

Патологія



Том 15, № 1(42), січень – квітень 2018 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, РФ)
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. Катурський (Москва, РФ)
проф. О.М. Камишний (Запоріжжя)
проф. М.О. Клименко (Миколаїв)
проф. Джордж Контогеорго (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 15 No. 1 January – April 2018

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

© Патологія, 2018

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. Kolesnyk (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. Gavrish (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
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



Рекомендовано до друку
Вченою радою ЗДМУ
протокол № 9 від 17.04.2018 р.
Підписано до друку
24.04.2018 р.

Редакція:
Начальник редакційно-
видавничого відділу
В.М. Миклашевський
Літературний редактор
О.С. Савеленко
Технічний редактор
Ю.В. Полупан

Адреса редакції і видавця:
69035, Україна,
м. Запоріжжя,
пр. Маяковського, 26, ЗДМУ,
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 60x841/8.
© Папір крейдяний,
безкислотний,
Умов. друк. арк. 6.
Тираж 200 прим.
Зам. № 4/18.

Оригінальні дослідження

Колесник Ю. М., Камишний О. М., Гавриленко М. А.

Зміни експресії мРНК TLR 2 і 4 типу, ядерного фактора κB і прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A епітелієм ротової порожнини у дітей з особливими потребами

Букіна Ю. В., Варинський Б. О., Войтович О. В., Коваль Г. Д., Каплаушенко А. Г., Камишний О. М.

Визначення нейтрофілних позаклітинних пасток і концентрації коротколанцюгових жирних кислот при сальмонела-індукованому запаленні кишечника на тлі введення ванкомицину та *Bacteroides fragilis*

Туманський В. А., Фень С. В.

Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом

Лоскутова Т. О.

Поліморфізм генів системи гемостазу, ендотеліальної дисфункції та регуляції артеріального тиску у вагітних із преєклампсією та затримкою розвитку плода

Шелестова Л. П., Радченко Н. М.

Перебіг вагітності та її завершення в жінок із дифузним нетоксичним зобом

Воронцова Л. Л., Дуб М. І., Коваленко В. А.

Стан клітинної ланки вродженого імунітету в інфертильних чоловіків на тлі токсокарозної інвазії

Рябокоть Ю. Ю., Туманський В. О., Рябокоть О. В.

Взаємозв'язки морфологічних змін у печінці з розвитком позапечінкових проявів у хворих на хронічний гепатит С

Шишкін М. А.

Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы

Яременко Л. М., Грабовий О. М., Бідна Л. П., Шепелєв С. Є., Груша М. М.

Експресія білка NF-L в сенсомоторній корі при моделюванні транзиторної ішемії на тлі сенсibiлізації мозковим антигеном та імунокорекції змін, що виникли

Муквіч О. М., Задорожна Т. Д., Лавренчук О. В., Арчакова Т. М.

Патоморфологічні особливості хронічних гастроудоденітів у дітей із дисплазією сполучної тканини

Процюк Т. Л., Герасимова О. В., Процюк Л. О., Суркова Н. М.

Особливості перебігу бронхіальної астми на тлі метаболічного синдрому в дітей із різними фенотипами залежно від показників вітаміну D₃

Гайда І. М., Бадюк М. І., Сушко Ю. І.

Особливості структури та перебігу сучасної бойової травми у військовослужбовців Збройних Сил України

Разнатовська О. М., Хлиствун В. М.

Діагностика порушень мукоциліарного транспорту у хворих на хіміорезистентний туберкульоз легень із супутньою патологією слизової оболонки бронхів

Original research

Kolesnyk Yu. M., Kamyshnyi O. M., Gavrilenko M. A.

Changes in the expression of mRNA TLR2 and 4 type, nuclear factor κB and pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-17A in the epithelium of the oral cavity in children with special needs

Bukina Yu. V., Varynskyi B. O., Voitovich A. V., Koval G. D., Kaplaushenko A. G., Kamyshnyi O. M.

The definition of neutrophil extracellular traps and the concentration of short-chain fatty acids in salmonella-induced inflammation of the intestine against the background of vancomycin and *Bacteroides fragilis*

Tumanskiy V. A., Fen' S. V.

Ductular reaction or hepatic reparative complex: immunohistochemical features in liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis

Loskutova T. O.

Polymorphism of genes of hemostasis system, endothelial dysfunction and regulation of blood pressure in pregnant woman with preeclampsia and fetal growth retardation

Shelestova L. P., Radchenko N. M.

The course of pregnancy and its result in women who have diffuse non-toxic goiter

Vorontsova L. L., Dub M. I., Kovalenko V. A.

Condition of a cellular link of innate immunity in infertile men against the background of toxocarosis invasion

Riabokon Yu. Yu., Tumanskiy V. A., Riabokon E. V.

The interaction of morphological changes in the liver with the development of extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C

Shyshkin M. A.

Molecular-immunohistochemical characteristics of proliferation and apoptosis of tumor cells in colorectal adenocarcinoma

Yaremenko L. M., Grabovoy A. N., Bidna L. P., Shepelev S. Ye., Grusha M. M.

Expression of NF-L protein in the sensorimotor cortex during the modeling of transient ischemia against the background of sensitization by brain antigen and immunocorrection of the changes

Mukvich O. M., Zadorozhnaja T. D., Lavrenchuk O. V., Archakova T. N.

Pathological and morphological properties of chronic gastroduodenitis in children with connective tissue dysplasia

Protsiuk T. L., Herasymova Ye. V., Protsiuk L. O., Surkova N. M.

The course of bronchial asthma associated with metabolic syndrome in children with different phenotypes depending on vitamin D₃ level

Gaida I. M., Badyuk M. I., Sushko Yu. I.

Peculiarities of structure and current of modern combat trauma among servicemen of the Armed Forces of Ukraine

Raznatovska O. M., Khlystun V. M.

Diagnosis of respiratory epithelial clearance abnormality in patients suffering from chemo-resistant pulmonary tuberculosis with comorbidity of bronchial mucosa

Оригінальні дослідження

Гармаш О. В., Губіна-Вакулик Г. І.

Морфофункціональний стан привушних слинних залоз тримісячних щурів при експериментально моделюваній внутрішньоутробній макросомії

Кузнєцов А. А.

Розробка мультиваріантних моделей для визначення короткострокового прогнозу в пацієнтів із геморагічним півкульовим інсультом у дебюті захворювання

Клименко В. М., Сиволап Д. В.

Предиктори подовження терміну стаціонарного перебування хворих на холецистолітаз після лапароскопічних оперативних втручань на жовчному міхурі

Лікарю-практику

Степанов Ю. М., Косинська С. В., Павленко О. В.

Ведення хворих на аутоімунні захворювання печінки на основі останніх рекомендацій EASL з урахуванням власного досвіду

Клінічний випадок

Романюк А. М., Гирявенко Н. І., Линдін М. С., Сікора В. В., Піддубний А. М.

Випадок синхронного раку маткової труби та ендометрія. Клінічне спостереження

Огляди

Ломейко О. О., Колесник Ю. М., Авраменко Н. В.

Чоловіча інфертильність в умовах великого промислового міста: роль хімічних, фізичних та емоційних факторів

Волошина І. М.

Менеджмент споживання кухонної солі при артеріальній гіпертензії (огляд літератури)

Original research

Garmash O. V., Gubina-Vakulyk G. I.

81 Morphofunctional status of parotid salivary glands in three-month-old rats with experimentally induced fetal macrosomia

Kuznietsov A. A.

88 Development of multivariate models for the verification of short-term vital and functional prognosis in patients with hemorrhagic hemispheric stroke in the onset of the disease

Klimenko V. M., Syvolap D. V.

95 Predictors of prolongation of the hospital stay in patients with cholelithiasis after laparoscopic surgical interventions on the gallbladder

For the physician practice

Stepanov Yu. M., Kosynska S. V., Pavlenko O. V.

101 Management of patients with autoimmune liver diseases on the basis of the latest EASL recommendations and our own experience

Case report

Romaniuk A. M., Giryavenko N. I., Lyndin M. S., Sikora V. V., Piddubnyi A. M.

109 The case of synchronous fallopian tube and endometrium cancer. Clinical observation

Review

Lomeiko O. O., Kolesnyk Yu. M., Avramenko N. V.

114 Male infertility in a large industrial city: the role of chemical, physical and emotional factors

Voloshyna I. M.

122 Management of table salt consumption in hypertensive patients (review)

Міжнародна індексація журналу / Indexing

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

Ulrich's Periodicals Directory (США)

WorldCat (США): http://www.worldcat.org/title/pathologia/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

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

WORLDWIDE ELIBRARY(США): <http://www.sciary.com/journal-scientific-pathologia-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&oaboo=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

CiteFactor (США): 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

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

Зміни експресії мРНК TLR 2 і 4 типу, ядерного фактора κВ і прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А епітелієм ротової порожнини у дітей з особливими потребами

Ю. М. Колесник, О. М. Камишний, М. А. Гавриленко

Запорізький державний медичний університет, Україна

Ключові слова:

діти з особливими потребами, хронічний катаральний гінгівіт, рецептори вродженого імунітету, ІЛ-1β, ІЛ-17А.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 4–9

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129332

E-mail: zpstomat@ukr.net

Мета роботи – оцінити відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А, толл-подібних рецепторів 2 і 4 типів і транскрипційного фактора NF-κВ в епітелії ротової порожнини в дітей із захворюваннями центральної нервової системи, системи крові, органів дихання та в дітей із психічними розладами.

Матеріали та методи. Виконали молекулярно-генетичне дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) експресії мРНК генів TLR2, TLR4, NF-κВ, ІЛ-1β і ІЛ-17А в епітелії ротової порожнини 93 дітей з інвалідністю та 25 дітей із хронічним катаральним гінгівітом без супутньої патології віком від 12 до 15 років.

Результати. У дітей з особливими потребами спостерігають зростання транскрипційної активності мембранних TLR2 і TLR4 в усіх групах дослідження, крім групи дітей із психічними розладами. Активація паттерн-розпізнавальних рецепторів закономірно викликає транскрипційну індукцію гена NF-κВ і прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А, що ним регулюються, буккальним епітелієм: рівні експресії мРНК ІЛ-1β і ІЛ-17А в дітей із захворюваннями ЦНС збільшувались у 8,9 і 7,7 раза ($p < 0,05$) відповідно, в дітей із психічними захворюваннями рівень ІЛ-17А підвищився у 2,2 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем, у дітей із захворюваннями дихальних шляхів і захворюваннями системи крові експресія ІЛ-1β підвищилась в 6,5 та 2,9 раза ($p < 0,05$) відповідно, ІЛ-17А – у 3,8 і 3,0 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Висновки. Виявлена транскрипційна індукція генів TLR2 і TLR4 з наступною активацією Nf-κB і продукцією прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17А є одним із механізмів, який пояснює тяжчий перебіг пародонтиту в дітей з інвалідністю порівняно з хворими на пародонтит без супутньої патології.

Ключевые слова:

дети с особыми потребностями, хронический катаральный гингивит, рецепторы врожденного иммунитета, ІЛ-1β, ІЛ-17А.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 4–9

Изменения экспрессии мРНК TLR 2 и 4 типа, ядерного фактора κВ и провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-17А эпителием ротовой полости у детей с особыми потребностями

Ю. М. Колесник, А. М. Камышный, М. А. Гавриленко

Цель работы – оценить относительный уровень мРНК провоспалительных цитокинов ІЛ-1β и ІЛ-17А, толл-подобных рецепторов 2 и 4 типов и транскрипционного фактора NF-κВ в эпителии ротовой полости у детей с заболеваниями центральной нервной системы, системы крови, органов дыхания и у детей с психическими расстройствами.

Материалы и методы. Проведено молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) экспрессии мРНК генів TLR2, TLR4, NF-κВ, ІЛ-1β і ІЛ-17А в епітелії ротової порожнини 93 дітей з інвалідністю і 25 дітей з хронічним катаральним гінгівітом без супутньої патології в віці від 12 до 15 років.

Результаты. У детей с особыми потребностями отмечен рост транскрипционной активности мембранных TLR2 и TLR4 во всех группах исследования, кроме группы детей с психическими расстройствами. Активация паттерн-распознающих рецепторов закономерно вызывает транскрипционную индукцию гена NF-κВ и регулируемых им провоспалительных цитокинов ІЛ-1β і ІЛ-17А буккальным эпителием: уровни экспрессии мРНК ІЛ-1β і ІЛ-17А у детей с заболеваниями ЦНС увеличивались в 8,9 и 7,7 раза ($p < 0,05$) соответственно, у детей с психическими заболеваниями уровень ІЛ-17А повысился в 2,2 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контролем, у детей с заболеваниями дыхательных путей и заболеваниями системы крови экспрессия ІЛ-1β повысилась в 6,5 и 2,9 раза ($p < 0,05$) соответственно, ІЛ-17А – в 3,8 и 3,0 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контролем.

Выводы. Обнаруженная транскрипционная индукция генов TLR2 и TLR4 с последующей активацией Nf-κB и продукцией провоспалительных цитокинов ІЛ-1β і ІЛ-17А является одним из механизмов, который объясняет более тяжелое течение пародонтита у детей с инвалидностью по сравнению с больными пародонтитом без сопутствующей патологии.

Key words:

child, disabled persons, gingivitis, cytokine receptor, ІЛ-1 beta, ІЛ-17А.

Pathologia 2018; 15 (1), 4–9

Changes in the expression of mRNA TLR2 and 4 type, nuclear factor κB and pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-17A in the epithelium of the oral cavity in children with special needs

Yu. M. Kolesnyk, O. M. Kamyshnyi, M. A. Gavrilenko

Objective: to assess the relative level of mRNA of proinflammatory cytokines ІЛ-1β і ІЛ-17А, toll-like receptors 2 and 4 types and the transcription factor NF-κB in the epithelium of the oral cavity in children with diseases of the central nervous system, blood system, respiratory organs, and in children with mental disorders.

Object and methods: the molecular-genetic study by polymerase chain reaction with reverse transcription real-time (RT-PCR) mRNA expression of the genes TLR2, TLR4, NF-KB, IL-1 β and IL-17A in the epithelium of the oral cavity in 93 children with disabilities and 25 children with chronic catarrhal gingivitis without associated pathology in age from 12 to 15 years.

Results. In children with special needs there is the rise of transcription activity of membrane TLR2 and TLR4 in all study groups except the group of children with mental disorders. Activation of pattern recognition receptors naturally causes transcriptional induction of the gene NF-KB and regulated by it the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-17A by the buccal epithelium: expression levels of mRNA of IL-1 β and IL-17A in children with central nervous system diseases were increased by 8.9 and 7.7 times ($P < 0.05$), respectively, in children with mental diseases the level of IL-17A was increased by 2.2 times ($P < 0.05$) in comparison with the control, in children with respiratory diseases and diseases of the blood system the expression of IL-1 β was increased by 6.5 and 2.9 times ($P < 0.05$), respectively, IL-17A – 3.8 and 3 times ($P < 0.05$) as compared to control.

Conclusions: discovered in the work transcriptional induction of the genes TLR2 and TLR4 and subsequent activation of NF-kB and production of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-17A is one of the mechanisms that explains the more severe course of periodontitis in children with disabilities as compared to patients with periodontitis and without comorbidities.

Підтримання нормального стану тканин пародонта або перехід до його ураження відбиває безперервний бій між великою кількістю аутохтонної мікробіоти в ротовій порожнині та масивом резидентних та емігруючих імунних клітин у цій ділянці [1]. Хронічний пародонтит переважно впливає на дорослих, але іноді агресивний пародонтит може виникнути в дітей, особливо в умовах порушення взаємодії коменсальної мікробіоти з імунною системою господаря на тлі низки супутніх захворювань [2]. Групою ризику розвитку хронічного пародонтиту й гінгівіту є діти з інвалідністю, котрі мають важкі захворювання центральної нервової системи, органів дихання, захворювання крові та психічні розлади [3,4]. Ці хвороби в дітей знижують загальну імунологічну реактивність організму, призводять до порушення механізмів резистентності слизової оболонки порожнини рота та спричиняють розвиток запальних процесів тканин пародонта [5]. За статистичними даними, в дітей з інвалідністю відзначається погана гігієна порожнини рота або навіть її відсутність.

Відомо, що буквальний епітелій бере участь в імунній відповіді та міжклітинних взаємодіях, секретуючи ряд цитокінів, хемокінів, ростових і гемопоетичних факторів, ейкозаноїдів, оксиду азоту [6]. Сигнальні молекули регулюють активність імунних клітин, що визначає розвиток гострих і хронічних запальних реакцій слизових оболонок. Основна роль у підтримці ініціації імунної відповіді або формуванні толерантності належить компонентам спадкового імунітету, що здатні визначати походження антигена та необхідність розвитку імунної відповіді на нього [7]. Припускаємо, що важливим тригером важчого перебігу захворювань пародонта в дітей з особливими потребами є зміни експресії мембранних толл-подібних рецепторів вродженого імунітету епітелієм ротової порожнини, зокрема TLR2 і TLR4 [8]. Із 10 TLR людини лише для 9 вірогідно відомі ліганди, серед них є не тільки структури мікроорганізмів, але й ендогенні структури – білки гострої фази запалення, фібриноген, фібронектин, гіалуронової кислоти, жирні кислоти та різноманітні алергени й фактори пошкодження [9]. TLR2 розпізнає патоген-асоційовані молекулярні паттерни (PAMP) бактерій, грибів, вірусів і паразитів, які мають у своєму складі ліпопротеїди, ліпотейхоєві кислоти, пептидоглікан, ліпоарабіноманнан, зимозан, хітин, гемаглютиніни, порини, глікоінозитолфосфоліпіди [10], а основним лігандом TLR4 є ліпополісахариди будь-яких грам-негативних бактерій. Передача сигналу від TLR2 і

TLR4 відбувається через MyD88-залежний шлях, через серію серинових/треонінових кіназ, призводять до індукції активації NF-kB і транскрипції низки генів прозапальних цитокінів: IL-1 β , IL-17, IL-6, IL-12, TNF α [11] і костимулюючих сигналів, які регулюють рівень включення адаптивної імунної відповіді та інтенсивності запалення тканин пародонта [12].

У попередній роботі досліджували видовий склад мікрофлори пародонтальних кишень у дітей з особливими потребами та їхній вплив на перебіг генералізованого пародонтиту [13]. Зважаючи, що мікроорганізми, індукуючи рецептори вродженого імунітету, котрі розпізнають PAMP, як-от толл-подібні рецептори 2 та 4 типів, призводять до активації ядерного фактора kB та NF-kB-залежної продукції прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, вирішили дослідити рівень транскрипційної активності генів названих рецепторів і цитокінів [14].

Мета роботи

Оцінити відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, толл-подібних рецепторів 2 і 4 типів і транскрипційного фактора NF-kB в епітелії ротової порожнини в дітей із захворюваннями центральної нервової системи, системи крові, органів дихання та в дітей із психічними розладами.

Матеріали і методи дослідження

Виконали молекулярно-генетичне дослідження експресії толл-подібних рецепторів епітелію ротової порожнини 93 дітей і 25 здорових дітей віком від 12 до 15 років. У першу групу (I) ввійшли діти-інваліди із захворюваннями центральної нервової системи (ЦНС) (21 особа), другу (II) – діти-інваліди із психічними розладами (24 особи), третю (III) – діти-інваліди з хворобами крові (25 осіб), четверту (IV) – діти-інваліди із захворюваннями системи органів дихання (23 особи). Діти цих чотирьох груп регулярно лікували основне захворювання в КУ «Запорізька обласна дитяча клінічна лікарня» та мали хронічний катаральний гінгівіт легкого та середнього ступенів тяжкості. П'ята група (V) (група порівняння) сформована із 25 дітей віком від 12 до 15 років, які мали хронічний катаральний гінгівіт легкого та середнього ступеня тяжкості (табл. 1).

