxin (v. T4), AB rTTH, AB to thyroglobulin (AB TG) and AB TPO. According to the data obtained she established that in patients suffering from pulmonary tuberculosis with concomitant DM in 66.67 % of cases autoimmune thyroiditis with symptoms of subclinical hypothyroidism is diagnosed, which negatively affects both the clinical course of tuberculosis, and the result of antimycobacterial treatment.

Thus, early diagnosis of pre-diabetes, and autoimmune diseases will allow the use of timely correction techniques that prevents the development of DM, depending on its type, and in the future the development of serious irreversible processes, allow timely applying appropriate methods of correction of the revealed violations.

## Conclusions

1. Very little amount of work is dedicated to the problem of combined course of MDRTB of the lungs with DM, regardless of its type, the theme is relevant for today, in Ukraine there are no data regarding its study.

2. This combined course of very difficult in the treatment diseases requires not only timely and early diagnosis of autoimmune diseases associated with DM type 1 and pre-diabetes, but also additional complex combined therapy.

**Prospects for further scientific researches.** Further study of pathophysiological, biochemical and immunological disorders in the case of co-morbid course of MDRTB of the lungs with DM, improving the corrective therapy, the development of ways to prevent the development of DM in patients suffering from MDRTB of the lungs with the presence of risk factors, etc.

## References

- [1] Shalmin, A. S., Raznatovskaya, E. N., Bobrovnichaya-Dvizova, Yu. M., Dvizov, A. V., Mulyar, N. V., & Fedchenko, T. S. (2012). Osobennosti sochetannogo techeniya tuberkuleza legkikh i sakharnogo diabeta [Features of the combined flow of pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus]. *Pathologia*, 1(24). 92–94. [in Russian].