При I ступені тяжкості хронічного катарального гінгівіту в дітей усіх груп дослідження спостерігали

Таблиця 1. Поділ дітей за ступенем тяжкості перебігу хронічного катарального гінгівіту

Хронічний катаральний гінгівіт	I група, n = 21	II група, n = 24	III група, n = 25	IV група, n = 23	V група, n = 25
I ступінь тяжкості	13	15	15	13	19
II ступінь тяжкості	8	9	10	10	6

Таблиця 2. Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів

Ген (Gene)	Праймер (Primer)	Температура плавлення (Temperature melting) (°C)	Довжина виробу (Product length) (bp)	Exon junction
TLR2	F: 5'-TTCTCTCAGGTGACTGCTCG-3'	59.12	46	72/73
	R: 5'-TGCAACACCAACACTGGGA-3'	60.32		
TLR4	F: 5'-TGCGTGAGACCAGAAAGCTG-3'	60.6	46	391/392
	R: 5'-TAGGAACCACCTCCACGCAG-3'	61.54		
IL1β	F: 5'-CCACCTCCAGGGACAGGATA-3'	60.03	41	553/554
	R: 5'-AGAACCACACTTGTGCTCCA-3'	60.06		
IL17α	F: 5'-TACAACCGATCCACCTCACC-3'	59.1	43	275/276
	R: 5'-CCTCATTGCGGTGGAGATTC-3'	58.7		
NFKB1	F: 5'-AACAGCAGATGGCCATACC-3'	60.11	63	626/627
	R: 5'-CGGAAACGAAATCCTCTGT-3'	58.04		
GAPDH	F: 5'-CTCTGCTCCTCTGTTCGAC-3'	59.83	63	165/166
	R: 5'-CGATGTGGCTCGGCTGG-3'	60.58		

Таблиця 3. Рівень відносної нормалізованої експресії мРНК генів TLR2, TLR4, NF-κB, IL-1β та IL-17A в дітей із захворюваннями центральної нервової системи та психічними захворюваннями

Мішень	Група	Рівень експресії (M ± m)
TLR2	захворювання ЦНС	5,64 ± 0,69*
	психічні захворювання	1,36 ± 0,24
	контроль	1,00 ± 0,23
TLR4	захворювання ЦНС	1,59 ± 0,31*
	психічні захворювання	1,32 ± 0,75
	контроль	1,00 ± 0,24
NF-κB	захворювання ЦНС	7,50 ± 1,11*
	психічні захворювання	13,64 ± 2,20*
	контроль	1,00 ± 0,19
IL-1β	захворювання ЦНС	8,96 ± 1,35*
	психічні захворювання	1,23 ± 0,25
	контроль	1,00 ± 0,14
IL-17A	захворювання ЦНС	7,74 ± 1,04*
	психічні захворювання	2,29 ± 0,19*
	контроль	1,00 ± 0,19

TLR2: Toll-like рецептор 2 типу; TLR4: Toll-like рецептор 4 типу; NF-κB: ядерний фактор κB; IL-1β: інтерлейкін 1β; IL-17A: інтерлейкін 17A; *: вірогідна різниця з групою контролю (p < 0,05).

запалення міжзубних сосочків ясен. При II ступені тяжкості в запальний процес залучалися міжзубні сосочки та маргінальний край ясен. Діти скаржились на біль, кровоточивість ясен, біль на всій поверхні ясен під час їди, відмовлялися від харчування. Під час об'єктивного обстеження встановили причинно-наслідковий зв'язок виникнення запального процесу: наявність зубного нальоту та каріозних порожнин. Спостерігали зміну рельєфу маргінального краю, гіперемію, кровоточивість і набряк ясен.

Дослідження змін експресії мРНК TLR2 і 4 типу, ядерного фактора κB і прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A епітелію ротової порожнини в дітей з особливими потребами здійснили у відділі молекулярно-генетичних досліджень Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету.

Для оцінювання відносного рівня мРНК використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження був епітелій ротової порожнини. Взяття букального епітелію виконували вранці, до цього мінімум протягом 4 годин було виключено приймання їжі. Перед забором порожнину рота ретельно ополіскували водою або фізіологічним розчином. Забір епітелію здійснили скребком клітин із внутрішнього боку щоки разовим зондом із синтетичним ворсом. У стерильну одноразову пробірку типу «Еппендорф» (0,5 мл) із транспортним середовищем занурювали відрізану робочу частину зонда. Ця процедура абсолютно безболісна, безкровна та нетравматична. Для визначення рівня експресії використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів дібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIH, США) та виготовлені фірмою Metabion (ФРН) (табл. 2).

Підібрано оптимальні умови ЗТ-ПЛР для досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР. В експеримент включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання РНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Всі реакції ампліфікації повторювали тричі. Статистичний аналіз даних ПЛР виконали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії та помилки середньої (m). Під час порівняння даних використовували параметричний t-критерій Стьюдента та непараметричний U-критерій Манна-Уїтні, після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. При перевірці статистичних гіпотез нульову гіпотезу відкидали при p < 0,05.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження експресії мРНК IL-1 β , IL-17A, TLR2, TLR4 та NF- κ B у дітей із психічними захворюваннями й захворюваннями центральної нервової системи наведені в *табл. 3*. ЗТ-ПЛР-аналіз букального епітелію продемонстрував 5,6- та 1,6-кратне ($p < 0,05$) зростання транскрипційної активності мРНК гена TLR2 і TLR4 в букальному епітелії дітей із захворюваннями центральної нервової системи. У дітей із психічними розладами вірогідних змін рівня мРНК генів TLR2 і TLR4 не було (*табл. 3, рис. 1*). Це супроводжувалось 7,5- та 13,6-разовим ($p < 0,05$) зростанням експресії NF- κ B у дітей із захворюваннями ЦНС і психічними захворюваннями відповідно (*табл. 3, рис. 2*).

Активізація NF- κ B закономірно підвищувала рівні експресії прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A у дітей із захворюваннями ЦНС у 8,9 і 7,7 раза ($p < 0,05$) відповідно. У дітей із психічними захворюваннями рівень IL-17A підвищився в 2,2 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем (*табл. 3, рис. 2*).

Результати дослідження експресії мРНК IL-1 β , IL-17A, TLR2, TLR4 та NF- κ B дітей із захворюваннями дихальних шляхів і системи крові наведено в *таблиці 4*. Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 8,5- та 2,4-кратне ($p < 0,05$) зростання транскрипційної активності мРНК гена TLR2 і TLR4 в букальному епітелії дітей із захворюваннями дихальних шляхів і 7,8- та 16,6-кратне ($p < 0,05$) у дітей із захворюваннями системи крові. Нарешті, 3,6-кратне та 6,1-кратне ($p < 0,05$) зростання експресії NF- κ B встановлено в дітей із захворюваннями дихальних шляхів і захворюваннями системи крові (*табл. 4, рис. 2*). ЗТ-ПЛР-аналіз букального епітелію показав підвищення рівня експресії прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A в дітей із захворюваннями дихальних шляхів і захворюваннями системи крові. Експресія IL-1 β підвищилась у 6,5 і 2,9 раза ($p < 0,05$) відповідно, IL-17A – в 3,8 і 3,0 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем (*рис. 1–4*).

Молекулярно-генетичне дослідження відносного рівня мРНК прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, толл-подібних рецепторів 2 та 4 типів і NF- κ B в епітелії ротової порожнини в дітей з особливими потребами віком від 12 до 15 років і практично здорових дітей цього ж віку, які страждають на хронічний катаральний гінгівіт, продемонструвало зростання транскрипційної активності мембранних TLR2 і TLR4 у всіх групах дослідження, крім групи дітей із психічними розладами. Значно вищий рівень експресії TLR4 спостерігали у групі захворювань системи крові (*рис. 1*). Активізація патерн-розпізнавальних рецепторів закономірно викликала транскрипційну індукцію NF- κ B і прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, які ним регулюються, букальним епітелієм.

Підвищення рівня експресії TLR2 і TLR4 епітеліальними клітинами ротової порожнини в умовах хронічного пародонтиту продемонстровано в ряді досліджень [15]. Зокрема, D'souza RS et al. (2013) проаналізували експресію та локалізацію TLR-2 методом імуофлуоресценції у здорових і запалених тканинах порожнини рота та продемонстрували збільшення рівня експресії TLR2 при хронічному пародонтиті, який виявляється вищим в епітеліальних клітинах, ніж у клітинах сполучної тканини [16]. A. Beklen et al. (2014)

Таблиця 4. Рівень відносної нормалізованої експресії мРНК генів TLR2, TLR4, NF- κ B, IL-1 β та IL-17A в дітей із захворюваннями дихальних шляхів і системи крові

Мішень	Група	Рівень експресії (M \pm m)
TLR2	захворювання дихальних шляхів	8,53 \pm 1,52*
	захворювання системи крові	7,82 \pm 1,05*
	контроль	1,00 \pm 0,24
TLR4	захворювання дихальних шляхів	2,49 \pm 0,27*
	захворювання системи крові	16,60 \pm 3,17*
	контроль	1,00 \pm 0,19
NF- κ B	захворювання дихальних шляхів	3,660 \pm 0,516*
	захворювання системи крові	6,166 \pm 0,756*
	контроль	1,006 \pm 0,146
IL-1 β	захворювання дихальних шляхів	6,56 \pm 0,81*
	захворювання системи крові	2,97 \pm 0,34*
	контроль	1,00 \pm 0,13
IL-17A	захворювання дихальних шляхів	3,82 \pm 0,56*
	захворювання системи крові	3,07 \pm 0,31*
	контроль	1,00 \pm 0,15

TLR2: Toll-like рецептор 2 типу; TLR4: Toll-like рецептор 4 типу; NF- κ B: ядерний фактор κ B; IL-1 β : інтерлейкін 1 β ; IL-17A: інтерлейкін 17A; *: вірогідна різниця з групою контролю ($p < 0,05$).

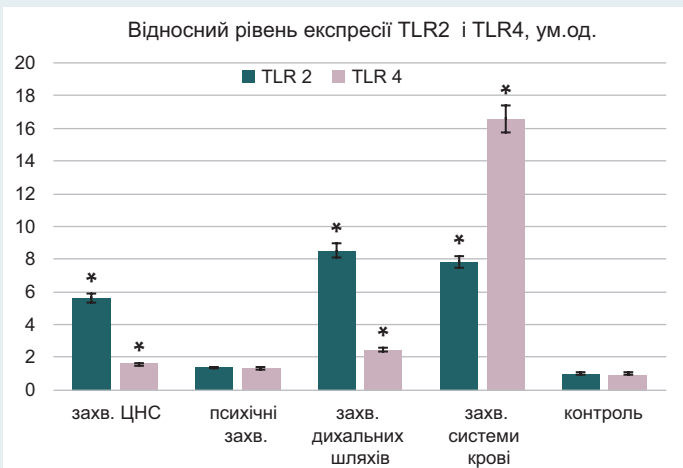


Рис. 1. Відносний рівень експресії мРНК TLR2 і TLR4 букальним епітелієм у дітей із захворюваннями у порівнянні з контрольною групою. Як референс-ген використали GAPDH.

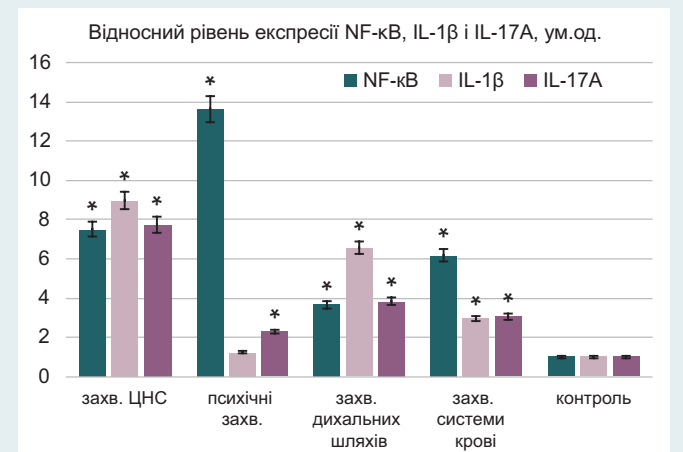


Рис. 2. Відносний рівень експресії мРНК NF- κ B, IL-1 β і IL-17A букальним епітелієм у дітей із захворюваннями порівняно з контрольною групою. Як референс-ген використали GAPDH.

виявили підвищений рівень TLR4 у зразках тканин пародонтиту [17], а N. Waga-aswapati et al. (2013) у дослідженні індукції експресії толл-подібних рецепторів за допомогою *Porphyromonas gingivalis* показали, що рівні TLR2 і TLR4 були значно збільшені у хворих на пародонтит [18]. Також продемонстровано зв'язок поліморфізму генів TLR2 і TLR4 із захворюваннями пародонта в дітей [19]. Здатність цитокінів IL-1 β і IL-17A посилювати запальний процес у пародонті продемонстрована в ряді досліджень [20,21,22]. Однак відсутні інші дані щодо змін рівня експресії мРНК цих факторів епітеліальними клітинами ротової порожнини в дітей із важкою супутньою патологією. Тому вважаємо, що виявлена в роботі транскрипційна індукція генів TLR2 і TLR4 з наступною активацією NF- κ B і продукцією прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A є одним із механізмів, який пояснює тяжчий перебіг пародонтиту в дітей з особливими потребами порівняно з хворими на пародонтит без супутньої патології.

Висновки

1. У дітей з особливими потребами спостерігали зростання транскрипційної активності мембранних TLR2 і TLR4 в усіх групах дослідження, крім групи дітей із психічними розладами.

2. Встановлено, що в дітей із інвалідністю всіх груп суттєво збільшений відносний рівень мРНК прозапального цитокіну IL-17A та NF- κ B в епітелії ротової порожнини. Проте в дітей із захворюваннями ЦНС, на відміну від дітей із психічними захворюваннями, переважно збільшився рівень мРНК цитокіну IL-1 β і толл-подібних рецепторів 2 та 4 типу.

3. У дітей із захворюваннями дихальних шляхів і патологією системи крові суттєво збільшений відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, толл-подібних рецепторів 2 і 4 типів та NF- κ B епітелію ротової порожнини. У дітей із захворюваннями дихальних шляхів переважно збільшився рівень мРНК цитокінів IL-1 β і IL-17A і толл-подібних рецепторів 2 типу, а в дітей із захворюваннями системи крові – толл-подібних рецепторів 4 типу та NF- κ B. Збільшення рівня прозапальної сигналізації в ротовій порожнині пояснює вищий рівень захворювань пародонта у дітей I, II, III, IV груп.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор, ректор Запорізького державного медичного університету, заслужений діяч науки і техніки України.

Камишний О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Гавриленко М. А., канд. мед. наук, доцент, асистент каф. терапевтичної, ортопедичної та дитячої стоматології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, профессор, ректор Запорізького державного медичного університету, заслуженный деятель науки и техники Украины.

Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Гавриленко М. А., канд. мед. наук, доцент, асистент каф. терапевтической, ортопедической и детской стоматологии, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor, Rector of Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.

Kamyshnyi O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Gavrilenko M. A., MD, PhD, Associate Professor, Assistant of the Department of Therapeutic, Orthopedic and Pediatric Dentistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 15.11.2017

Після доопрацювання / Revised: 19.12.2017

Прийнято до друку / Accepted: 28.01.2017

Список літератури

- Ebersole J.L. The periodontal war: microbes and immunity / J.L. Ebersole, D. Dawson, P. Emecen-Huja, et al. // *Periodontol.* 2000 – 2017. – Vol. 75(1). – P. 52–115. doi: 10.1111/prd.12222.
- Kinane D.F. Periodontal diseases / D.F. Kinane, P.G. Stathopoulou, P.N. Papapanou // *Nat Rev Dis Primers.* – 2017. – Vol. 3. – P. 17–38. Evidence summary: the relationship between oral health and pulmonary disease / D. Manger, M. Walshaw, R. Fitzgerald, et al. // *Br Dent J.* – 2017. – Vol. 222(7). – P. 527–533.
- Acute oral complications in a pediatric patient with acute lymphoid leukemia / Y. Kamasaki, K. Satoh, M.L. Nishiguchi, et al. // *Pediatr Int.* – 2016. – Vol. 58(6). – P. 484–487.
- Mendes V. Interrelation of periodontal parameters between asthmatics and nonasthmatics subjects: a systematic review and meta-analysis / V. Mendes, G.O. Dos Santos, V. Moraschini // *J Dent.* – 2018. – Vol. 69. – P. 32–40.
- The periodontal war: microbes and immunity / J.L. Ebersole, D. Dawson, P. Emecen-Huja, et al. // *Periodontol.* – 2017. – Vol. 75(1). – P. 52–115.
- TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity / K. Dolasia, M.K. Bisht, G. Pradhan et al. // *Int Rev Immunol.* – 2018. – Vol. 37. – Issue 1. – P. 3–19.
- Leifer C.A. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling / C.A. Leifer, A.E. Medvedev // *J Leukoc Biol.* – 2016. – Vol. 100(5). – P. 927–941.
- McClure R. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens / R. McClure, P. Massari // *Front Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 386.
- Sasai M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors / M. Sasai, M. Yamamoto // *Int Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 32(2). – P. 116–33.
- Hayden M.S. NF- κ B in immunobiology / M.S. Hayden, S. Ghosh // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21(2). – P. 223–244.
- Visekruna A. A key role for NF- κ B transcription factor c-Rel in T-lymphocyte-differentiation and effector functions / A. Visekruna, A. Volkov, U. Steinhoff // *Clin Dev Immunol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 239368.
- Гавриленко М.А. Мікробіологічний вміст пародонтальних кишень у дітей з особливими потребами / М.А. Гавриленко // *Современная стоматология* – 2015. – №2. – С. 28–29.
- Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss / G. Papadopoulos, E.O. Weinberg, P. Massari, et al. // *J Immunol.* – 2013. – 190. – Issue 3. – P. 1148–57.
- Evaluation of TLR2 and 4 in Chronic Periodontitis / P. Ilango, A. Mahalingam, H. Parthasarathy et al. // *J Clin Diagn Res.* – 2016. – Vol. 10(6). – P. 86–89.
- Analysis of expression and localization of TLR-2 by immunofluorescent technique in healthy and inflamed oral tissues / R.S. D'souza, K.G. Bhat, D. Sailaja, et al. // *J Clin Diagn Res.* – 2013. – Vol. 7(12). – P. 2780–683.
- The function of TLR4 in interferon gamma or interleukin-13 exposed and lipopolysaccharide stimulated gingival epithelial cell cultures / A. Beklen, A.S. Sarp, D. Uckan, G. TsaousMemet // *Biotech Histochem.* – 2014. – Vol. 89(7). – P. 505–12.

- [18] Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis* / N. Wara-aswapati, A. Chayasadam, R. Surarit, et al. // *J Periodontol.* – 2013. – Vol. 84(7). – P. 1010–18.
- [19] Toll-like receptor (TLR2 and TLR4) polymorphisms: markers of innate immunity in oral infection in children / M. Rashkova, A. Kirov, A. Todorova, V. Mitev // *Oral Health Dent Manag.* – 2010. – Vol. 9(3). – P. 148–53.
- [20] Salivary cytokine levels in early gingival inflammation / D. Belström, C. Damgaard, E. Könönen, et al. // *J Oral Microbiol.* – 2017. – Vol. 9. – Issue 1. – P. 1364101.
- [21] Chitrapriya M. N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease / M.N. Chitrapriya, S.R. Rao, V. Lavu // *J Indian Soc Periodontol.* – 2015. – Vol. 19(1). – P. 14–7.
- [22] Cheng W.C. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis / W.C. Cheng, F.J. Hughes, L.S. Taams // *J Clin Periodontol.* – 2014. – Vol. 41(6). – P. 541–9.
- [19] Rashkova, M., Kirov, A., Todorova, A., & Mitev, V. (2010) Toll-like receptor (TLR2 and TLR4) polymorphisms: markers of innate immunity in oral infection in children. *Oral Health Dent Manag.*, 9(3), 148–53.
- [20] Belström, D., Damgaard, C., Könönen, E., Gürsoy, M., Holmstrup, P., & Gürsoy, U. K. (2017) Salivary cytokine levels in early gingival inflammation. *J Oral Microbiol.*, 9(1), 1364101. doi: 10.1080/20002297.2017.1364101.
- [21] Chitrapriya, M. N., Rao, S. R., & Lavu, V. (2015) Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.*, 19(1), 14–7. doi: 10.4103/0972-124X.145798.
- [22] Cheng, W. C., Hughes, F. J., & Taams, L. S. (2014) The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 41(6), 541–9. doi: 10.1111/jcpe.12238.

References

- [1] Ebersole, J. L., Dawson, D., Emecen-Huja, P., Nagarajan, R., Howard, K., Grady, M. E., et al. (2017) The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontol 2000*, 75(1), 52–115. doi: 10.1111/prd.12222.
- [2] Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017) Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.*, 3, 17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.
- [3] Manger, D., Walshaw, M., Fitzgerald, R., Doughty, J., Wanyonyi, K. L., White, S., & Gallagher, J. E. (2017) Evidence summary: the relationship between oral health and pulmonary disease. *Br Dent J.*, 222(7), 527–533. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.315.
- [4] Kamasaki, Y., Satoh, K., Nishiguchi, M., Hoshino, T., & Fujiwara, T. (2016) Acute oral complications in a pediatric patient with acute lymphoid leukemia. *Pediatr Int.*, 58(6), 484–487. doi: 10.1111/ped.12829.
- [5] Mendes, V., Dos Santos, G. O., & Moraschini, V. (2018) Interrelation of periodontal parameters between asthmatics and nonasthmatics subjects: a systematic review and meta-analysis. *J Dent.*, 69, 32–40. doi: 10.1016/j.jdent.2017.11.011.
- [6] Ebersole, J. L., Dawson, D., Emecen-Huja, P., Nagarajan, R., Howard, K., Grady, M. E., et al. (2017) The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontol.*, 75(1), 52–115. doi: 10.1111/prd.12222.
- [7] Dolasia, K., Bisht, M. K., Pradhan, G., Udgata, A., & Mukhopadhyay, S. (2017) TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. *Int Rev Immunol.* 37(1), 3–19. doi: 10.1080/08830185.2017.1397656.
- [8] Leifer, C. A., & Medvedev, A. E. (2016) Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol.*, 100(5), 927–941. doi: 10.1189/jlb.2MR0316-117RR.
- [9] McClure, R., & Massari, P. (2014) TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol.*, 5, 386. doi: 10.3389/fimmu.2014.00386.
- [10] Sasai, M., & Yamamoto, M. (2013) Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int Rev Immunol.*, 32(2), 116–33. doi: 10.3109/08830185.2013.774391.
- [11] Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011) NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.*, 21(2), 223–244. doi: 10.1038/cr.2011.13.
- [12] Visekruna, A., Volkov, A., & Steinhoff, U. (2012) A key role for NF- κ B transcription factor c-Rel in T-lymphocyte-differentiation and effector functions. *Clin Dev Immunol.*, 2012, 239368. doi: 10.1155/2012/239368.
- [13] Gavrilenko, M. A. (2015) *Mikrobiolohichnyi vmist parodontalnykh kyshen u ditei z osoblyvymy potrebamy* [Microbiological content of gingival pockets of children with special needs]. *Sovremennaya stomatologiya*, 2, 28–29. [in Ukrainian].
- [14] Papadopoulos, G., Weinberg, E. O., Massari, P., Gibson, F. C., Wetzel, L. M., Morgan, E. F., & Genco, C. A. (2013) Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J Immunol.* 190(3), 1148–57. doi: 10.4049/jimmunol.1202511.
- [15] Ilango, P., Mahalingam, A., Parthasarathy, H., Katamreddy, V., & Subbareddy, V. (2016) Evaluation of TLR2 and 4 in Chronic Periodontitis. *J Clin Diagn Res.*, 10(6), 86–89. doi: 10.7860/JCDR/2016/18353.8027.
- [16] D'souza, R. S., Bhat, K. G., Sailaja, D., Babji, D. V., Bandiwadekar, T. K., & Katgalkar, R. M. (2013) Analysis of expression and localization of TLR-2 by immunofluorescent technique in healthy and inflamed oral tissues. *J Clin Diagn Res.*, 7(12), 2780–683. doi: 10.7860/JCDR/2013/6745.3745.
- [17] Beklen, A., Sarp, A. S., Uckan, D., & TsaousMemet, G. (2014) The function of TLR4 in interferon gamma or interleukin-13 exposed and lipopolysaccharide stimulated gingival epithelial cell cultures. *Biotech Histochem.*, 89(7), 505–12. doi: 10.3109/10520295.2014.903299.
- [18] Wara-aswapati, N., Chayasadam, A., Surarit, R., Pitiphat, W., Boch, J. A., Nagasawa, T., et al. (2013) Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.*, 84(7), 1010–18. doi: 10.1902/jop.2012.120362.

The definition of neutrophil extracellular traps and the concentration of short-chain fatty acids in salmonella-induced inflammation of the intestine against the background of vancomycin and *Bacteroides fragilis*

Yu. V. Bukina¹, B. O. Varynskyi¹, A. V. Voitovich¹, G. D. Koval², A. G. Kaplaushenko¹, O. M. Kamyshnyi¹

¹Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, ²HSEE "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi, Ukraine

Key words:

microbiome, salmonella, bacteroides, neutrophil traps, short chain fatty acids, chromatography-mass spectrometry, immunofluorescence.

Pathologia

2018; 15 (1), 10-17

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.128847

E-mail:

lingvus25@gmail.com

The aim is to study the features of the formation of neutrophil extracellular traps in the blood and gut-associated lymphoid tissue with salmonella-induced inflammation against the background of the administration of vancomycin and *B. fragilis*, and to determine the concentration of short-chain fatty acids in the luminal microflora of rats by means of chromatography-mass spectrometry.

Methods. Studies were carried out on quantitative counting of Sytox⁺-neutrophils and NETs in scrapings of the mucous membrane of the ileum of the intestine and in blood by the method of immunofluorescence microscopy, and also by determination of the concentration of SCFA in the luminal microflora of rats by chromatography-mass spectrometry.

Results. The introduction of vancomycin contributed to an increase in the number of Sytox⁺-cells in scrapings of the intestinal mucosa and in the blood by 55 % and 2.5 times (group II). With the combined administration of vancomycin and *S. enteritidis* (III group), *S. typhimurium* (IV group), the mean Sytox⁺-cell counts in mucosal scrapings increased by 30 % and 2.4 times, and in the blood by 30 % (group IV), there was also a decrease in the number of NETs by 40 % (group IV). The introduction of *B. fragilis* against the background of pretreatment with vancomycin and infection with salmonella showed a decrease of Sytox⁺-cells in the scrapings of the intestinal mucosa by 43 % and 53 %, and in the blood by 46 % and 58 % (V and VI groups), and the number of NETs in scrapings from the intestinal mucosa and in the blood significantly increased by 43 % and 40 % (V group), and by 2.3 and 2.0 times (group VI). When infecting the rats with *S. typhimurium* against the background of pretreatment with vancomycin and the introduction of *B. fragilis*, the concentration of acetate in the samples increased by 2 times; propionate – 6 times and butyrate – 3 times.

Conclusions. The introduction of *B. fragilis* in the infection of *S. enteritidis* and *S. typhimurium* against the background of vancomycin pretreatment leads to decrease in the number of Sytox⁺-cells in scrapings from the intestinal mucosa and in the blood, but induces the generation of NETs, and also causes an increase in the concentration of SCFA in the luminal microflora of rats, which helps to reduce salmonella-induced inflammation and restore the integrity of the intestinal epithelium.

Ключові слова:

мікробіом, сальмонела, бактерії, нейтрофільні пастки, коротколанцюгові жирні кислоти, хромато-мас-спектрометрія, імунофлуоресценція.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 10-17

Визначення нейтрофільних позаклітинних пасток і концентрації коротколанцюгових жирних кислот при сальмонела-індукованому запаленні кишечника на тлі введення ванкоміцину та *Bacteroides fragilis*

Ю. В. Букіна, Б. О. Варинський, О. В. Войтович, Г. Д. Коваль, А. Г. Каплаушенко, О. М. Камишний

Мета роботи – вивчити особливості формування нейтрофільних позаклітинних пасток у крові та кишково-асоційованій лімфоїдній тканині при сальмонела-індукованому запаленні на тлі введення ванкоміцину і *B. fragilis*, а також визначити концентрації коротколанцюгових жирних кислот у просвітній мікрофлорі щурів за допомогою хромато-мас-спектрометрії.

Матеріали та методи. Здійснили дослідження за кількісним підрахунком Sytox⁺-нейтрофілів і НПП у зіскрібках слизової оболонки клубового відділу кишечника та у крові методом імунофлуоресцентної мікроскопії, а також визначення концентрації КЛЖК у просвітній мікрофлорі щурів хромато-мас-спектрометричним методом.

Результати. Введення ванкоміцину сприяло збільшенню кількості Sytox⁺-клітин у зіскрібках слизової оболонки кишечника та у крові на 55 % і в 2,5 рази (II група). При одночасному введенні ванкоміцину та *S. enteritidis* (III група), *S. typhimurium* (IV група) середнє значення Sytox⁺-клітин у зіскрібках зі слизової оболонки збільшилося на 30 % і в 2,4 рази, а в крові на 30 % (IV група), також визначили зменшення кількості НПП на 40 % (IV група). Введення *B. fragilis* на тлі попередньої обробки ванкоміцином та інфікування сальмонелами показало зниження Sytox⁺-клітин у зіскрібках слизової оболонки кишечника на 43 % та 53 %, у крові – на 46 % і 58 % (V і VI групи), а кількість НПП у зіскрібках зі слизової оболонки кишечника та у крові збільшувалася на 43 % і 40 % (V група), а також у 2,3 і 2,0 рази (VI група). При інфікуванні щурів *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином і введення *B. fragilis* концентрація ацетату у зразках збільшилася вдвічі, пропіонату – у 6 разів, бутирату – у 3 рази.

Висновки. Введення *B. fragilis* при інфікуванні *S. enteritidis* і *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином призводить до зменшення кількості Sytox⁺-клітин у зіскрібках слизової оболонки клубової кишки та у крові, але індукує генерацію НПП, а також зумовлює збільшення концентрації КЛЖК у просвітній мікрофлорі щурів, що сприяє зменшенню сальмонела-індукованого запалення, відновленню цілісності епітелію кишечника.

Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации короткоцепочечных жирных кислот при сальмонелла-индуцированном воспалении кишечника на фоне введения ванкомицина и *Bacteroides fragilis*

Ю. В. Букина, Б. А. Варинский, А. В. Войтович, Г. Д. Коваль, А. Г. Каплаушенко, А. М. Камышный

Цель работы – изучить особенности формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови и кишечной лимфоидной ткани при сальмонелла-индуцированном воспалении на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*, а также определить концентрацию короткоцепочечных жирных кислот в просветной микрофлоре крыс при помощи хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы. Проведены исследования по количественному подсчету Sytox⁺-нейтрофилов и НВЛ в соскобах слизистой оболочки подвздошного отдела кишечника и в крови методом иммунофлуоресцентной микроскопии, а также по определению концентрации КЦЖК в просветной микрофлоре крыс хромато-масс-спектрометрическим методом.

Результаты. Введение ванкомицина способствовало увеличению числа Sytox⁺-клеток в соскобах слизистой оболочки кишечника и в крови на 55 % и в 2,5 раза (II группа). При сочетанном введении ванкомицина и *S. enteritidis* (III группа), *S. typhimurium* (IV группа) среднее значение Sytox⁺-клеток в соскобах со слизистой оболочки увеличилось на 30 % и в 2,4 раза, а в крови на 30 % (IV группа), также отмечено снижение численности НВЛ на 40 % (IV группа). Введение *B. fragilis* на фоне предобработки ванкомицином и инфицирования сальмонеллами показало снижение Sytox⁺-клеток в соскобах слизистой оболочки кишечника на 43 % и 53 %, в крови – на 46 % и 58 % (V и VI группы), а количество НВЛ в соскобах со слизистой оболочки кишечника и в крови увеличивалась на 43 % и 40 % (V группа), а также в 2,3 и 2,0 раза (VI группа). При инфицировании крыс *S. typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином и введении *B. fragilis* концентрация ацетата в образцах увеличилась в 2 раза, пропионата – в 6 раз, бутирата – в 3 раза.

Выводы. Введение *B. fragilis* при инфицировании *S. enteritidis* и *S. typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином приводит к снижению численности Sytox⁺-клеток в соскобах слизистой оболочки подвздошной кишки и в крови, но индуцирует генерацию НВЛ, а также обуславливает увеличение концентрации КЦЖК в просветной микрофлоре крыс, что способствует снижению сальмонелла-индуцированного воспаления и восстановлению целостности эпителия кишечника.

Ключевые слова:

микробиом, сальмонелла, бактериоды, нейтрофильные ловушки, короткоцепочечные жирные кислоты, хромато-масс-спектрометрия, иммунофлюоресценция.

Pathologia. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 10–17

Intestinal microbiome is a unique system responsible for maintaining the body's homeostasis. This constancy is ensured by the interaction of representatives of microflora with gut-associated lymphoid tissue (GALT) through a certain group of molecules – short-chain fatty acids (SCFA) [1]. These acids are metabolic products of anaerobic bacteria that are capable of influencing chemotaxis, apoptosis, T-cell differentiation, the transcriptional activity of the FFAR2, Foxp3 and RORγt genes and activation of the receptors for acetate, propionate and butyrate (GPR43, GPR41 and GPR109a (HCA2)). One of the main producers of SCFA in GALT are bacteroides [2–4]. We showed previously that the administration of *B. fragilis* against the background of vancomycin pretreatment and salmonella infection increases the mRNA level of the FFAR2 gene, and also increases the transcriptional activity of the Foxp3 gene directing T-cell differentiation toward Treg, which contributed to a decrease in inflammatory reactions in the intestine and recovery of the microbiome development of experimental gastroenteritis [5].

Meanwhile, the effect of changes in the level of SCFA on the functional activity of some of the main cells of innate immunity – neutrophils, practically nothing is known. A recent discovery related to the ability of neutrophils to distinguish lipopolysaccharides from different bacterial agents and selectively release extracellular traps (NETs) is of great interest in studying the mechanisms of interaction of pathogenic microorganisms with immune system cells and their ability to influence the formation of NETs the concentration of SCFA, as a factor affecting the inhibition of inflammatory reactions in the intestine [6,7].

One of the main elements of NETs is DNA [8,9]. However, in addition to DNA, NETs include 70 % of histone proteins (H1, H2A, H2B, H3 and H4), as well as non-his-

tone proteins, most notably neutrophil elastase (NE) of 5 % [10,11]. Another, not less important part of NETs, is myeloperoxidase (MPO), which has strong antipathogenic properties [12]. The structure of NETs is heterogeneous and can contain a large number of components: cathepsins, defensins, bactericides, phosphatases, lactoferrin, lysozyme, catelicidins, collagenase, gelatinase, catalase. Thanks to active research into the structure of NETs, the scientists showed that the components of NETs also include: cytokeratin-10, α-actinin 1 and 4, β-actin, γ-actin, myosin-9, cytoplasmic proteins, proteinase 3, catelicidins (LL-37), tryptases, glycolytic enzymes, α-enolase and transketolase [13–15].

Salmonella are one of the inducers of the formation of NETs. Interestingly, there is the fact that taking antibiotics can also stimulate the formation of NETs, which leads to inhibition of the growth of pathogenic microorganisms [16]. Therefore, the study of the nature of generation of NETs with the administration of *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, vancomycin and *Bacteroides fragilis* is of particular interest.

The aim

To study the features of the formation of NETs in the blood and GALT with salmonella-induced inflammation against the background of the administration of vancomycin and *B. fragilis*, and to determine the concentration of SCFA in the luminal microflora of rats by means of chromatography-mass spectrometry.

Materials and methods of research

The experiments were carried out on 60 male Wistar rats of 3 months age who were divided into 6 groups (10 each): 1 –

Control (intact rodents) II – Vancomycin (animals that received oral administration of vancomycin at a dose of 50 mg/kg); III – Vancomycin + *S. enteritidis* (animals that received vancomycin at oral dose of 50 mg/kg and received bacterial load of *S. enteritidis* in an amount of 3×10^8 CFU/ml every other day); IV – Vancomycin + *S. typhimurium* (animals that received vancomycin at the dose of 50 mg/kg per day and received a bacterial load of *S. typhimurium* in the amount of 3×10^8 CFU/ml every other day); V – Vancomycin + *S. enteritidis* + *B. fragilis* (animals received by oral administration of vancomycin at a dose of 50 mg/kg, a day later – a bacterial load of *S. enteritidis* in the amount of 3×10^8 CFU/ml and the next day of *B. fragilis* 3×10^8 CFU/ml); VI – Vancomycin + *S. typhimurium* + *B. fragilis* (animals that received vancomycin at oral dose 50 mg/kg, a day later – a bacterial load of *S. typhimurium* in the amount of 3×10^8 CFU/ml and the next day – *B. fragilis* in 3×10^8 CFU/ml). On the fifth day the rats were removed from the experiment in accordance with the principles of euthanasia. Infection of animals was carried out by daily cultures of salmonella grown on 1.5 % of MPA, obtained from the Museum of strains of microorganisms of the Ukrainian Center for Disease Control and Monitoring of the Ministry of Health of Ukraine. Bacteroid cultures were grown on nutrient media prepared according to methodological recommendations “Laboratory diagnostics of purulent inflammatory diseases caused by asporogenous anaerobic microorganisms” (Kharkiv, 2000). Bacterial suspensions were standardized using a DEN-1B (Biosan) densitometer by McFarland (McF). To introduce the *S. enteritidis*, *S. typhimurium* and *B. fragilis* to rats, we prepared suspensions in the concentration of 1.0 McF standards, which corresponds to the concentration of 3×10^8 CFU/ml.

The evaluation of macroscopic manifestations of ileum deficiency was performed on a scale from 0 to 8 in accordance with the criteria of Morris et al. in the modification of Jagtap [17]: (0) no visible changes, (1) there are areas of hyperemia, (2) there are lesions having a diameter of 1 mm or less, (3) lesions having a diameter of 2 mm or less (number <5), (4) there is a defect having a diameter of 2 mm or less (number 5–10), (5) a defect having a diameter of 2 mm or less (>10), (6) there is a lesion, having a diameter of more than 2 mm (number <5), (7) there are lesions having a diameter greater than 2 mm (number 5–10); (8) lesions having a diameter greater than 2 mm (>10).

As a material for conducting the chromatography-mass-spectrometric study to determine the concentration of SCFA (acetate, propionate and butyrate), a luminal microflora of rats was used and only in comparison groups IV and VI.

Sample preparation process: fecal samples (2 g) were taken into sterile tubes, 1 ml of bidistilled water was added to each by the glass pipette, it was mixed well. Then 1 ml of 0.1 N hydrochloric acid and 2 ml of diethyl ether were added. The stirring was continued for 25 minutes and it was left for 10 minutes for complete phase separation. Using medical sterile syringes for 1000 μ l, the upper phase was taken, transferred to numbered centrifuge microtubes [18]. To determine the concentration of SCFA, we developed a new methodology for performing of chromatography-mass

spectrometric analysis (CMSA). The analysis was carried out using liquid chromatography-mass spectrometer (LC MS): Agilent 1260 Infinity HPLC System (USA) (degasser, binary pump, autosampler, column thermostat); one-wave Agilent 6120 mass spectrometer with electrospray ionization (ESI); OpenLAB CDS Software. In the CMSA study, the following tests were used: 1) Binary gradient-A: H₂O (HCOOH 0.1 %), B: CH₃CN (HCOOH 0.1 %); 2) Conditions of gradient B mode (0 min – 2 %, 10 min – 100 %); 3) Flow rate 0.4 ml min; 4) Column Zorbax SB-C18; 30.0 mm \times 4.6 mm; 1.8 μ m; 5) Column temperature: 40 °C; 6) Ion source: API-ES; 7) Selective ion monitoring mode SIM 61.0; 75.0; 89.0; 8) Fragmentor: 100V; 9) Positive polarity; 10) The nitrogen temperature is 110 °C; 11) Pressure on the nebulizer 60 psi; 12) Gas velocity of the desiccant (nitrogen) – 10 l/min; 13) The injection volume is 5 μ l. All data were recorded on chromatograms.

Determination of the average number of Sytox⁺ and NETs cells in scrapes taken from the mucous membrane of the ileum of the intestine and in the blood (groups I-VI) was carried out with the immunofluorescence microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) in the ultraviolet excitation spectrum of 390 nm (FITC). Digital image analysis was performed using the AxioVision 4.7.2 system (Imaging Associates Ltd, Germany). The material was taken with a sterile plastic curette from the mucous membrane of the ileum of the intestine and transferred to a sterile slide glass. The drug was fixed with 95 % ethanol for 5 minutes. The excess of ethanol after fixation was removed with the help of filter paper, not allowing the preparation to dry in air. To identify the NETs, the fluorescent dye SYTOXTM Green nucleic acid stain (Invitrogen, USA) was used, according to the instructions attached to the kit. The drug was additionally stained for 30 seconds by Romanovsky-Giemsa and light and fluorescent microscopy was performed on a $\times 10$ lens in the field of view. In the automatic mode, areas with statistically significant fluorescence characteristic of these cells were determined. Immune-positive cells were studied using the computer program ImageJ (NIH, USA). The morphometric and densitometric characteristics of immune-positive cells were counted. Cells with a *circularity* ≤ 0.5 ($4\pi \times [\text{Area}] / [\text{Perimeter}]^2$) were referred to neutrophils forming NETs.

The statistical analysis of the results was carried out using Microsoft Excel 2016 and StatSoft Statistica v12 (NAXXR712D833214FAN5). To calculate the reliability of the differences between the mean values of the concentration of short chain fatty acids the non-parametric Mann-Whitney criterion (U-test) and the Student's t-criterion for calculating the average number of Sytox⁺ and NETs cells were used. Statistically significant differences were considered at a value of $P < 0.05$.

Results and its discussion

The results obtained in the course of the studies on the quantitative determination of Sytox⁺ cells and NETs in scrapings from the mucous membrane of the ileum of the intestine and in the blood showed that when vancomycin (group II) was administered to experimental animals, an increase in the number of Sytox⁺ cells by 55 % and by 2.5 times ($P < 0.05$) compared with the control group.