- [2] Komissarova, O. G. (2012). Tuberkulez u bol'nykh sakharnym diabetom. [Tuberculosis in patients with diabetes mellitus]. *Tuberkulez i bolezni legkikh*, 11, 3–7. [in Russian].
- [3] Papanova, E. L., Odinec, V. S., Zadremajlova, T. A., Vasilenko, T. I., & Akinina, S. A. (2015). Vliyanie rannego vyvleniya tuberkuleza organov dykhaniya u bol'nykh sakharnym diabetom na e'fektivnost' lecheniya v Stavropol'skom krae [Influence of Early Detection of Respiratory Tuberculosis in Patients with Diabetes Mellitus on the Effectiveness of Treatment in the Stavropol Territory]. *Tuberkulez i bolezni legkikh*, 7, 109–110. [in Russian].
- [4] Ministerstvo okhorony zdorov'ia Ukrainy (2012). Unifikovanyi klinichnyi protokol pervynnoi ta vtorynnoi (spetsializovanoi) medychnoi dopomohy. Tskrovoyi diabet 2 typu [Unified clinical protocol of primary and secondary (specialized) medical care. Type 2 diabetes mellitus]. Kyiv [in Ukrainian].
- [5] Dedov, I. I. (2012). Sakharnyj diabet – opasnejshij vyzov mirovomu sobobshchestvu. [Diabetes mellitus — a dangerous treat to the mankind]. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*, 67(1), 7–13. [in Russian]. doi: 10.15690/vramn.v67i1.103.
- [6] Sirenko, I. A., Levchenko, E. A., Sukhanova, L. A., & Marchenko, O. Yu. (2016). Problema tuberkuleza i sakharnogo diabeta [Tuberculosis and diabetes problem]. *Tuberkuloz, lehenevi khvoroby, VIL-infektsiia*, 4(27), 54–59. [in Ukrainian].
- [7] Komissarova, O. G., Kossij, Yu. E., Abdullaev, R. Yu., Moiseeva, S. V., & Vasilyeva, I. A. (2013). Osobennosti tehnicheskoi i e'fektivnosti lecheniya tuberkuleza legkikh s mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivost'yu vzbuditelja u bol'nykh s raznymi tipami sakharnogo diabeta [Features of the course and efficacy of treatment of pulmonary tuberculosis with multiple drug-resistant pathogens in patients with different types of diabetes mellitus]. *Tuberkul'joz i bolezni legkikh*, 90(3), 010–014. [in Russian].
- [8] Komissarova, O. G., Konyayeva, O. O., Berezhnaya, O. O., Abdullaev, R. Yu., & Vasilyeva, I. A. (2015). E'fektivnost' lecheniya bol'nykh tuberkulezom legkikh s mnozhestvennoj i shirokoj lekarstvennoj ustojchivost'yu vzbuditelja v sochetanii s raznymi tipami sakharnogo diabeta [Efficacy of Treatment of Patients with Multiple and Extensively Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis Combined with Different Types of Diabetes Mellitus]. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 3, 33–37. [in Russian].
- [9] Titov, V. N., & Shiryaeva, Yu. K. (2011). Glyukoza, glikotoksiny i produkty glikirovaniya, uchastie v patogeneze mikroangiopatij, arterioskleroza i ateroskleroza [Glucose, glycotoxins and glycation products, participation in pathogenesis by microangiopathy, arteriosclerosis and atherosclerosis]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 11, 3–13. [in Russian].
- [10] Kaminskaya, G. O., & Abdullaev, R. Y. (2014). Patofiziologicheskie predpysylki neblagopriyatnogo vliyaniya sakharnogo diabeta na tehnicheskoe tuberkuleza legkikh. [Pathophysiological prerequisites for the negative impact of diabetes mellitus on the course of pulmonary tuberculosis]. *Tuberkul'joz i bolezni legkikh*, 9(3), 5–11. [in Russian]. doi: http://dx.doi.org/10.21292/2075-1230-2014-0-3-5-11.
- [11] Kaminskii, A. V. (2012). Sakharnyj diabet. Chast' 1. Neprostrye voprosy diagnostiki. [Sugar dyabet Part 1. Noprostrye Questions diagnosis]. *Mezhdunarodnyj e'ndokrinologicheskij zhurnal*, 3(43), 43–47. [in Russian].
- [12] Glinkina, I. V. (2012). Svoevremennoe nachalo insulinoterapii pri sakharnom diabete tipa 2: patogeneticheskoe i klinicheskoe obosnovanie [Timely initiation of insulin therapy for type 2 diabetes mellitus: pathogenetic and clinical justification]. *Consilium medicum*, 14(12), 10–15. [in Russian].
- [13] Smurova, T. V., & Kovaleva, S. I. (2007). *Tuberkulez i sakharnyj diabet. [Tuberculosis and diabetes mellitus]*. Moscow: Medkniga. [in Russian].
- [14] Baiburina, G. G. (2011). Immunologicheskie markery sakharnogo diabeta pri razlichnykh klinicheskikh tipakh zaboлевaniya [Immunological markers of diabetes mellitus in various clinical variants of the disorder]. *Medicinskaya immunologiya*, 13(6), 623–626. [in Russian]. doi: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2011-6-623-626.
- [15] Dedov, I. I., Balabolkin, M. I., Klebanova, E. M., Kreminskaya, V. M., & Chazova, T. E. (2003). *Sakharnyj diabet: patogenez, klassifikaciya, diagnostika i lechenie [Diabetes mellitus: pathogenesis, classification, diagnosis and treatment]*. Moscow. [in Russian].