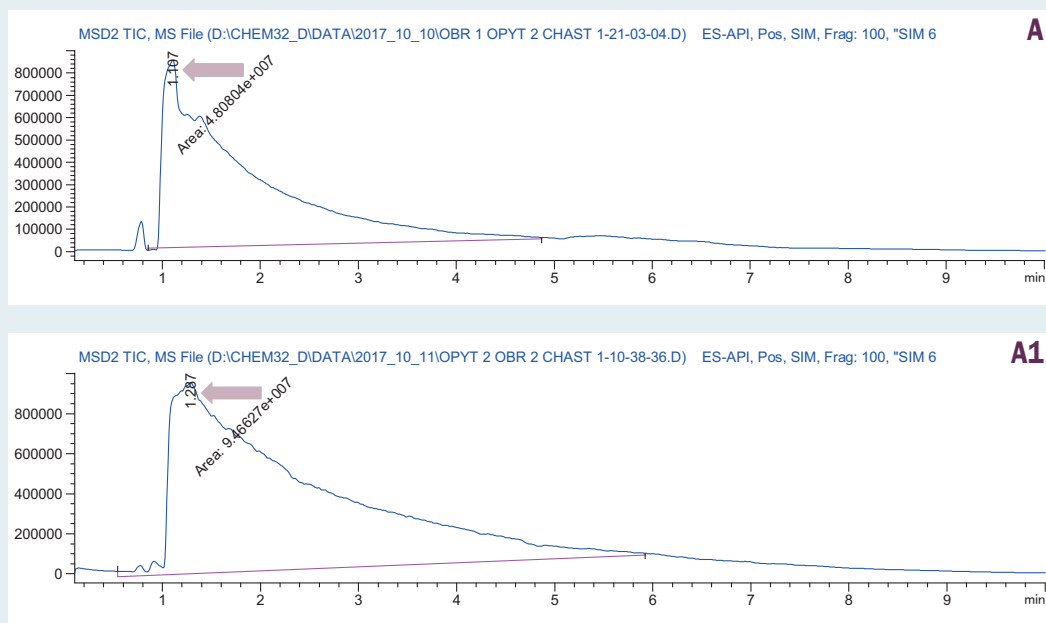


Fig. 1. Chromatograms of acetoacetic acid in the fecal samples.

A – the content of acetate in animals in the group *S. typhimurium* + Vancomycin. **A1** – the content of acetate in animals in the group *S. typhimurium* + Vancomycin + *B. fragilis*.

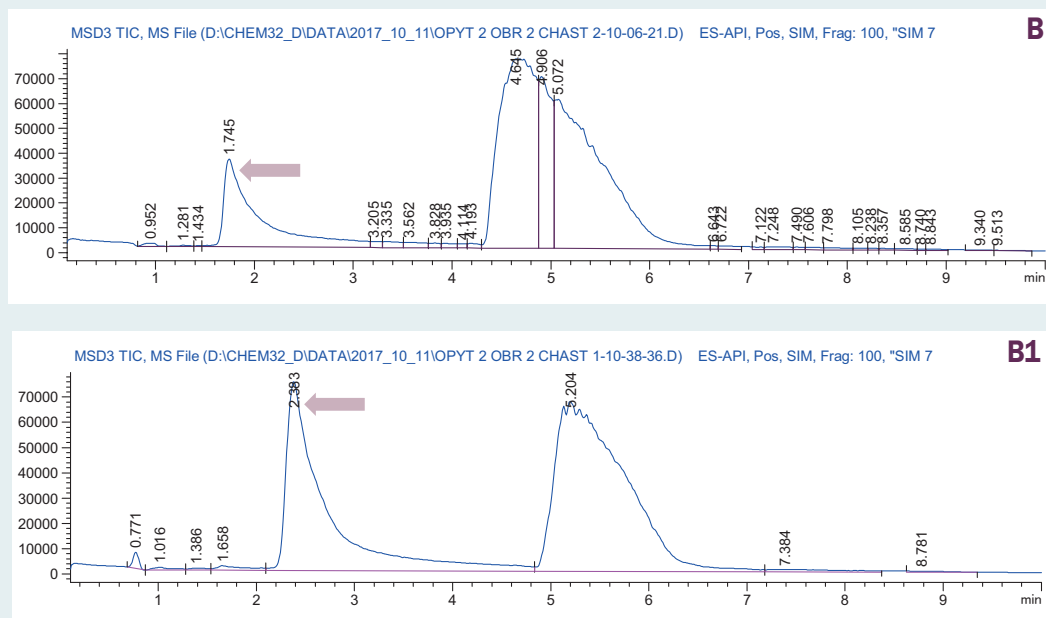


Fig. 2. Chromatograms of propionic acid in the fecal samples.

B – the content of propionate in animals in the group *S. typhimurium* + Vancomycin. **B1** – the content of propionate in animals in the group *S. typhimurium* + Vancomycin + *B. fragilis*.

When analyzing the data of groups III and IV, which underwent pretreatment with vancomycin, and after infection with *S. enteritidis* and *S. typhimurium*, the average value of Sytox⁺-cells in scrapings from the ileal mucosa increased significantly by 30% and by 2.4 times, and in the blood by 30% and only in the IV group ($P < 0.05$), than with the single administration of vancomycin (II group). Also,

in scrapings from the ileal mucosa, there was a decrease in the number of NETs by 40 % (group IV) ($P < 0.05$) (Table 1). Calculation of the average number of Sytox⁺-cells in scrapings from the intestinal mucosa in the V and VI groups, where the animals received bacterial strain of *B. fragilis* against the background of vancomycin pretreatment and the introduction of *S. enteritidis*, *S. typhimurium*,

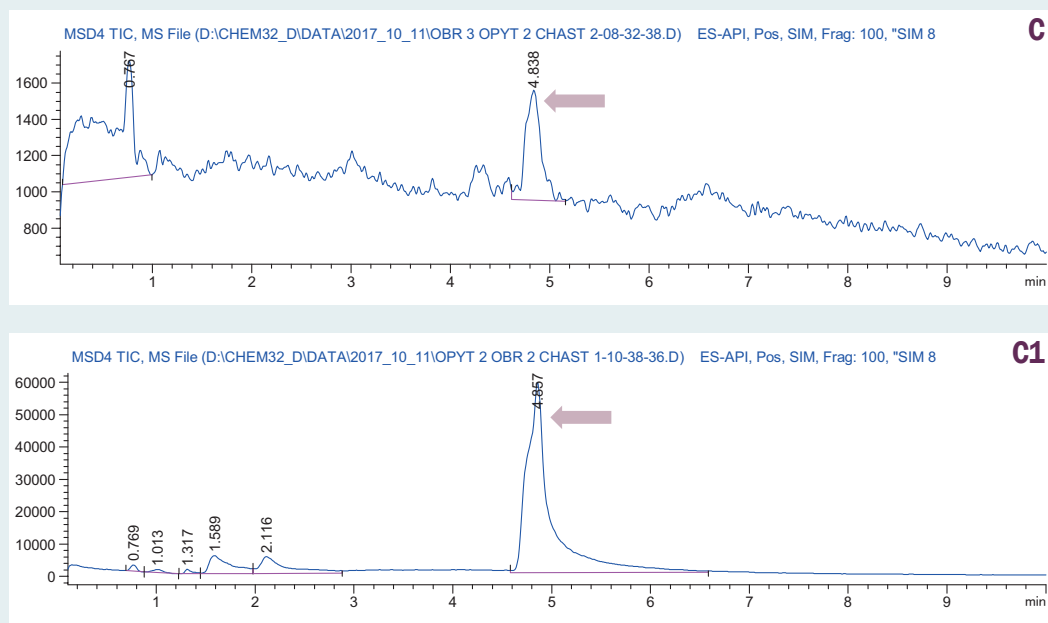


Fig. 3. Chromatograms of butanoic acid in the fecal samples.

C – the content of butyrate in animals in the group *S. typhimurium* + Vancomycin. **C1** – the content of butyrate in animals in the group *S. typhimurium* + Vancomycin + *B. fragilis*.

decreased by 43 % and 53 %, and in the blood – by 46 % and 58 % ($P < 0.05$) in relation to the results obtained in the analysis of groups III and IV. However, the number of NETs in scrapings from the ileal mucosa and in the blood increased significantly in the V group by 43 % and 40 %, and in the VI group by 2.3 and 2.0 times, respectively ($P < 0.05$) than in III and IV groups (Table 2).

In the course of the studies, we determined the concentrations of SCFA (acetyl, propionate and butyrate) in the luminal microflora of rats when they were infected with *S. typhimurium* against the background of the preliminary administration of vancomycin, as well as in combination with *B. fragilis*. Thus, in the infection of rats *S. typhimurium* against the background of pretreatment with vancomycin and in the combined administration of *B. fragilis*, the average concentration of acetate in the samples increased significantly – 2-fold (Fig. 1); propionate – 6 times (Fig. 2) and butyrate – 3 times, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 3), rather than infecting *S. typhimurium* animals against the background of the preliminary administration of vancomycin (Table 3).

The formation of NETs (netosis) can take place in three versions: a) cell lysis-suicidal netosis; b) vesicular secretion of nuclear DNA without destruction of MTC neutrophils – vital netosis; c) formation of NETs from mitochondrial DNA [19,20]. At present, the most studied model is suicidal netosis, which lasts for 2–4 hours. Its onset is characterized by neutrophil activation, through the recognition of pathogens, which leads to the induction of the NADPH oxidase (NOX) complex, through protein kinase C, and to an increase in cytosolic Ca^{2+} [21–23]. These cations serve as a co-factor for peptidyl-arginase deaminase 4 (PAD4) and a nuclear enzyme that deaminates histones, modifies amino acids, which leads to decondensation of chromatin and loss of positive charges

necessary for the interaction of histones with DNA [24,25]. Active forms of oxygen contribute to the destruction of the nuclear membrane into small granules and to the mixing of chromatin with cytoplasmic proteins and granular toxins. The formation of NETs depends on the transport of elastase and myeloperoxidase from the granules to the nucleus. This results in the release of chromatin and lysis of the cell with the release of DNA as extracellular traps (NETs) [26,27]. The second type of ECT generation (5–60 min), proceeding without loss of the nuclear or plasma membrane and independent of ROS, is vital netosis. This process is carried out due to three morphological modifications: the growth of the nuclear envelope and the release of vesicles; decondensation of the nucleus; destruction of the nuclear membrane and release of DNA [28–30]. This variant of NETosis is mediated by the effect on Toll-like receptors (TLRs) and complement receptors of the C3 protein [31–33]. In addition, the formation of NETs by neutrophils can be facilitated by the interaction of the glycoprotein Ib in platelets with $\beta 2$ -integrin (CD18), by activating ERK, PI3K and src-kinases [34]. Thus, non-nuclear neutrophils retain the ability to phagocytosis pathogenic microorganisms, regardless of the loss of DNA. The third, ROS-dependent mechanism of NETosis, is the release of mitochondrial DNA, instead of nuclear, by recognizing the lipopolysaccharide (LPS) of bacteria or C5a, resulting in the formation of NETs for 15 min [35–38].

Our results showed that the introduction of bacteroides changes significantly the concentration of SCFA in the intestine and this is accompanied by an increase in the formation of NETs. This is confirmed by other studies on the effect of SCFA on effector functions of neutrophils [39]. SCFA, when interacting with neutrophils, can affect the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-17) and neutrophil chemoattractants (CXCL1 and

CXCL8) by initiating the FFAR2 receptor, which results in the induction of neutrophil chemotaxis [40–42]. The inhibitory effect of neutrophils on the production of TNF- α has been described by Tedelind (2007) who showed that this process was mediated by the Toll-like receptor (TLR) agonists and SCFA. When human neutrophils were incubated with TLR2 agonists and SCFA, the production of CXCL8 was noted, which proves the direct effect of free fatty acids on neutrophil activity [43]. The experiments carried out to study the neutrophil functions have shown that under the influence of SCFA, they are capable of releasing reactive oxygen species and nitrogen oxide, which can affect their life cycle. In his works Sina (2009) demonstrated changes in migration of mouse neutrophils under the influence of propionate [44]. At the same time, Le Poul (2003) suggests that intensive neutrophil migration may be due to the presence of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) [45]. In the studies on different experimental models (dextran sulfate-sodium colitis [46], T-cell-dependent colitis [47, 48], thioglycollate-induced peritonitis [49], acute renal failure [50]), the researchers determined that activation of SCFA reduces the restructuring of the neutrophil cytoskeleton and the intensity of inflammatory responses. This fact is confirmed by the investigation of Mishiro (2013) that was conducted on mouse models with dextran sulfate-sodium colitis and rectal administration of butyrate in which the weakening of the rearrangement of the cytoskeleton of neutrophils and reduction in inflammation were also observed [51]. The results obtained by Kim (2013), likewise show a reduction in inflammatory responses due to the interaction of neutrophils with SCFA and epithelial cells of the intestine (GPR41), when *C. rodentium* mice are infected with the subsequent introduction of acetate. However, the results obtained by other scientists showed that SCFAs not only did not influence but sometimes even inhibited phagocytosis and the formation of reactive oxygen species by neutrophils [52,53]. Also, another group of scientists found that with the activation of caspase, propionate and butyrate are capable to launch a neutrophil apoptosis, which is independent of protein kinases and activation of SCFA receptors [54]. Similar studies on SCFA, conducted by Maslovsky (2009), demonstrated the effect of acetate on the induction of neutrophil apoptosis, but, unlike the Aoyama (2010) studies, they indicated the direct involvement of the FFAR2 receptor in this process [55,56]. Some of the findings indicate the involvement of SCFA in the infectious process. Thus, scientists, who used a subcutaneous model of opportunistic infection, caused by pathogenic microorganisms *A. actinomycetemcomitans*, demonstrated that the presence of SCFA did not affect the number of leukocytes, but they reduced significantly the production of cytokines, phagocytic activity and caused the death of bacteria, but did not lead to a change in effector mechanisms of neutrophils. A similar effect that was not associated with the activation of FFAR2 and the main SCFA receptor expressed on the surface of neutrophils was also observed in the stimulation of neutrophils by bacteria, which may have been due to the inhibition of histone deacetylases [57–59]. Of particular interest are the results of studies obtained by Brinkmann (2004), who showed that the infection of *S. typhimurium*

Table 1. Average number of Sytox⁺ -neutrophils and NETs in scrapings from the intestinal mucosa and in the rat blood (Total Density (mean) + S.E.M.) in the field of view

Cells	Control	Vancomycin	<i>S. enteritidis</i> + Vancomycin	<i>S. typhimurium</i> + Vancomycin
Sytox ⁺ intestines	17.2 ± 1.9	26.7 ± 2.5 ^a	34.6 ± 1.9 ^b	63.0 ± 3.7 ^b
NETs intestines	8.7 ± 0.8	8.1 ± 0.8	7.0 ± 1.0	4.9 ± 0.4 ^b
Sytox ⁺ blood	12.2 ± 1.0	30.0 ± 1.6 ^a	25.6 ± 3.7	39.0 ± 2.9 ^b
NETs blood	7.6 ± 0.7	5.0 ± 2.4	6.2 ± 0.5	5.0 ± 0.8

^a: reliability of differences in the parameters of $P < 0.05$ relative to the control group; ^b: reliability of differences in the parameters of $P < 0.05$ in relation to the Vancomycin group.

Table 2. Determination of the average number of Sytox⁺ neutrophils and NETs cells in rats upon administration of *S. enteritidis*, *S. typhimurium* and *B. fragilis* against the background of vancomycin pretreatment (Total Density (mean) + S.E.M.) in the field of view

Cells	<i>S. enteritidis</i> + Vancomycin	<i>S. typhimurium</i> + Vancomycin	<i>S. enteritidis</i> + Vancomycin + <i>B. fragilis</i>	<i>S. typhimurium</i> + Vancomycin + <i>B. fragilis</i>
Sytox ⁺ intestines	34.6 ± 1.9	63.0 ± 3.7	19.7 ± 1.6*	29.7 ± 2.8*
NETs intestines	7.0 ± 1.0	4.9 ± 0.4	10.0 ± 1.0*	11.4 ± 1.9*
Sytox ⁺ blood	25.6 ± 3.7	39.0 ± 2.9	13.8 ± 1.9*	16.3 ± 1.9*
NETs blood	6.2 ± 0.5	5.0 ± 0.8	8.7 ± 0.9*	9.8 ± 1.2*

*: the reliability of differences in the parameters of $p < 0.05$ in relation to the groups *S. enteritidis* + Vancomycin and *S. typhimurium* + Vancomycin.

Table 3. Determination of the average content of SCFA in the luminal microflora of rats, g/ml

SCFA	<i>S. typhimurium</i> + Vancomycin	<i>S. typhimurium</i> + Vancomycin + <i>B. fragilis</i>
Acetate	1.1 × 10 ⁻³	2.3 × 10 ⁻³
Propionate	4.0 × 10 ⁻⁶	2.3 × 10 ⁻⁵
Butyrate	2.0 × 10 ⁻⁶	6.0 × 10 ⁻⁶

*: the reliability of differences in the parameters of $P < 0.05$ in relation to the group *S. typhimurium* + Vancomycin.

and *S. enteritidis*, the main agents of gastroenteritis development, against the background of the dysbiotic changes in the intestinal microflora, can enhance the formation of NETs due to the action of superoxidizedismutase [60–62].

Conclusions

1. The administration of vancomycin caused an increase in the number of Sytox⁺ cells in scrapings of the ileal mucosa and in the blood of rats. In pre-treatment of animals with vancomycin and infection of *S. enteritidis* and *S. typhimurium*, there was also an increase in the content of Sytox⁺ cells in scrapings from the ileal mucosa and in the blood, and the number of NETs decreased. The administration of *B. fragilis* to experimental animals receiving *S. enteritidis* and *S. typhimurium* against the background of vancomycin pretreatment leads to a decrease in the number of Sytox⁺ cells in scrapings from the ileal mucosa and in the blood, but induces the generation of NETs, which increases significantly the effectiveness of phagocytosis in the development of gastroenteritis salmonella etiology.

2. The conducted chromatography-mass spectrometric analysis showed that the administration of *B. fragilis* to animals pretreated with vancomycin followed by infection with *S. typhimurium* causes an increase in the level of SCFA concentration, which contributes to a decrease

in salmonella-induced inflammation and restoration of intestinal epithelial integrity.

Prospects for further research are the study of the transcriptome of the immune response genes in the intestinal lymphoid tissue of rats with salmonella-induced inflammation.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Information about authors:

Bukina Yu. V., Assistant of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Varynskyi B. O., PhD, Associate Professor of the Department of Physical and Colloidal Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Voitovich A. V., PhD, Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Koval G. D., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology, HSEE of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi.

Kaplaushenko A. G., Dr.hab., Associate Professor, Head of the Department of Physical and Colloidal Chemistry, 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:

Букіна Ю. В., асистент каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Варинський Б. О., канд. фарм. наук, доцент каф. фізіологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Войтович О. В., канд. біол. наук, старший викладач каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Коваль Г. Д., д-р мед. наук, доцент, професор каф. клінічної імунології, алергології та ендокринології, ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Каплаушенко А. Г., д-р фарм. наук, доцент, зав. каф. фізіологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Камішний О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Букина Ю. В., ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Варинский Б. А., к-т фарм. наук, доцент каф. физиологической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Войтович А. В., канд. биологических наук, старший преподаватель каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Коваль Г. Д., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. клинической иммунологии, алергологии и эндокринологии, ВГУЗ Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Каплаушенко А. Г., д-р фарм. наук, доцент, зав. каф. физиологической химии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 30.01.2018

Після доопрацювання / Revised: 23.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 02.03.2018

References

- [1] Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., et al. (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446–450. doi: 10.1038/nature12721.
- [2] Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly, Y. M., et al. (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341, 569–573. doi: 10.1126/science.1241165.
- [3] Masui, R., Sasaki, M., Funaki, Y., Ogasawara, N., Mizuno, M., Iida, A., et al. (2013) G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflammatory bowel diseases*, 19, 2848–2856. doi: 10.1097/01.MIB.0000435444.
- [4] Pluznick, J. A. (2014) Novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes*, 5, 202–207. doi: 10.4161/gmic.27492.
- [5] Bukina, Yu. V., Kamyshnyi, A. M., Polishchuk, N. N., & Topol, I. A. (2017) Salmonella-inducirovannye izmeneniya kishhechnoj mikrobioty i transkriptoma genov immunnogo otveta na fone vvedeniya vankomicina i Bacteroides fragilis [Salmonella-induced changes in the gut microbiota and immune response genes transcriptome during administration of vancomycin and Bacteroides fragilis]. *Pathologia*, 14, 1(39), 12–19. [in Russian]. doi: https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.1.97504.
- [6] Pieterse, E., Rother, N., Yanginlar, C., Hilbrands, L. B., & Vlag van der, J. (2016) Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*, 7, 484. doi: 10.3389/fimmu.2016.00484.
- [7] Dąbrowska, D., Jabłońska, E., Garley, M., Ratajczak-Wrona, W., & Iwaniuk, A. (2016) New Aspects of the Biology of Neutrophil Extracellular Traps. *Scandinavian Journal of Immunology*, 84, 317–322. doi: 10.1111/sji.12494.
- [8] Remijsen, Q., Kuijpers, T., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 581–588. doi: 10.1038/cdd.2011.1.
- [9] Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012) Neutrophil extracellular traps: Double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2689–2695. doi: 10.4049/jimmunol.1201719.
- [10] Von Köckritz-Blickwede, M., & Nizet, V. (2009) Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *Journal of Molecular Medicine*, 87(8), 775–783. doi: 10.1007/s00109-009-0481-0.
- [11] Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. *Cell Microbiology*, 8(4), 668–676. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x.
- [12] Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., et al. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. *PLoS Pathology*, 5(10), e1000639. doi: 10.1371/journal.ppat.1000639.
- [13] Arazna, M., Pruchniak, M. P., & Demkow, U. (2013) Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: Strategies for escaping from killing. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 187(1), 74–77. doi: 10.1016/j.resp.2013.03.002.
- [14] Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytniuk, L. D., et al. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Natural Medicine*, 18(9), 1386–1393. doi: 10.1038/nm.2847.
- [15] Dworski, R., Simon, H.-U., Hoskins, A., & Yousefi, S. (2011) Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), 1260–1266. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1103.
- [16] Konstantinidis, T., Kambas, K., Mitsios, A., Panopoulou, M., Tsiro-nidou, V., Dellaporta, E., et al. (2015) Immunomodulatory Role of Clarithromycin in Acinetobacter baumannii Infection via Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 1040–1048. doi: 10.1128/AAC.02063-15.
- [17] Jagtap, A. G., Shirke, S. S., & Phadke, A. S. (2004) Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2–3), 195–204. doi: 10.1016/j.jep.2003.09.042.
- [18] Loginov, V. A., Ardatskaya, M. D., & Minushkin, O. N. (2014) Syndrome of excessive bacterial growth in patients with a decreased acid-producing function of the stomach. *Experimental and clinical gastroenterology*, 12, 30–36.
- [19] Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A. O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov L, et al. (2010) CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Natural Medicine*, 16, 1018–1023. doi: 10.1038/nm.2209.
- [20] Dubois, A. V., Gauthier, A., Bréa, D., Varaigne, F., Diot, P., Gauthier, F., & Attucci, S. (2012) Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47, 80–86. doi: 10.1165/rmb.2011-0380OC.
- [21] Delgado-Rizo, V., Martínez-Guzmán, M. A., Iñiguez-Gutiérrez, L.,

- García-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A., & Fafutis-Morris, M. (2017) Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Frontiers in Immunology*, 8, 81. doi: 10.3389/fimmu.2017.00081.
- [22] Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., et al. (2015) A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology*, 185(12), 7413–7425. doi: 10.4049/jimmunol.1000675.
- [23] Al-Khafaji, A. B., Tohme, S., Yazdani, H. O., Miller, D., Huang, H., & Tsung, A. (2016) Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. *Molecular Medicine*, 22, 621–631. doi: 10.2119/molmed.2016.00054.
- [24] Lewis, H. D., Liddle, J., Coote, J. E., Atkinson, S. J., Barker, M. D., Bax, B. D., et al. (2015) Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nature Chemical Biology*, 11(3), 189–191. doi: 10.1038/nchembio.1735.
- [25] Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., & Wang, Y. (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, 207, 1853–1862. doi: 10.1084/jem.20100239.
- [26] Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. doi: 10.1083/jcb.201006052.
- [27] Neeli, I., Khan, S. N., & Radic, M. (2008) Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *Journal of Immunology*, 180, 1895–1902. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1895.
- [28] Branitzki-Heinemann, K., Möllerherm, H., Völlger, L., Husein, D. M., Buhr, de N., Blodkamp, S., et al. (2016) Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level. *Frontiers in Immunology*, 7, 518. doi: 10.3389/fimmu.2016.00518.
- [29] Douda, D. N., Khan, M. A., Grasmann, H., & Palaniyar, N. (2015) SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(9), 2817–2822. doi: 10.1073/pnas.1414055112.
- [30] Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013) NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(16), 2784–2794. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671.
- [31] Byrd, A. S., O'Brien, X. M., Johnson, C. M., Lavigne, L. M., & Reichner, J. S. (2013) An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *Journal of Immunology*, 190(8), 4136–4148. doi: 10.4049/jimmunol.1202671.
- [32] Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., et al. (2007) TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*, 13(4), 463–469. doi: 10.1038/nm1565.
- [33] Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytnik, L. D., et al. (2012) Dynamic NETosis is carried out by live neutrophils in human and mouse bacterial abscesses and during severe gram-positive infection. *Nature Medicine*, 18(9), 1386–1393. doi: 10.1038/nm.2847.
- [34] Carestia, A., Kaufman, T., Rivadeneyra, L., Landoni, V. I., Pozner, R. G., Negrotto, S., et al. (2016) Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(1), 153–162. doi: 10.1189/jlb.3A0415-161R.
- [35] Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., & Simon, H. U. (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation*, 16, 1438–1444. doi: 10.1038/cdd.2009.96.
- [36] Sørensen, O. E., & Borregaard, N. (2016) Neutrophil extracellular traps – the dark side of neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 126(5), 1612–1620. doi: 10.1172/JCI84538.
- [37] Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2016) NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta*, 459, 89–93. doi: 10.1016/j.cca.2016.05.029.
- [38] de Buhr, N., & von Köckritz-Blickwede, M. (2016) How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of Immunology Research*, 3, 1–13. doi: 10.1155/2016/4604713.
- [39] Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. (2016) Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4), e73. doi: 10.1038/cti.2016.17.
- [40] Rodrigues, H. G., Takeo Sato, F., Curi, R., & Vinolo, M. A. (2016) Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *European Journal of Pharmacology*, 785, 50–58. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.098.
- [41] Vinolo, M. A., Rodrigues, H. G., Hatanaka, E., Sato, F. T., Sampao, S. C., & Curi, R. (2011) Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(9), 849–855. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.009.
- [42] Vinolo, M. A., Ferguson, G. J., Kulkarni, S., Damoulakis, G., Anderson, K., Bohlooly, Y. M., et al. (2011) SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS ONE*, 6(6), e21205. doi: 10.1371/journal.pone.0021205.
- [43] Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007) Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(20), 2826–2832. doi: 10.3748/wjg.v13.i20.2826.
- [44] Sina, C., Gavrilova, O., Förster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., et al. (2009) G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *Journal of Immunology*, 183(11), 7514–7522. doi: 10.4049/jimmunol.0900063.
- [45] Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., et al. (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25481–25489. doi: 10.1074/jbc.M301403200.
- [46] Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Schilter, H. C., et al. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461(7268), 1282–1286. doi: 10.1038/nature08530.
- [47] Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., et al. (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446–50. doi: 10.1038/nature12721.
- [48] Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly, Y. M., et al. (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–73. doi: 10.1126/science.1241165.
- [49] Vinolo, M. A., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., Curi, R. (2011) Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3(10), 858–876. doi: 10.3390/nu3100858.
- [50] Vinicius, A. O., Câmara, N. O. S., & Moraes-Vieira, M. P. (2015) Adipokines as Drug Targets in Diabetes and Underlying Disturbances. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 11. doi: http://dx.doi.org/10.1155/2015/681612.
- [51] Mishiro, T., Kusunoki, R., Otani, A., Ansary, M. M., Tongu, M., Harashima, N., et al. (2013) Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Laboratory Investigation*, 93(7), 834–843. doi: 10.1038/labinvest.2013.70.
- [52] Kim, M., Qie, Y., Park, J., & Kim, C. H. (2016) Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host & Microbe*, 20(2), 202–214. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.001.
- [53] Mills, S. W., Montgomery, S. H., & Morck, D. W. (2006) Evaluation of the effects of short-chain fatty acids and extracellular pH on bovine neutrophil function in vitro. *American Journal of Veterinary Research*, 67(11), 1901–1907. doi: 10.2460/ajvr.67.11.1901.
- [54] Usami, M., Kishimoto, K., Ohata, A., Miyoshi, M., Aoyama, M., Fue-da, Y., & Kotani, J. (2008) Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition Research*, 28(5), 321–8. doi: 10.1016/j.nutres.2008.02.012.
- [55] Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Schilter, H. C., et al. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461(7268), 1282–1286. doi: 10.1038/nature08530.
- [56] Aoyama, M., Kotani, J., & Usami, M. (2010) Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*, 26(6), 653–61. doi: 10.1016/j.nut.2009.07.006.
- [57] Papayannopoulos, V. (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134–147. doi: 10.1038/nri.2017.105.
- [58] Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I., Shpigel, N. Y. (2008) Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infectious Immunology*, 76(6), 2802–2807. doi: 10.1128/IAI.00051-08.
- [59] Corrêa, R. O., Vieira, A., Sernaglia, E. M., Lancellotti, M., Vieira, A. T., Avila-Campos, M. J., et al. (2017) Bacterial short-chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. *Cellular Microbiology*, 19(7), e12720. doi: 10.1111/cmi.12720.
- [60] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385.
- [61] Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009) Salmonella – the ultimate insider Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 11(11), 1579–1586. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x.
- [62] Pacello, F., Ceci, P., Ammendola, S., Pasquali, P., Chiancone, E., & Battistoni, A. (2008) Periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps concur in protecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from extracellular reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(2), 226–232. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.12.001.

Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом

В. А. Туманский, С. В. Фень

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Ключевые слова:
стеатогепатит,
цирроз печени,
биопсия.

**Патология. – 2018. –
Т. 15, № 1(42). –
С. 18–28**

DOI:
10.14739/2310-1237.
2018.1.129316

E-mail:
Alchimik1989@
gmail.com

До последнего времени среди патоморфологов и гепатологов продолжается дискуссия о механизмах развития и биологической роли дуктулярной реакции (ДР), развивающейся у больных хроническими заболеваниями печени.

Цель работы – с использованием иммуногистохимических (ИГХ) методик охарактеризовать в гепатобиоптатах патоморфологические особенности и значение ДР при циррозе печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом.

Материалы и методы. В биоптатах печени проведено гистологическое (ГЛ), гистохимическое (ГХ) и ИГХ исследование ДР при циррозе печени у 13 больных неалкогольным стеатогепатитом, 13 больных алкогольным стеатогепатитом, 10 больных хроническим вирусным гепатитом С, а также ГЛ и ГХ исследование ДР у 8 больных тяжелым билиостазом и 8 больных фокальной нодулярной гиперплазией печени.

Результаты. При циррозе печени у больных хроническим гепатитом ДР реакция установлена в активной фазе с максимальными, умеренными или слабыми проявлениями; у значительного числа больных отмечена фаза отдаленных последствий ДР печени. Активная фаза ДР характеризуется появлением на периферии печеночных долек в проекции каналов Геринга, в фиброзной портально-септальной и субкапсулярной ткани печени реактивных клеточных цепочек, клеточных скоплений и дуктул с клетками на разных стадиях дифференцировки: с иммунофенотипом прогениторных клеток печени (с-kit CD117+, CD34+, CD56+, CD44 Std./HCAM+, α-FTP+, СК7-, СК19-, Нераг-), промежуточных гепатобилиарных СК7+ клеток, клеток билиарной (СК7+, СК19+) и гепатоцитарной (Нераг+, α-FTP+) дифференцировки. В клетках реактивных дуктул и клеточных цепочек отсутствуют фигуры митоза или повышенный уровень экспрессии Ki-67. В реактивных клеточных цепочках и дуктулах промежуточных и центральных зон печеночных долек доминируют клетки бифазной (билиарной (СК7+, СК19+), гепатоцитарной (Нераг+)) дифференцировки и промежуточные гепатобилиарные СК7+ клетки. Гепатоцитарной дифференцировке прогениторных клеток способствует наличие ламинина в нишах прогениторных клеток и экспрессия ламинина перисинусоидальными звездчатыми клетками в дольках печени. В активной фазе ДР появляются новые печеночные псевдодольки, содержащие на периферии малочисленные промежуточные СК-7+ гепатоциты, без наличия централобулярных вен и упорядоченных синусоидов. В фиброзной портально-септальной и субкапсулярной ткани среди коллагеновых волокон I, III, IV типа и отростков α-SMA+ миофибробластов также отмечено множество клеточных цепочек и дуктул из СК7+, СК19+ клеток, а также малочисленные цепочки с наличием Нераг+ и α-FTP+ клеток. Когда площадь печеночных долек и псевдодоек при тяжелом микронодулярном циррозе печени становится равной или меньшей площади окружающего их фиброза, имеет место параллельное возрастание числа Ki-67+ клеток в портально-дольковых дуктулах и цепочках, а также числа Ki-67+ гепатоцитов в печеночных дольках и псевдодольках. Отдаленные последствия ДР при циррозе печени отражает наличие среди коллагеновых волокон фиброзной портально-септальной и субкапсулярной ткани множества сформированных из СК7+ эпителия дуктул, не содержащих желчи, а также наличие псевдодоек и нечетко очерченных очагов гиперплазии гепатоцитов без упорядоченно ориентированных синусоидов в дольках печени без реактивных клеточных цепочек и дуктул.

Выводы. ДР при циррозе печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом представляет собой процесс активации и эволюции репаративного комплекса печени, направленного на восполнение дефицита гепатоцитов и билиарных структур. Репаративный процесс при циррозе печени с глубоко нарушенным портально-дольковым межклеточным матриксом завершается образованием функционально малоценных гепатоцеллюлярных псевдодоек и избытка билиарных дуктул в полях портально-септального фиброза.

Ключові слова:
стеатогепатит,
цироз печінки,
біопсія.

**Патологія. – 2018. –
Т. 15, № 1(42). –
С. 18–28**

Дуктулярна реакція, або печінковий репаративний комплекс: імуногістохімічні особливості при цирозі печінки у хворих на хронічний гепатит

В. О. Туманський, С. В. Фень

До останнього часу серед патоморфологів і гепатологів триває дискусія про механізми розвитку та біологічну роль дуктулярної реакції (ДР), що розвивається у хворих на хронічні захворювання печінки.

Мета роботи – з використанням імуногістохімічних (ИГХ) методик охарактеризувати в гепатобиоптатах патоморфологічні особливості та значення ДР реакції при цирозі печінки у хворих на хронічний неалкогольний, алкогольний і вірусний гепатит.

Матеріали та методи. У біоптатах печінки виконали гістологічне (ГЛ), гістохімічне (ГХ) і ИГХ дослідження ДР при цирозі печінки у 13 хворих на неалкогольний стеатогепатит, 13 хворих на алкогольний стеатогепатит, 10 хворих на хронічний вірусний гепатит С, а також ГЛ і ГХ дослідження ДР у 8 хворих на важкий біліостаз і 8 хворих на фокальну нодулярну гіперплазію печінки.

Результати. При цирозі печінки у хворих на хронічний гепатит ДР реакція встановлена в активній фазі з максимальними, помірними або слабкими проявами, у чималій кількості хворих виявлена фаза віддалених наслідків ДР печінки. Активна фаза ДР характеризується появою на периферії печінкових дольок у проекції каналців Герінга, у фіброзній портально-септальній і субкапсулярній тканині печінки реактивних клітинних ланцюжків, клітинних скупчень і дуктул із клітинами на різних стадіях диференціювання: з імунотипом прогеніторних клітин печінки (c-kit CD117+, CD34+, CD56+, CD44 Std./HCAM+, α-FTP+, СК7-, СК19-, Hepar-), проміжних гепатобіліарних СК7+ клітин, клітин біліарного (СК7+, СК19+) і гепатоцитарного (Hepar+, α-FTP+) диференціювання. У клітинах реактивних дуктул і клітинних ланцюжків відсутні фігури мітозу або підвищений рівень експресії Ki-67. У реактивних клітинних ланцюжках і дуктулах проміжних і центральних зон печінкових дольок домінують клітини біфазного (біліарного (СК7+, СК19+), гепатоцитарного (Hepar+)) диференціювання і проміжні гепатобіліарні СК7+ клітини. Гепатоцитарному диференціюванню прогеніторних клітин сприяє наявність ламініну в нішах прогеніторних клітин та експресія ламініну перисинусоїдальними зірчастими клітинами в дольках печінки. В активній фазі ДР з'являються нові печінкові псевдодольки, котрі містять на периферії проміжні СК7+ гепатоцити, без наявності центролобулярних вен та упорядкованих синусоїдів. У фіброзній портально-септальній і субкапсулярній тканині серед колагенових волокон I, III, IV типу й відростків α-SMA+ міофібробластів також визначили велику кількість клітинних ланцюжків і дуктул із СК7+, СК19+ клітин, а також нечисленні ланцюжки з наявністю Hepar+ і α-FTP+ клітин. Коли площа печінкових дольок і псевдодольок при тяжкому мікронодулярному цирозі печінки дорівнює або стає меншою за площу прилеглого до них фіброзу, відбувається паралельне збільшення кількості Ki-67+ клітин у портально-долькових дуктулах і ланцюжках, а також числа Ki-67+ гепатоцитів у печінкових дольках і псевдодольках. Віддалені наслідки ДР при цирозі печінки показує наявність серед колагенових волокон фіброзної портально-септальної, субкапсулярної тканини множинних, сформованих з СК7+ епітелію дуктул, що не містять жовчі, а також наявність псевдодольок і нечітко окреслених вогнищ гіперплазії гепатоцитів без впорядковано орієнтованих синусоїдів у дольках печінки без реактивних клітинних ланцюжків і дуктул.

Висновки. ДР при цирозі печінки у хворих на хронічний неалкогольний, алкогольний і вірусний гепатит є процесом активації та еволюції складного репаративного комплексу печінки, що спрямований на поповнення дефіциту гепатоцитів і біліарних структур. Репаративний процес при цирозі печінки з глибоко порушеним портально-дольковим міжклітинним матриксом завершується формуванням нових, функціонально малоцінних гепатоцелюлярних псевдодольок і надлишку біліарних дуктул у полях портально-септального фіброзу.

Ductular reaction or hepatic reparative complex: immunohistochemical features in liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis

V. A. Tumanskiy, S. V. Fen'

Until recently, a discussion about the mechanisms of development and the biological role of the ductular reaction, which develops in patients with chronic liver diseases continues among hepatologists and pathomorphologists.

Purpose of the study. To characterize the pathomorphological features and significance of the ductular response in liver cirrhosis in patients with chronic non-alcoholic, alcoholic and viral hepatitis in hepatobioptats with the use of immunohistochemical (IHC) techniques.

Material and methods of investigation. Histological, histochemical and IHC study of the ductular liver reaction in liver biopsies of 52 patients aged 24 to 66 years with cirrhosis of the liver on the background of non-alcoholic steatohepatitis (13 patients), and alcoholic steatohepatitis (13 patients) and on the background of chronic viral hepatitis C (10 patients, 26–47 years), as well as those suffering from severe bilioptosis (8 patients) and focal nodular liver hyperplasia (8 patients).

Results. The ductular reaction can be detected in the active phase with maximum manifestations in patients with liver cirrhosis on the background of chronic hepatitis, it may have an average or weak degree of severity; in a significant number of patients, the effects of the ductular reaction of the liver are revealed. Cellular chains and groups of cells with the immunophenotype of the progenitor cells of the liver appear in the active phase of the ductular reaction at the periphery of the hepatic lobules in the projection of the Goering canals, in the fibrotically altered portal tracts, in the subcapsular zone of the liver and in the thickened fibrosis septa (c-kit CD117+, CD34+, CD56+ СК7-, СК19-, Hepar-) without presence of figures of mitosis or increased level of expression of Ki-67 in them. In small ductules localized in the projection of the Goering canals, single cells with the expression of c-kit CD 117+, CD44 Std./HCAM+, CD34+, CD56+, expressing the markers of biliary (СК7+, СК19+) and hepatocyte (Hepar+, α-fetoprotein+) differentiation are revealed. Cellular chains and ductules in the intermediate zones of the hepatic lobules are represented by cells of biphasic differentiation: biliary (СК7+, СК19+), hepatocyte (Hepar+) differentiation and intermediate hepatobiliary СК7+ cells. Hepatocyte differentiation of progenitor cells in lobules of the liver is facilitated by local expression of laminin by perisinusoidal stellate cells. New pseudolobes arise in the active phase of the ductular reaction in the lobes with perisinusoidal pericellular fibrosis from disorderly located large hepatocytes without linear perisinusoid spaces and centrolobular veins, with the presence of "intermediate" СК7+ hepatocytes on the periphery. One-two-row chains and ductules from СК7+ and СК19+ cells dominate in the fibro-altered portal tracts, septa and the subcapsular zone of the liver among the collagen fibers of I, III, IV type and the processes of α-SMA+ myofibroblasts, and small short chains from Hepar+ and α-fetoprotein-cells. When the severity of micronodular liver cirrhosis increases, when the area of hepatic lobules and pseudotypes becomes equal to or less than the area of the surrounding fibrosis, there is a parallel increase in the number of Ki-67+ cells in portal-lobular ductules and chains, as well as the number of Ki-67+ hepatocytes in hepatic lobules and pseudolobes. The long-term consequences of the ductular reaction in liver cirrhosis reflect the presence of the different number of bile-free ductules with СК7+ epithelium in the fibrous tissue of portal tracts, septa and under the liver capsule. In the lobules of the liver with perisinusoidal pericellular fibrosis, fuzzy outlines of hepatocyte hyperplasia without ordered sinusoids and liver-celled beams are found.

Key words:
steatohepatitis,
liver cirrhosis,
biopsy.

Pathologia
2018; 15 (1), 18–28

Conclusions. The ductular reaction in liver cirrhosis in patients with chronic non-alcohol, alcoholic and viral hepatitis is the process of activation and evolution of a complex liver repair complex aimed at replenishing the deficit of hepatocytes and biliary structures. The reparative process, activating by liver cirrhosis on the background of the disturbed portal-lobular intercellular matrix and the progressive deficit of hepatocytes, does not provide the reconstruction of full-fledged liver structures, it is discordant towards the creation of new, functionally low-value hepatocellular pseudolobes and the accumulation of biliary terminals in fields of portal-septal fibrosis.