- [16] Titovich, E. V., Kuraeva, T. L., Prokofiev, S. A., Peterkova, V. A., & Dedov, I. I. (2010). HLA-galotipy, autoantitela k  $\beta$ -kletkam: rol' v prognozirovani sakharnogo diabeta 1 tipa (rezul'taty 11-letnego nablyudeniya) [HLA-haplotypes, anti- $\beta$  cell antibodies: their role in prognostication of type 1 diabetes mellitus (results of 11-year observation)]. *Sakharnyj diabet*, 13(4), 12–17. [in Russian]. doi: http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-6051.
- [17] Larina, A. A., & Troshina, E. A. (2013). Autoimmunnye zaboлевaniya, assotsirovannye s sakharnym diabetom 1-go tipa: vozmozhnoe vzaimovliyanie [Autoimmune diseases associated with type 1 diabetes mellitus: possible interplay]. *Problemy e'ndokrinologii*, 59(1), 35–43. [in Russian].
- [18] Derevyanko, O. S., Dalantaeva, N. S., Ivanova, O. N., Goncharov, N. P., Nikonova, T. V., & Smirnova, O. M. (2014). Markery autoimmunnogo porazheniya pecheni u pacientov s sakharnym diabetom 1 tipa [Markers for hepatic autoimmune disorders in patients with type 1 diabetes mellitus]. *Sakharnyj diabet*, 1, 29–33. [in Russian]. doi: 10.14341/DM2014129-33.
- [19] Fadeyev, V., Abramova, N., Gitel, E., Pauncovic, N., Pauncovic, J., Prokofyev, S., & Melnichenko, G. (2006). Diagnosticheskoe znachenie opredeleniya urovnya antitel k receptoru tireotropnogo gormona metodami 1-go i 2-go pokolenij [Diagnostic Value of the First and Second Generation of Thyrotropin Receptor Antibodies in Clinical Practice]. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*, 2(2), 48–55. [in Russian].
- [20] Matveyeva, S. L. (2017). Vliyanie strukturno-funkcional'nykh izmenenij shhitovidnoj zhelezy na klinicheskoe tehnicheskoe tuberkuleza i iskhody khimioterapii pri soputstvuyushhem sakharnom diabete [The effect of structural and functional changes in the thyroid gland on the clinical course of tuberculosis and the outcome of chemotherapy with concomitant diabetes mellitus]. *Tuberkuloz, lehenevi khvoroby, VIL-infektsiia*, 1(28), 54–59. [in Russian].
- [21] WHO. (2015). Global Tuberculosis Report 2015 Retrieved from [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf).
- [22] World Health Organization. (2011). Use of glycated hemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Abbreviated report of a WHO consultation. World Health Organization (WHO/NMH/CHP/CPM/11.1).
- [23] World Health Organization. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva.
- [24] Van den Driessche, A., Eenkhoorn, V., Gaal, L., & Block, C. (2009). Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Netherlands J Med*, 67(11), 376–387.
- [25] Prázný, M., Skrha, J., Limanová, Z., Vaníčková, Z., Hilgertová, J., Prázná, J., et al. (2005). Screening for Associated Autoimmunity in Type 1 Diabetes Mellitus With Respect To Diabetes Control. *Physiol Res*, 54, 41–48.
- [26] Vondra, K., Vrbíková, J., & Dvoráková, K. (2005). Thyroid gland diseases in adult patients with diabetes mellitus. *Minerva Endocrinol*, 30(4), 217–236.

#### Information about authors:

Raznatovska O. M., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Phthysiology and Pulmonology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Bobrovnycha-Dvizova Yu. M., Assistant of the Department of Phthysiology and Pulmonology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Norejko S. B., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Phthysiology and Pulmonology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Gricova N. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Phthysiology and Pulmonology, Shupik National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine.

#### Відомості про авторів:

Разнатовська О. М., д-р мед. наук, доцент, професор каф. фізіатрії та пульмонології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Бобровнича-Двізова Ю. М., асистент каф. фізіатрії та пульмонології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Норейко С. Б., д-р мед. наук, доцент, професор каф. фізіатрії та пульмонології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Грицова Н. А., канд. мед. наук, доцент каф. фізіатрії та пульмонології, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ, Україна.

#### Сведения об авторах:

Разнатовская Е. Н., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. физиатрии и пульмонологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Бобровнича-Двицова Ю. М., ассистент каф. физиатрии и пульмонологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Норейко С. Б., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. физиатрии и пульмонологии, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.

Грицова Н. А., канд. мед. наук, доцент каф. физиатрии и пульмонологии, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, г. Киев, Украина.

#### Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 17.05.2017

Після доопрацювання / Revised: 24.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 01.06.2017