Дуктулярная реакция (ДР) в печени человека, впервые описанная Н. Popper, G. Kent, R. Stein в 1957 г., – своеобразный ответ печени на дефицит гепатоцитов и холангиол при хроническом неалкогольном и алкогольном гепатите, хроническом вирусном гепатите, тяжелом билиостазе и циррозе печени [1]. Дуктулярная реакция представляет собой стереотипное гистологическое проявление генерации «печеночной репаративной системы» – динамического многоклеточного морфофункционального комплекса, в котором дуктулярные эпителиальные клетки, развивающиеся в виде цепочек вдоль краев портального тракта, приобретают реактивный фенотип, характеризующийся экспрессией *de novo* множества цитокинов, хемокинов, факторов роста и ангиогенных факторов в сочетании с богатым рецепторным оснащением [1,2]. «Печеночный репаративный комплекс» составляют прогениторные клетки печени, промежуточные гепатобилиарные клетки и реактивные дуктулярные клетки [3]. В изучении дуктулярной реакции преобладают экспериментальные исследования, выполненные на грызунах, моллюсках, аквариумных рыбках и в клеточных культурах, меньшую часть составляют патоморфологические исследования печени больных хроническими гепатитами, холангиопатиями и некротическими поражениями печени [3–8].

Основными эффекторными клетками, которые реагируют на хроническое повреждение печени, являются прогениторные клетки печени и дуктулярные реактивные клетки [1]. Прогениторные клетки печени, локализованные в нише канальцев Геринга, представляют собой бипотенциальные клетки, способные амплифицироваться и дифференцироваться в клетки гепатоцеллюлярной или билиарной линии [5]. В нише печеночные прогениторные клетки тесно взаимосвязаны со звездчатыми клетками, макрофагами и внеклеточным матриксом.

Прогениторные клетки печени содержат смесь редких стволовых клеток, транзиторно амплифицированных эпителиальных клеток и дифференцированных клеток. В 2004 г. были выделены три эпителиальных фенотипа: печеночные прогениторные клетки, промежуточные гепатобилиарные клетки и реактивные дуктулярные клетки [4]. В популяции прогениторных клеток некоторые клетки экспрессируют маркеры билиарного эпителия (СК-7, СК-8, СК-18, СК-19), некоторые экспрессируют α -фетопротейн незрелых фетальных гепатобластов, некоторые экспрессируют один или несколько маркеров стволовых клеток, таких как *kit*/CD117, CD34, Sca-1, Sox9 и Thy1/CD90. Эти клетки также экспрессируют молекулы адгезии нейронных клеток (NCAM), промиллин 1 (CD133), теломеразу и молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM) [9]. Клетки реактивных дуктул экспрессируют нейроэндокринные маркеры (хромогранин А, МЗ

Ach-R, нейрогенный фактор роста, 1A/1B рецепторы серотонина, β 1/ β 2-адренэргические рецепторы), молекулы межклеточной адгезии (NCAM, ICAM-1, CD40, MHC-II), цитокины и хемокины (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, CINC, SDF-1), факторы роста (VEGF, angiopoietins, HGF, PDGF-BB, CTGF, ET1, TGF β 2, IGF-1), рецепторы (VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-2, CXCR4, IGF1R, T β RII) и другие метаболически активные молекулы (Bcl-2, NO), которые временно экспрессируют клетки дуктуальной пластинки во время эмбрионального развития [3]. У людей прогениторные клетки печени, экспрессирующие EPCAM, NCAM, CXCR4 и CD44, способны к бипотенциальной дифференцировке в гепатоциты и в холангиоциты [5].

Установлено, что пролиферацию и активацию прогениторных клеток печени при прогрессировании неалкогольного стеатогепатита могут спровоцировать длительный апоптоз гепатоцитов и остановка клеточного цикла, вызванная окислительным стрессом [6]. В итоге клеточные компоненты «печеночного репаративного комплекса» созревают в дифференцированные билиарные протоки и в гепатоциты или могут регрессировать апоптозом после прекращения повреждения печени [10]. С другой стороны, дуктулярная реакция и сопровождающая воспалительная реакция в печени играют важную роль в развитии портального и перипортального фиброза. Дуктулы продуцируют и секретируют цитокины и хемокины, включая TNF α , IL-6, IL-8, хемотаксические белки-1 (MCP-1) и оксид азота (NO), которые потенцируют воспалительную реакцию и сопутствующий фиброз [11]. В процессе дуктулярной реакции активируется выделение трансформирующего фактора роста- β и тромбобитарного фактора роста, которые, в свою очередь, активируют портальные миофибробласты к синтезу коллагена 1 типа [12]. Центролобулярная дуктулярная реакция при неалкогольном стеатогепатите коррелирует со стадией прогрессии фиброза печени [8].

Поэтому взгляды патоморфологов и гепатологов на биологическую роль ДР печени разделились: одни исследователи считают ее репаративным процессом при хронических заболеваниях печени [10], другие – неспецифическим ответом терминалей билиарного дерева на хроническое повреждение печени с дифференцировкой печеночных прогениторных клеток в холангиоциты [13], третьи – предиктором билиарного фиброза и прогрессирования стеатогепатита [8].

Цель работы

С использованием иммуногистохимических методик охарактеризовать в гепатобиоптатах патоморфологические особенности и значение дуктулярной реакции при циррозе печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом.

Материалы и методы исследования

Проведено гистологическое (ГЛ), гистохимическое (ГХ) и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование дуктулярной реакции печени в лапароскопических биоптатах и трепанобиоптатах печени при микронодулярном портально-септальном и перисинусоидально-periцеллюлярном циррозе печени у 13 больных неалкогольным стеатогепатитом (45–66 лет), 13 больных алкогольным стеатогепатитом (32–66 лет) и 10 больных хроническим вирусным гепатитом С (26–47 лет), а также ГЛ и ГХ анализ биоптатов печени 272 больных циррозом печени, который развился на фоне хронического алкогольного, неалкогольного и вирусного гепатита. В группах сравнения изучены ГЛ и ГХ особенности дуктулярной реакции у 8 пациентов 24–52 лет, страдавших тяжелым билиостазом, и у 8 пациентов 39–55 лет с фокальной нодулярной гиперплазией печени.

Для патоморфологического исследования биопсийный материал печени фиксировали в забуференном 10 % формалине и заливали в парафин. С учетом клинико-лабораторных данных в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, методом Ван Гизона и Массон-трихром, диагностировали тип хронического гепатита (вирусный, неалкогольный, алкогольный) и цирроза печени, особенности дуктулярной реакции печени, а также наличие фокальной нодулярной гиперплазии печени и тяжелого внутрипеченочного билиостаза.

ИГХ-исследования выполняли в серийных парафиновых срезах печени непрямым иммунопероксидазным методом с использованием моноклональных антител (АТ) и системы визуализации DAKO EnVision+ с диаминбензидином («ДАКО», Дания). Для установления прогениторных клеток печени использовали поликлональные АТ Polyclonal Ra a-Hu CD 117, c-kit («ДАКО», Дания), моноклональные АТ Mo a-Hu CD34, Clone QBEnd/10 («Thermo Scientific», США) и Mo a-Hu CD44 Std./HCAM Ab-4, Clone 156-3C11 («Thermo Scientific», США), а также Mo a-Hu CD56, Clone T199 («NeoMarkers», США). Для идентификации билиарных клеток применяли моноклональные АТ Mo a-Hu Keratin 7, Clone OV-TL 12/30 («Thermo Scientific», США) и Mo a-Hu Cytokeratine 19, Clone RCK 108 («ДАКО», США); для идентификации гепатоцитов – моноклональные АТ HepPar-1 Mo a-Hu Hepatocyte, Clone QBEnd/10 («Thermo Scientific», США) и поликлональные M Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein («Thermo Scientific», США). Оценку пролиферативной активности эпителиальных клеток дуктулярной реакции и гепатоцитов печени проводили с применением моноклональных АТ Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6 («Thermo Scientific», США). Для идентификации активированных перисинусоидальных звездчатых клеток и портальных миофибробластов использовали моноклональные АТ Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin (α-SMA), Clone 1A4 («ДАКО», Дания), Mo a-Hu Desmin, Clone D33, RTU («ДАКО», Дания). Для обнаружения молекулярно-волоконистых компонентов внеклеточного матрикса портальных трактов, фиброзных септ, долек и псевдодлек печени использовали поликлональные АТ к ламинину – Rb Laminin Ab-1 («Thermo Scientific», США), моноклональные АТ к коллагену I типа – Rb a-Hu Collagen type I, clone RAH

C11-0,1 («Имтек», РФ), к коллагену III типа – Rb a-Hu Collagen type III, clone RAH C33 («Имтек», РФ), к коллагену IV типа – Mo a-Hu Collagen type IV Ab-3, clone CIV 22 + PHM 12 («Thermo Scientific», США).

Результаты и их обсуждение

Проведенные ГЛ, ГХ и ИГХ исследования показали, что при микронодулярном циррозе печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом дуктулярная реакция в гепатобиоптатах может обнаруживаться в активной фазе с максимальными, умеренными и слабыми микроскопическими проявлениями. Кроме этого, у значительного числа больных отмечена фаза отдаленных последствий дуктулярной реакции печени.

Активная фаза ДР проявляется появлением на периферии печеночных долек в проекции канальцев Геринга ветвящихся цепочек из одного или двух рядов эпителиоподобных клеток размером до 8 мкм с овальными ядрами, переходящих в дуктулы с узким просветом, выстланные одним рядом аналогичных клеток. Рядом располагаются группы из 4–6 (иногда – более чем из 10) аналогичных клеток, которые в гистологических микропрепаратах наиболее вероятно представляют собой тангенциальные или поперечные срезы изгибов двухрядных клеточных цепочек и дуктул. Группы эпителиоподобных клеток, клеточные одно-двухрядные цепочки и дуктулы локализованы в аморфно-нежнволокнистом межклеточном матриксе, содержащем одиночные макрофаги, лимфоциты, фибробласты (рис. 1), и, в совокупности, являются микроскопическим проявлением раскрывшегося репаративного комплекса печени, или раскрывшейся ниши прогениторных клеток печени. По данным ИГХ исследований, активная фаза ДР отличается тем, что клеточные цепочки, клеточные скопления и дуктулы любой локализации содержат малочисленные клетки с иммунофенотипом прогениторных клеток печени (c-kit CD117+, CD34+, CD56+, CD44 Std./HCAM+, α-FTP+, СК7-, СК19-, Нераp-), а также одиночные клетки на разных стадиях гепатобилиарной дифференцировки: промежуточные гепатобилиарные СК7+ клетки бифазной билиарно-гепатоцитарной дифференцировки, клетки билиарной (СК7+, СК19+) и гепатоцитарной (Нераp+, α-FTP+) дифференцировки (рис. 2 А, Б, В, Г, 3 А, Б).

Печеночные прогениторные клетки у людей и мышей или овальные клетки у крыс описаны как небольшие овальные клетки со слабо базофильной цитоплазмой и бледно-синим ядром. Они представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которые активируются для пролиферации при разных патологических состояниях печени [9]. По данным M. Strazzabosco, L. Fabris [3], экспрессия c-kit CD 117+, CD44 Std./HCAM+, CD34+, CD56+ присуща клеткам со свойствами стволовых и прогениторных клеток печени. Одновременное наличие в ветвящихся клеточных цепочках и дуктулах прогениторных печеночных клеток, а также клеток на разных стадиях гепатобилиарной дифференцировки дает основание считать клеточные цепочки и дуктулы «реактивными» структурами активированного репаративного комплек-

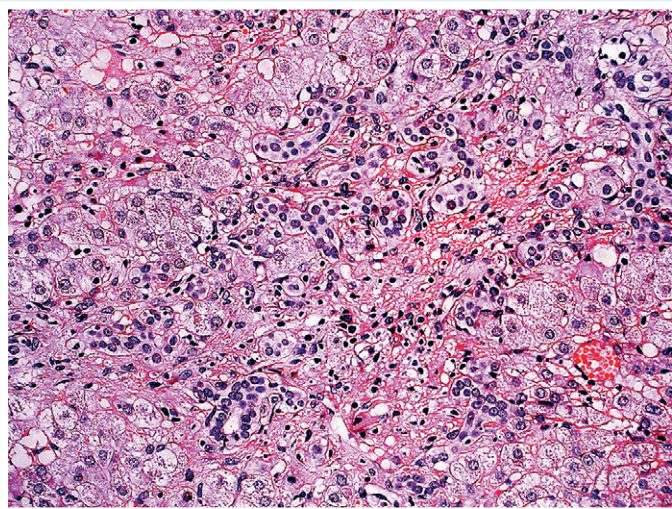


Рис. 1. Реактивные клеточные цепочки и дуктулы в нише прогениторных клеток при циррозе печени в активной фазе дуктулярной реакции. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: $\times 600$.

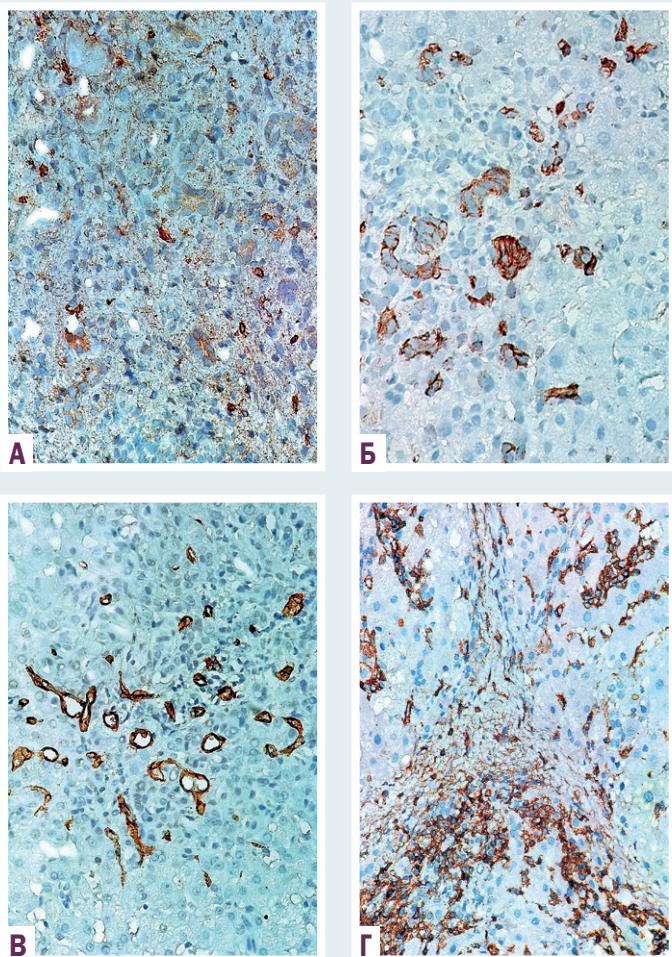


Рис. 2. А, Б, В, Г. Экспрессия в клетках реактивных дуктул и цепочек CD117_c-kit (А), CD56 (Б), CD34 (В) и CD44 Std./HCAM (Г) в активной фазе дуктулярной реакции печени.

А: Polyclonal Ra a-Human CD 117, c-kit. Б: Mo a-Hu CD56, clone T199.
 В: Mo a-Hu CD34, clone QBEnd/10. Г: Mo a-Hu CD44 Std./HCAM Ab-4, clone 156-3C11.
 Ув.: А, Б – $\times 300$, В, Г – $\times 200$.

са печени. Термин «реактивные» дуктулы и цепочки применяют и исследователи Т. А. Roskams et al. [4], М. Cadamuro et al. [1]. Ветвящиеся клеточные цепочки и дуктулы проникают в портальные тракты и вглубь печеночных долек к их центрлобулярным венам, поэтому при циррозе печени у больных хроническим гепатитом в активной фазе дуктулярной реакции клеточные цепочки, скопления эпителиоподобных клеток и дуктулы также обнаруживаются в фиброзно измененных портальных трактах и субкапсулярной зоне печени, в утолщенных фиброзных септах (рис. 3 В, Г).

В дольках печени фрагменты реактивных клеточных цепочек и дуктул обычно радиально ориентированы вдоль перисинусоидальных пространств по направлению к центрлобулярной вене. В клетках клеточных цепочек обращает внимание значительная мембранная экспрессия маркера межклеточной адгезии эпителиальных клеток CD44 Std./HCAM, свидетельствующая о значительной мобильности реактивных цепочечных структур. Вокруг большинства реактивных клеточных цепочек и дуктул нет утолщенных базальных мембран из коллагеновых волокон IV типа и из α -SMA-позитивных волокон, однако в цитоплазме и отростках звездчатых клеток, сопровождающих дуктулы, определяется экспрессия α -SMA. В реактивных клеточных цепочках и дуктулах промежуточных и центральных зон печеночных долек доминируют промежуточные гепатобилиарные клетки со слабой цитоплазматической экспрессией CK7, клетки бифазной билиарной (CK7+, CK19+) и гепатоцитарной (Heraг+, α -FTP-) дифференцировки, а также обнаруживают единичные CD56-позитивные клетки. Рядом с дуктулами нередко локализованы промежуточные гепатобилиарные клетки диаметром 8–30 микрон с умеренной цитоплазматической экспрессией CK7, структура которых в большей мере соответствует гепатоцитам (рис. 4). По данным Т. А. Roskams et al. [4], промежуточные гепатобилиарные клетки имеют диаметр более 6 микрон (приблизительный размер нормального наименьшего холангиоцита канала Геринга), но менее 40 микрон (типичный размер гепатоцита). Промежуточные гепатобилиарные клетки характеризуются промежуточным фенотипом между холангиоцитами и гепатоцитами, лишены экспрессии CK19, но положительными для CK7, который обычно отсутствует у зрелых гепатоцитов [3].

Установлено, что прогениторные клетки печени дифференцируются в гепатоциты через промежуточные гепатобилиарные клетки, тогда как дифференцировка в билиарные клетки происходит через генерацию реактивных дуктулярных клеток [14]. На дифференцировку прогениторных клеток влияет клеточно-клеточная сигнализация между прогениторными клетками, звездчатыми клетками и макрофагами через Wnt и Notch пути [15]. При билиарной дифференцировке экспрессия Jagged 1 миофибробластами усиливает Notch-сигнализацию в прогениторных клетках и их дифференцировку в холангиоциты; при снижении Notch сигналов и активации секреции Wnt3a макрофагами прогениторные клетки могут параллельно дифференцироваться в гепатоциты [12, 16]. Появление популяции промежуточных гепатоцитов при

острых и хронических заболеваний печени – признак гепатоцеллюлярной дифференцировки печеночных прогениторных клеток [12].

Проведенные ИГХ исследования показали, что гепатоцитарной дифференцировке прогениторных клеток также способствует наличие ламинина в нишах прогениторных клеток и экспрессия ламинина перисинусоидальными звездчатыми клетками в дольках печени. При микронодулярном циррозе печени на периферии некоторых долек и псевдодоек в проекции каналов Геринга, в так называемых раскрывшихся нишах прогениторных клеток печени, определяются зоны внеклеточной экспрессии ламинина (рис. 5А), в которых локализовано повышенное количество α -FTP-позитивных округлых клеток средней величины (рис. 5Б). В некоторых участках α -FTP-позитивные клетки в виде цепочек проникают в дольки и псевдодольки печени. Одновременно вокруг некоторых цепочек из клеток бифазной дифференцировки, локализованных в проекции каналов Геринга, обнаруживается фрагментарная экспрессия ламинина. Нерегулярная экспрессия ламинина обнаруживается вокруг некоторых реактивных дуктулов в печеночных дольках, а также в отростках перисинусоидальных звездчатых клеток, сопровождающих дуктулы в печеночных дольках.

Ламинин – это большой гликопротеин (1000 кД), вырабатываемый в незначительных количествах звездчатыми и эндотелиальными клетками в нормальной печени, а также в увеличенных количествах звездчатыми клетками и гепатоцитами в пораженной печени [17]. При заболеваниях печени ламинин депонируется в пространствах Диссе и вместе с коллагеном IV типа самоорганизуется в две независимые супрамолекулярные сети, связанные с нидогеном и перлеканом, которые образуют морфологически различимую перисинусоидальную базальную мембрану [18]. В печени пожилых людей ламинин редко наблюдали при перисинусоидально-перицеллюлярном фиброзе, часто – при формировании септ, мостовидном фиброзе и циррозе [18].

Установлено, что ламининовый матрикс в нише прогениторных клеток печени поддерживает прогениторные клетки в недифференцированном фенотипе и подавляет их гепатоцитарную дифференцировку [19]. В то же время ламинин, который практически отсутствует в нормальных синусоидах печени, выполняет важную роль в направленности дифференцировки прогениторных клеток [15]. При использовании избирательных условий культивирования прогениторных клеток *in vitro* установлено: если прогениторные клетки культивировались в среде, содержащей смесь ламинина и коллагена IV типа, то они приобретали гепатоцитарную дифференцировку; если прогениторные клетки культивировались в среде, содержащей коллаген I типа, то они приобретали билиарную дифференцировку [15]. Человеческие гепатоцитоподобные клетки, культивированные на рекомбинантном ламинине-521 и ламинине-111, рано проявляют гепатоцитоподобный внешний вид, в покрытой ламинином культуральной чаше они устраиваются в долькоподобные структуры, напоминающие регенерирующую печень [20,21]. L. K. Kanninen et al. [22] обнаружили, что ламинин-511 и ламин-521 либо

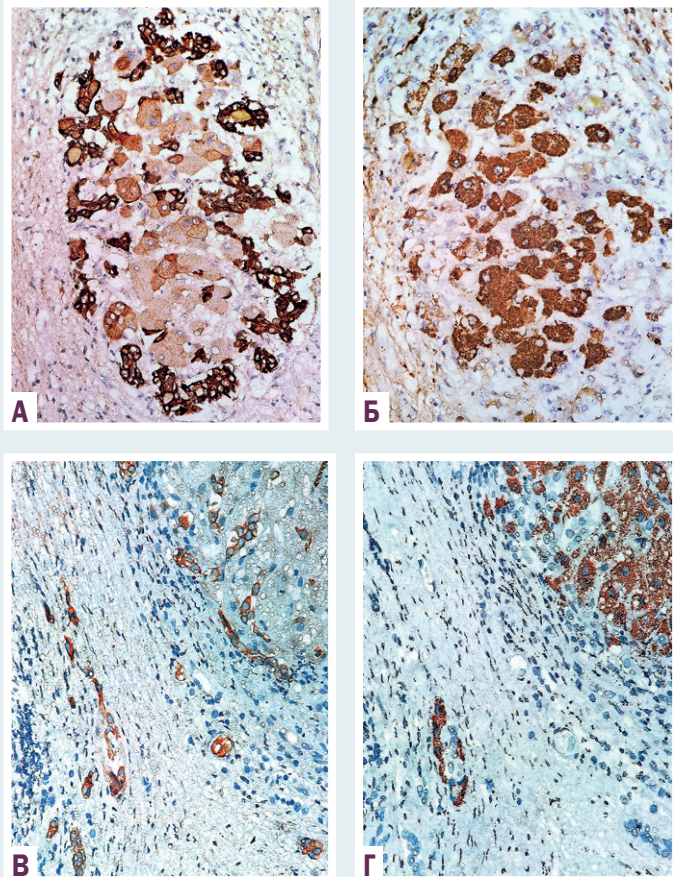


Рис.3. А, Б. Экспрессия СК7 (А) и HepPar-1 (Б) в дольках, а также экспрессия СК7 (В) и HepPar-1 (Г) в портально-дольковых клеточных цепочках и дуктулах в активной фазе дуктулярной реакции при циррозе печени.

А, В: Mo a-Hu Keratin 7, clone OV-TL 12/30.
Б, Г: HepPar-1 Mo a-Hu Hepatocyte, clone QBEnd/10.
Ув.: А, Б – $\times 400$; В, Г – $\times 200$.

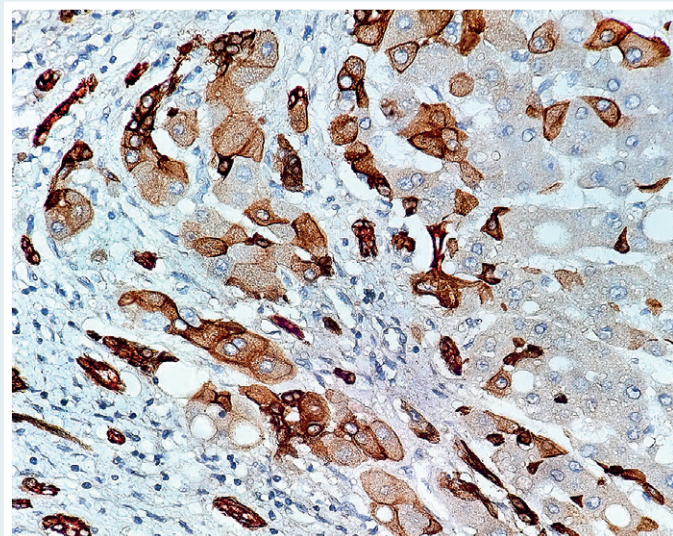


Рис. 4. Значительное число промежуточных СК7+ гепатобилиарных клеток рядом с реактивными дуктулами в дольке при циррозе печени в активной фазе дуктулярной реакции. Mo a-Hu Keratin 7, clone OV-TL 12/30. Ув.: $\times 600$.

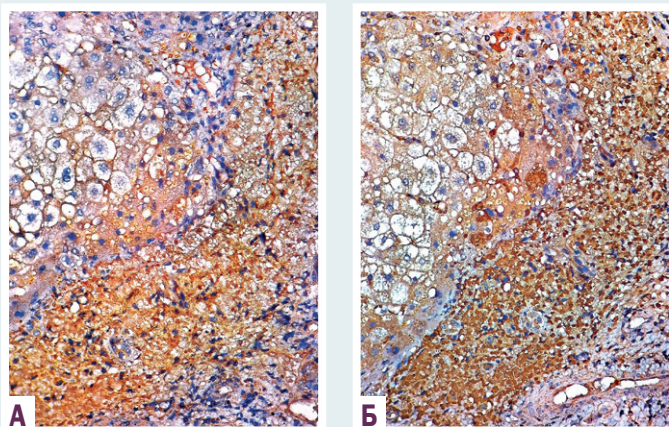


Рис.5. А, Б. Экспрессия ламинина (А) и значительной число α -FTP-позитивных клеток (Б) в нише прогениторных клеток в активной фазе дуктулярной реакции при циррозе печени.

А: Rb Laminin Ab-1. Б: Rb a-Hu Alpha-1-Fetoprotein. Ув.: А, Б – $\times 400$.

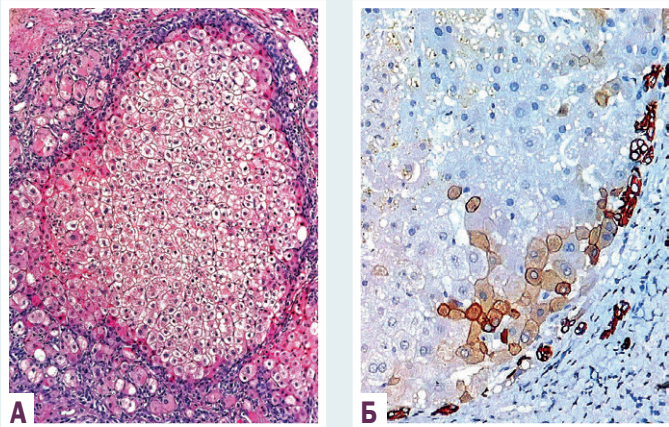


Рис.6. А, Б. А: новообразованная псевдодолька без наличия упорядоченных синусоидов и центрлобулярной вены. Б: промежуточные CK7+ гепатобилиарные клетки на периферии новообразованной псевдодольки и CK7-позитивные дуктулы в портальной фиброзной ткани при циррозе печени.

А: окраска гематоксилином и эозином. Б: Mo a-Hu Keratin 7, clone OV-TL 12/30. Ув.: А – $\times 200$, Б – $\times 400$.

самостоятельно, либо в сочетании поддерживают печеночную дифференцировку человеческих плюрипотентных стволовых клеток.

При циррозе печени у больных хроническим гепатитом в активной фазе дуктулярной реакции также обнаруживаются микроскопические признаки образования новых псевдодоек в ранее бывших дольках с перисинусоидально-перицеллюлярным фиброзом (рис. 6А). Новообразованные псевдодольки составляют скопления неупорядоченно расположенных, крупных Нераг-позитивных и α -FTP-негативных гепатоцитов без наличия линейно ориентированных синусоидов, центрлобулярных вен, а также перицеллюлярного фиброза. Новообразованные псевдодольки содержат на периферии немногочисленные промежуточные гепатобилиарные клетки со слабой цитоплазматической экспрессией СК-7 (рис. 6Б).

При циррозе печени в фиброзно измененных портальных трактах и субкапсулярной зоне печени в фиброзных септах реактивные клеточные цепочки и дуктулы с наличием клеток на разных стадиях дифференцировки обычно ориентированы вдоль коллагеновых волокон I, III, IV типа и отростков α -SMA-позитивных миофибробластов, как правило, не образующих вокруг дуктулярно-клеточных структур упорядоченных непрерывных базальных мембран (рис. 7). Вокруг клеточных цепочек и дуктул не обнаруживают ламинин. Кроме типичных реактивных клеточных цепочек и дуктул, среди коллагеновых волокон I, III, IV типа и отростков α -SMA+ миофибробластов наблюдают многочисленные клеточные цепочки и дуктулы из СК7+, СК19+ клеток, а также малочисленные цепочки с наличием Нераг+, α -FTP+ и α -FTP- клеток. Коллагеновые волокна I и III типа в зонах фиброза окружают такие дуктулы в виде муфт разной ширины и плотности. Однако однозначно ответить на вопрос, появились ли дуктулы в уже сформировавшемся тяжелом портальном фиброзе или же дуктулы формируют вокруг себя дополнительный коллагеновый матрикс, в однократно взятом гепатобиоптате не представляется возможным.

По данным специализированной литературы, дуктулярная реакция может стимулировать фиброгенез в поврежденной печени с помощью нескольких механизмов: клетки дуктулярной реакции способны продуцировать фиброгенные факторы TGF- β и PDGF, которые, в свою очередь, активируют портальные миофибробласты и звездчатые клетки печени к синтезу коллагена 1 типа, или клетки дуктулярной реакции могут подвергаться эпителиально-мезенхимальному переходу, способствующему созданию портального пула миофибробластов [12]. При неалкогольном стеатогепатите у взрослых больных доказано, что дуктулярная реакция сильно и независимо коррелирует с прогрессирующим портальным фиброзом, повышающим вероятность второго перипортального пути фиброгенеза, который не зависит от депонирования звездчатыми клетками перисинусоидального коллагена в 3 зоне печеночных долек. В неалкогольном стеатогепатите портальный фиброз представляет собой преобладающую форму фиброза и является признанным ключевым признаком прогрессирования заболевания [12].

По нашему мнению, с учетом динамично меняющихся сложных клеточно-матриксных взаимодействий и финала репарации (образование гепатоцитарных и билиарных структур), разворачивающиеся в печени процессы более полноценно отражает термин «активация репаративного комплекса печени» (модифицировано из М. Strazzabosco, L. Fabris [3] и М. Cadamuro, М. Strazzabosco, L. Fabris [1]), в то время как термин «дуктулярная реакция печени» акцентирует внимание лишь на части репаративного процесса – образовании реактивных дуктул. Термин «дуктулярная» подразумевает, что содержащиеся в нем клетки имеют дуктулярный фенотип, а термин «реакция» обозначает, что в реактивных изменениях эпителиальный компонент взаимосвязан с внеклеточным матриксом, а также с воспалительными, эндотелиальными и мезенхимальными клетками [23].

Важной характеристикой дуктулярной реакции печени, которая не описывается специалистами в этой области, является уровень пролиферации клеток в структурах дуктулярной реакции. Известно, что гепатоциты медленно самообновляются, но обладают высокой регенерационной способностью и способны восстанавливать потерю 70 % ткани печени в течение нескольких недель после травмы [24]. Восстановление массы гепатоцитов при незначительном повреждении печени опосредуется репликацией оставшихся здоровых гепатоцитов и холангиоцитов [25]. Проллиферацию гепатоцитов и холангиоцитов можно напрямую стимулировать без активации прогениторных клеток печени при экспериментальной частичной гепатэктомии и острой билиарной обструкции; при массивных повреждениях и хронических заболеваниях печени регенерация обусловлена активацией прогениторных клеток печени [3].

Проведенные ГЛ и ИГХ исследования показали, что при циррозе печени у большинства больных хроническим гепатитом в активной фазе ДР фигуры митоза в реактивных клеточных цепочках, клеточных скоплениях и дуктулах не наблюдаются; Ki-67-позитивные клетки составляют 2–4 % всех клеток печеночных долек, а также фиброзно измененной портально-септальной и субкапсулярной ткани печени (содержащей реактивные клеточные цепочки и дуктулы, а также миофибробласты и лимфоциты). Редко в поперечном или продольном срезе дуктулов обнаруживают одну Ki-67-позитивную эпителиальную клетку. Поэтому реактивные клеточные группы и цепочки нельзя назвать клеточными пролифератами. Чтобы как-то выйти из этой неопределенной ситуации, предложено обтекаемое определение, что «дуктулярная реакция представляет собой пролиферацию холангиоцитов на фоне экспансии транзитивно амплифицированных печеночных прогениторных клеток и дифференцировки бипотенциальных печеночных прогениторных клеток в холангиоциты» [13]. Это обусловлено тем, что до настоящего времени не выяснены источники дуктулярной реакции, которая, предположительно, может возникать из-за пролиферации ранее существовавших холангиодуктулярных клеток, из-за пролиферации печеночных прогениторных клеток или из-за билиарной метаплазии гепатоцитов [26].

Считается, что прогениторные клетки печени не генерируют гепатоциты, пока сохраняется их пролиферативная способность [27], независимо от характера повреждения, регенерация гепатоцитов происходит путем саморепликации [28]. Предполагается, что пролиферация и дифференциация прогениторных клеток печени, по-видимому, обусловлена активностью определенных генов, таких как ген *LGR5* (богатого лейкоцитарного рецептора 5, связанного с G-белком) [29], а также уникальным сочетанием митогенных факторов роста, таких как гепатоцитарный фактор роста (HGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста α (TGF- α), факторы роста фибробластов 1 и 2 (FGF1 и FGF2) [25].

Недавно в мышиной модели хронического повреждения печени показано, что новые гепатоциты происходят из так называемых гибридных перипортальных гепатоцитов, которые экспрессируют гены,

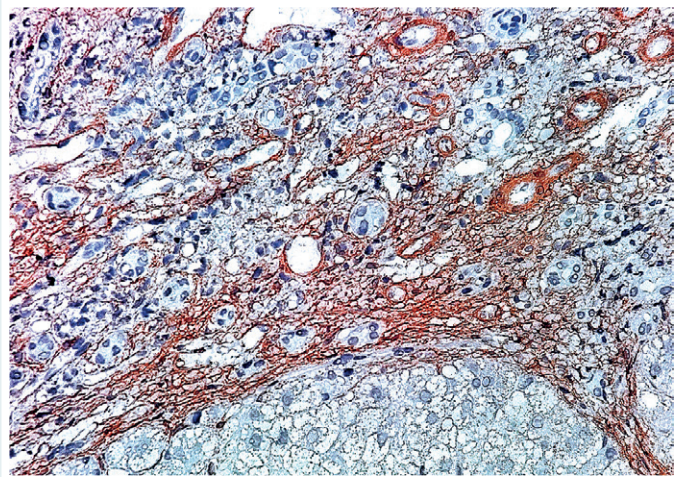


Рис. 7. Множество реактивных дуктулов в портальном тракте (сверху) между α -SMA-позитивными волокнами при циррозе печени у больного алкогольным стеатогепатитом. Мо *a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, clone 1A4*. Ув.: $\times 600$.

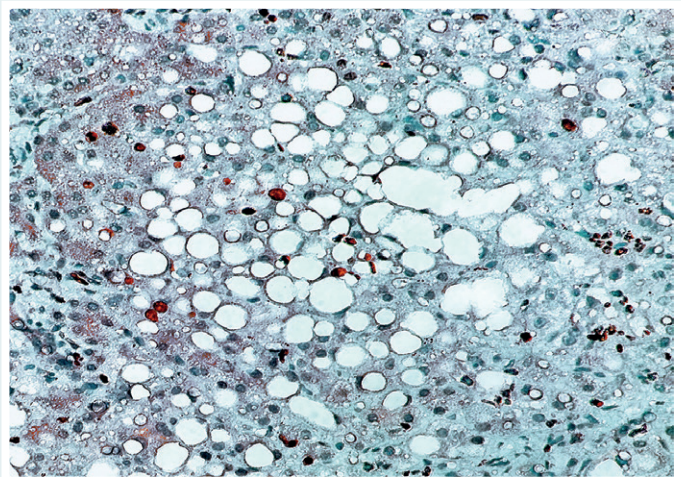


Рис. 8. Значительная экспрессия Ki-67 эпителием реактивных дуктулов (справа) и гепатоцитами псевдодукты (в центре) при тяжелом микронодулярном циррозе печени у больного неалкогольным стеатогепатитом. Мо *a-Hu Ki-67 Antigen, clone SP6*. Ув.: $\times 400$.

специфичные для гепатоцитов и холангиоцитов, и способны к быстрой пролиферации [30]. Кроме этого, у поздних мышинных плодов и родившихся щенков описаны CD45-TER119-CD31-EpCAM-ICAM-1+ резидентные прогениторные клетки, отличные от обычных овальных прогениторных клеток печени, которые дифференцируются в зрелые гепатоциты *in vitro* [31]. Описанные экспериментальные исследования по регенерации печени проводились только у мышей и щенков, и их пока рано экстраполировать на человека. Продолжаются экспериментальные исследования по возможности трансформации *in vitro* нулевых клеток, происходящих из циркулирующих в крови костномозговых гемопоэтических стволовых клеток и мезенхимальных стволовых клеток, которые могут проникать в печень гематогенным путем [25].

Мы установили, что по мере нарастания степени тяжести микронодулярного цирроза печени, когда пло-

щадь уменьшающихся печеночных долек и псевдодоек становится равной или меньшей площади окружающего их коллагенизированного фиброза, имеет место параллельное возрастание числа Ki-67-позитивных клеток в портально-дольковых дуктулах и клеточных цепочках, а также в гепатоцитах мелких печеночных долек и псевдодоек (рис. 8). Это свидетельствует, что стимулом активации репаративной дуктулярной реакции является не только длительный апоптоз и подавление митотической активности дольковых гепатоцитов [6], но и другие, пока не выясненные причины.

Дуктулярная реакция умеренной или слабой степени выраженности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом проявляется наличием в фиброзно измененных портальных трактах и септах, в дольках и псевдодольках небольшого или очень малого числа разрозненных фрагментов реактивных клеточных цепочек и дуктул. Редко обнаруживают клетки с ИГХ характеристиками прогениторных клеток. В реактивных клеточных цепочках и дуктулах клетки билиарной (СК7+, СК19+) дифференцировки чередуются с промежуточными гепатоцитоподобными СК7+ клетками и с клетками гепатоцитарной (Hepaг+) дифференцировки. На периферии долек печени с перисинусоидально-перипортальным фиброзом обнаруживают очаги гиперплазии гепатоцитов без перипортального фиброза, не имеющие упорядоченно ориентированных синусоидов, печеночноклеточных балок и центрлобулярных вен. Дуктулярную реакцию печени умеренной или слабой степени выраженности наблюдали при длительном, тяжелом билиостазе и при фокальной нодулярной гиперплазии печени. При фокальной нодулярной гиперплазии, рядом с фиброзными септами, обнаружены нечетко очерченные зоны гиперплазии гепатоцитов с плохо сформированными синусоидами и печеночноклеточными балками.

Анализ ГЛ и ГХ исследований биоптатов печени 308 больных циррозом печени, который развился на фоне хронического алкогольного, неалкогольного и вирусного гепатита, показал, что в гепатобиоптатах дуктулярную реакцию в активной фазе обнаруживают относительно редко: она диагностирована всего у 36 больных (т. е. у 12 % больных циррозом печени, возникшим на фоне хронического гепатита). Чаще всего в гепатобиоптатах больных циррозом печени, который развился на фоне хронического алкогольного, неалкогольного и вирусного гепатита, при патоморфологическом исследовании диагностируют последствия дуктулярной реакции в виде так называемой «гиперплазии мелких холангиол» в утолщенных из-за фиброза портальных трактах и септах.

Проведенные ГЛ и ИГХ исследования показали, что фазу отдаленных последствий дуктулярной реакции при циррозе печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом отражает наличие в фиброзно измененных портальных трактах и субкапсулярной зоне печени, а также в утолщенных портально-дольковых септах разного количества дуктул с узким просветом, не содержащим желчи. Дуктулы выстланы одним рядом кубовидного СК7-позитивного эпителия. На периферии долек и псевдодоек печени, не содержащих реактивных

клеточных цепочек или дуктул, могут обнаруживаться нечетко очерченные очаги гиперплазии гепатоцитов без упорядоченно ориентированных синусоидов и печеночно-клеточных балок. Число сформированных дуктул в фиброзно измененных портальных трактах печени варьирует от небольшого до очень значительного (иногда несколько десятков дуктул располагаются в большой по площади зоне портально-перипортального фиброза).

Таким образом, исследования показали, что появление в проекции каналов Геринга печени реактивных клеточных цепочек и дуктул из клеток с иммуногистохимическими характеристиками прогениторных клеток, а также из клеток бифазной билиарно-гепатоцитарной дифференцировки, формирование новых псевдодоек и билиарных дуктул в портальных трактах печени – фрагменты единого, динамично развивающегося репаративного процесса. Репаративный процесс, начинающийся с активации ниши стволовых/прогениторных клеток печени, продолжается сложной гепатоцитарной и билиарной дифференцировкой их новых клеточных поколений, происходящей в тесном взаимодействии с компонентами внеклеточного матрикса. Репаративный комплекс, активирующийся при циррозе печени на фоне тяжело нарушенного портально-долькового межклеточного матрикса и прогрессирующего дефицита гепатоцитов, не обеспечивает воссоздание полноценных дольковых и портально-билиарных структур, ассоциированных со специализированной архитектурой гемомикроциркуляции печени. Репаративный процесс при циррозе печени у больных хроническим гепатитом дискоординирован в сторону создания новых, функционально малоценных гепатоцеллюлярных псевдодоек и накопления не содержащих желчи дуктул в фиброзно измененных портальных трактах и фиброзных септах с избытком депонированного коллагена I, III и IV типа.

Выводы

1. Дуктулярная реакция при циррозе печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом представляет собой процесс активации и эволюции сложного репаративного комплекса печени, направленного на восполнение дефицита гепатоцитов и билиарных структур. При микроскопии в биоптатах печени дифференцируется активная фаза и фаза отдаленных последствий дуктулярной реакции.

2. Активная фаза дуктулярной реакции характеризуется появлением на периферии печеночных долек, в проекции каналов Геринга, реактивных клеточных цепочек и дуктул, состоящих из клеток с иммунофенотипом прогениторных клеток печени (c-kit CD117+, CD34+, CD56+, CD44 Std./HCAM+, α-FTP+, СК7-, СК19-, Hepaг-), а также из клеток, находящихся на разных стадиях гепато-билиарной дифференцировки: промежуточных гепатобилиарных СК7+ клеток, клеток билиарной (СК7+, СК19+) и гепатоцитарной (Hepaг+, α-FTP+) дифференцировки. При циррозе печени у больных хроническим гепатитом реактивные дуктулы, клеточные цепочки и скопления клеток также обнаруживаются в фиброзно измененных портальных трактах и субкапсулярной ткани, в фиброзных септах.

3. В реактивных клеточных цепочках и дуктулах промежуточных и центральных зон печеночных долек доминируют клетки бифазной (билиарной (СК7+, СК19+), гепатоцитарной (Нераг+)) дифференцировки и промежуточные гепатобилиарные СК7+ клетки; в фиброзной портально-септальной и субкапсулярной ткани среди коллагеновых волокон I, III, IV типа и отростков α -SMA+ миофибробластов, наряду с реактивными дуктулами и цепочками, наблюдают клеточные цепочки и дуктулы из СК7+, СК19+ клеток, а также малочисленные цепочки с наличием Нераг+, α -FTР+ и α -FTР-клеток.

4. Гепатоцитарной дифференцировке прогениторных клеток способствует наличие ламинина в нишах прогениторных клеток и экспрессия ламинина перисинусоидальными звездчатыми клетками в дольках и псевдодольках печени. В активной фазе дуктулярной реакции появляются новые печеночные псевдодольки, содержащие на периферии малочисленные промежуточные СК-7+ гепатоциты, без наличия центральнобулярных вен и упорядоченных синусоидов.

5. В активной фазе дуктулярной реакции печени в клетках реактивных дуктул и клеточных цепочек не определяют фигуры митоза или повышенный уровень экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67. При тяжелом микронодулярном циррозе печени, когда площадь печеночных долек и псевдодоек становится равной или меньшей площади окружающего их фиброза, имеет место параллельное возрастание числа Ki-67+ клеток в портально-дольковых дуктулах и цепочках, а также числа Ki-67+ гепатоцитов в печеночных дольках и псевдодольках.

6. При циррозе печени отдаленные последствия дуктулярной реакции отражает наличие среди коллагеновых волокон фиброзно измененной портально-септальной и субкапсулярной ткани множества не содержащих желчи дуктул, сформированных из СК7-позитивного эпителия, а также наличие в дольках печени, не содержащих реактивных клеточных цепочек и дуктул, псевдодоек и нечетко очерченных очагов гиперплазии гепатоцитов без упорядоченно ориентированных синусоидов.

Перспективы дальнейших исследований. Реальные перспективы решения проблемы полноценной регенерации печени у больных хроническим неалкогольным, алкогольным и вирусным гепатитом лежат в поиске путей раннего подавления перичеллюлярно-перисинусоидального и портально-септального фиброза, ведущего к циррозу печени. Сохранный специализированный волокнисто-молекулярный матрикс является главной предпосылкой нормальной реализации репаративных возможностей печени и своевременного восстановления утраченных гепатоцитарно-билиарных структур.

Конфликт интересов: отсутствует.

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

Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, директор Института клинической патологии человека, заслуженный деятель науки и техники Украины.

Фень С. В., 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 та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, директор Інституту клінічної патології людини, заслужений діяч науки і техніки України.

Фень С. В., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Director of Human Clinical Pathology Institute, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.

Fen' S. V., Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 01.03.2018

Після доопрацювання / Revised: 05.03.2018

Прийнято до друку / Accepted: 07.03.2018

Список литературы

- [1] The Multitasking Behavior of Cholangiocytes in the Reaction to Liver Damage / M. Cadamuro, M. Strazzabosco, L. Fabris // *J. Liver Clin Res.* – 2015. – Vol. 2(3). – P. 1017(1–6).
- [2] Strazzabosco M. Neural Cell Adhesion Molecule and Polysialic Acid in Ductular Reaction: The Puzzle Is Far From Completed, But the Picture Is Becoming More Clear / M. Strazzabosco, L. Fabris // *Hepatology.* – 2014. – Vol. 60(5). – P. 1469–1472.
- [3] Strazzabosco M. Development of the Bile Ducts: Essentials for the Clinical Hepatologist / M. Strazzabosco, L. Fabris // *J. Hepatol.* – 2012. – Vol. 56(5). – P. 1159–1170.
- [4] Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers / T.A. Roskams, N.D. Theise, C. Balabaud, et al. // *Hepatology.* – 2004. – Vol. 39. – P. 1739–1745.
- [5] Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets / V. Cardinale, Y. Wang, G. Carpino, et al. // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 54(6). – P. 2159–2172.
- [6] Hepatic progenitor cells activation, fibrosis and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease / V. Nobili, G. Carpino, A. Alisi, et al. // *Hepatology.* – 2012. – Vol. 56. – P. 2142–2153.
- [7] Гаврилюк О.М. Особливості дуктулярної реакції при алкогольному, неалкогольному стеатогепатиті та вірусному гепатиті С за результатами імуногістохімічного дослідження / О.М. Гаврилюк // *Патологія.* – 2014. – №1. – С. 41–44.
- [8] Centrilobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis / L. Zhao, M. Westerhoff, R.K. Pai, et al. // *Modern Pathology advance online publication.* – 2017. – Vol. 31(1). – P. 150–159.
- [9] Kaur S. Hepatic Progenitor Cells in Action. Liver Regeneration or Fibrosis? / S. Kaur, H. Siddiqui, M.H. Bhat // *Am. J. Pathol.* – 2015. – Vol. 185. – P. 2342–2350.
- [10] Emerging concepts in biliary repair and fibrosis / L. Fabris, C. Spirli, M. Cadamuro, et al. // *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* – 2017. – Vol. 313(2). – P. 102–116.
- [11] Nakanuma Y. Diseases of the bile ducts / Y. Nakanuma, Y. Zen, B.C. Portmann // *Burt A.D. MacSween's Pathology of the Liver / A.D. Burt, B.C. Portmann, L.D. Ferrell.* – 6th edn. – Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2012. – Ch. 10. – P. 491–562.
- [12] Role of Hepatic Progenitor Cells in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development: Cellular Cross-Talks and Molecular Networks / G. Carpino, A. Renzi, P. Onori, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 20112–20130.
- [13] CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin α v β 5-mediated activation of NF- κ B / K.H. Kim, C.C. Chen, G. Alpini, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125. – P. 1886–1900.
- [14] Morell C.M. Liver repair mechanisms in non alcoholic steatohepatitis (NASH): defining the role of hepatic progenitor cells, ductular reaction and Notch signaling / C.M. Morell // *PhD program in translation and molecular medicine. XXVII cycle academic year 2014.* – P. 1–169.
- [15] Links Between Hepatic Fibrosis, Ductular Reaction, and Progenitor Cell Expansion / M.J. Williams, A.D. Clouston, S.J. Forbes, et al. // *Gastroenterology.* – 2014. – Vol. 146. – P. 349–356.

- [16] Strazzabosco M. The balance between Notch/Wnt signaling regulates progenitor cells commitment during liver repair: mystery solved? / M. Strazzabosco, L. Fabris // *J. Hepatol.* – 2013. – Vol. 58(1). – P. 181–183.
- [17] Burt A.D. *MacSween's Pathology of the Liver* / A.D. Burt, B.C. Portmann, L.D. Ferrell. – 6th edn. – Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2012. – 1032 p.
- [18] Mak K.M. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease / K.M. Mak, R. Mei // *Anat Rec (Hoboken)*. – 2017. – Vol. 300(8). – P. 1371–1390.
- [19] Mak K.M. Immunohistochemical Characterization of Hepatic Progenitor Cell Niche in Liver Fibrosis of Elderly Cadavers / K.M. Mak, S. Chiu // *FASEB*. – 2017. – Vol. 31(suppl 1).
- [20] Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes / K. Cameron, R. Tan, W. Schmidt-Heck, et al. // *Stem Cell Reports*. – 2015. – Vol. 5(6). – P. 1250–1262.
- [21] Defined and Scalable Generation of Hepatocyte-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells / Y. Wang, S. Alhaque, K. Cameron, et al. // *J. Vis. Exp.* – 2017. – Vol. 121. – P. 553–555.
- [22] Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells / L.K. Kanninen, R. Harjumäki, P. Peltoniemi, et al. // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 103. – P. 86–100.
- [23] Increased Autophagy Markers Are Associated with Ductular Reaction during the Development of Cirrhosis / T.M. Hung, R.H. Yuan, W.P. Huang, et al. // *Am. J. Pathology*. – 2015. – Vol. 185(9). – P. 2454–2467.
- [24] Alwahsh S.M. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? / S.M. Alwahsh, H. Rashidi, D.C. Hay // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2018. – Vol. 75(8). – P. 1307–1324.
- [25] Kholodenko I.V. Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases / I.V. Kholodenko, K.N. Yarygin // *Biomed Res Int.* – 2017. – Vol. 2017. – 17 p.
- [26] Gouw A.H. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface / A.H. Gouw, A.D. Clouston, N.D. Theise // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 54(5). – P. 1853–1863.
- [27] Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury / J.R. Schaub, Y. Malato, C. Gormond, et al. // *Cell reports*. – 2014. – Vol. 8(4). – P. 933–939.
- [28] Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation / K. Yanger, D. Knigin, Y. Zong, et al. // *Cell stem cell*. – 2014. – Vol. 15(3). – P. 340–349.
- [29] Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver / M. Huch, H. Gehart, R. van Boxtel, et al. // *Cell*. – 2015. – Vol. 160(1–2). – P. 299–312.
- [30] Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer / J. Font-Burgada, S. Shalpour, S. Ramaswamy, et al. // *Cell*. – 2015. – Vol. 162(4). – P. 766–779.
- [31] Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes in vitro and repopulate liver tissue / N. Tanimizu, N. Ichinohe, M. Ishii, et al. // *Stem Cells*. – 2016. – Vol. 34(12). – P. 2889–2901.
- [9] Kaur, S., Siddiqui, H., & Bhat, M. H. (2015) Hepatic Progenitor Cells in Action. Liver Regeneration or Fibrosis? *Am. J. Pathol.*, 185, 2342–2350. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.004.
- [10] Fabris, L., Spirili, C., Cadamuro, M., Fiorotto, R., & Strazzabosco, M. (2017) Emerging concepts in biliary repair and fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 313(2), 102–116. doi: 10.1152/ajpgi.00452.2016.
- [11] Nakanuma, Y., Zen, Y., & Portmann, B. C. (2012) Diseases of the bile ducts. Burt, A. D., Portmann, B. C., & Ferrell, L. D. *MacSween's Pathology of the Liver*. (Ch. 10), (P. 491–562). Edinburgh: Churchill livingstone Elsevier.
- [12] Carpino, G., Renzi, A., Onori, P., & Gaudio, E. (2013) Role of Hepatic Progenitor Cells in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development: Cellular Cross-Talks and Molecular Networks. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 20112–20130. doi: 10.3390/ijms141020112.
- [13] Kim, K. H., Chen, C. C., Alpini, G., & Lau, L. F. (2015) CCN1 induces hepatic ductular reaction through integrin α v β 5-mediated activation of NF- κ B. *J. Clin. Invest.*, 125, 1886–1900. doi: 10.1172/JCI179327.
- [14] Morell, C. M. (2014) Liver repair mechanisms in non alcoholic steatohepatitis (NASH): defining the role of hepatic progenitor cells, ductular reaction and Notch signaling. *DIMET. PhD program in translation and molecular medicine. XXVII cycle academic year*, 1–169.
- [15] Williams, M. J., Clouston, A. D., & Forbes, S. J. (2014) Links Between Hepatic Fibrosis, Ductular Reaction, and Progenitor Cell Expansion. *Gastroenterology*, 146, 349–356. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.034.
- [16] Strazzabosco, M., & Fabris, L. (2013) The balance between Notch/Wnt signaling regulates progenitor cells commitment during liver repair: mystery solved? *J. Hepatol.*, 58(1), 181–183. doi: 10.1016/j.jhep.2012.08.006.
- [17] Burt, A. D., Portmann, B. C., & Ferrell, L. D. (2012) *MacSween's Pathology of the Liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.
- [18] Mak, K. M., & Mei, R. (2017) Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anat Rec (Hoboken)*, 300(8), 1371–1390. doi: 10.1002/ar.23567.
- [19] Mak, K. M., & Chiu, S. (2017) Immunohistochemical Characterization of Hepatic Progenitor Cell Niche in Liver Fibrosis of Elderly Cadavers. *FASEB*, 31(1).
- [20] Cameron, K., Tan, R., Schmidt-Heck, W., Campos, G., Lyall, M. J., Wang, Y., et al (2015) Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*, 5(6), 1250–1262. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.10.016.
- [21] Wang, Y., Alhaque, S., Cameron, K., Meseguer-Ripolles, J., Lucendo-Villarin, B., Rashidi, H., & Hay, D. C. (2017) Defined and Scalable Generation of Hepatocyte-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *J. Vis. Exp.*, 121, 553–555. doi: 10.3791/55355.
- [22] Kanninen, L. K., Harjumäki, R., Peltoniemi, P., Bogacheva, M. S., Salmi, T., Porola, P., et al. (2016) Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. *Biomaterials*, 103, 86–100. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.054.
- [23] Hung, T. M., Yuan, R. H., Huang, W. P., Chen, Y. H., Lin, Y. C., Lin, C. W., et al. (2015) Increased Autophagy Markers Are Associated with Ductular Reaction during the Development of Cirrhosis. *Am. J. Pathology*, 185(9), 2454–2467. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.05.010.
- [24] Alwahsh, S. M., Rashidi, H., & Hay, D. C. (2018) Liver cell therapy: is this the end of the beginning? *Cell Mol Life Sci*, 75(8), 1307–1324. doi: 10.1007/s00108-017-2713-8.
- [25] Kholodenko, I. V., & Yarygin, K. N. (2017) Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases. *Biomed Res Int*, 2017, 17. doi: 10.1155/2017/8910821.
- [26] Gouw, A. S. H., Clouston, A. D., & Theise, N. D. (2011) Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology*, 54(5), 1853–1863. doi: 10.1002/hep.24613.
- [27] Schaub, J. R., Malato, Y., Gormond, C., & Willenbring, H. (2014) Evidence against a stem cell origin of new hepatocytes in a common mouse model of chronic liver injury. *Cell reports*, 8(4), 933–939. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.003.
- [28] Yanger, K., Knigin, D., Zong, Y., Maggs, L., Gu, G., Akiyama, H., et al. (2014) Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell stem cell*, 15(3), 340–349. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.003.
- [29] Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Versteeg, M. M., et al. (2015) Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 160(1–2), 299–312. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.050.
- [30] Font-Burgada, J., Shalpour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A., et al. (2015) Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer. *Cell*, 162(4), 766–779. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.026.
- [31] Tanimizu, N., Ichinohe, N., Ishii, M., Kino, J., Mizuguchi, T., Hirata, K., & Mitaka, T. (2016) Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes in vitro and repopulate liver tissue. *Stem Cells*, 34(12), 2889–2901. doi: 10.1002/stem.2457.

References

Поліморфізм генів системи гемостазу, ендотеліальної дисфункції та регуляції артеріального тиску у вагітних із преєклампсією та затримкою розвитку плода

Т. О. Лоскутова

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

Мета роботи – вивчити розподіл і вплив поліморфізмів генів факторів згортання крові, ендотеліальної дисфункції, регулятора артеріального тиску на виникнення затримки розвитку плода (ЗРП) у жінок із преєклампсією (ПЕ).

Матеріали та методи. Виконали проспективне когортне дослідження 36 жінок із ПЕ та ЗРП та 97 із ПЕ без ЗРП. Визначили поліморфізми в генах 1691 G→A фактора V Leiden (FVL), 20210 G→A протромбіну, 675 5G/4G інгібітора активатора плазміногену 1 типу (PAI-1), 455 G→A фібриногену β, 192 Q→R параоксонази 1 (PON-1), 677 C→T метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR), 235 M→T ангіотензиногену II (AGT II).

Результати. Встановили, що ранній початок преєклампсії (до 34 тижня), тривалість гіпертензії понад 4 тижні збільшує відносний ризик виникнення затримки розвитку плода при ПЕ в 3,77 (95 % ДІ 1,85–7,66) раз та 2,1 (95 % ДІ 1,2–3,6) раз відповідно. Тяжкість ПЕ збільшує ризик ЗРП майже вдвічі (RR = 1,98, 95 % ДІ 1,07–3,69). З'ясовано, що частота аномальних поліморфізмів була однаково високою незалежно від наявності ЗРП (80,5 % vs 68,0 %). Але для вагітних із ПЕ та ЗРП притаманні 2 і більше аномальних поліморфізми одночасно (OR = 2,17, 95 % ДІ 1,26–3,72, p < 0,01). Вплив патологічних поліморфізмів у генах ANG II 235 M→T, фібриногену β 455 G→A, PON-1 192 Q→R, протромбіну 20210 G→A, MTHFR 677 C→T не підтверджено; встановлено, що вони не мають вагомого впливу на розвиток ЗРП при преєклампсії. Нейтральні гомозиготи FVL 1691 GG, PAI-1 5G/5G мають протективні властивості щодо розвитку ЗРП при преєклампсії (p < 0,01, OR = 0,2, 95 % ДІ 0,09–0,45 та OR = 0,28, 95 % ДІ 0,09–0,92 відповідно).

Висновки. Преєклампсія незалежно пов'язана з розвитком ЗРП. Результати не вказують на наявність асоціацій між вивченими поліморфізмами та підвищеним ризиком затримки внутрішньоутробного розвитку при преєклампсії у вагітних.

Ключові слова:

преєклампсія, ускладнення вагітності, затримка розвитку плода, поліморфізм генів, фактори ризику.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 29–33

DOI:
10.14739/2310-1237.2018.1.127709

E-mail:
Loskutovata@gmail.com

Поліморфізм генів системи гемостазу, ендотеліальної дисфункції та регуляції артеріального тиску у вагітних із преєклампсією та затримкою розвитку плода

Т. А. Лоскутова

Цель работы – изучить распределение и влияние полиморфизмов генов факторов свертывания крови, эндотелиальной дисфункции, регулятора артериального давления на возникновение задержки развития плода (ЗРП) у женщин с преэклампсией (ПЭ).

Материалы и методы. Проведено проспективное когортное исследование, включавшее 36 женщин с ПЭ и ЗРП и 97 с ПЭ без ЗРП. Определяли полиморфизмы в генах 1691 G→A фактора V Leiden (FVL), 20210 G→A протромбина, 675 5G/4G ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), 455 G→A фибриногена β, 192 Q→R параоксоназы 1 (PON-1), 677 C→T метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR), 235 M→T ангиотензиногена II (AGT II).

Результаты. Установлено, что раннее начало преэклампсии (до 34 недели), продолжительность гипертензии более 4 недель увеличивает относительный риск возникновения задержки развития плода при ПЭ в 3,77 (95 % ДИ 1,85–7,66) раз и 2,1 (95 % ДИ 1,2–3,6) раз соответственно. Тяжесть ПЭ увеличивает риск ЗРП почти в 2 раза (RR = 1,98, 95 % ДИ 1,07–3,69). Установлено, что частота аномальных полиморфизмов была одинаково высокой независимо от наличия ЗРП (80,5 % vs 68,0 %). Для беременных с ПЭ и ЗРП характерны 2 и более аномальных полиморфизма одновременно (OR = 2,17, 95 % ДИ 1,26–3,72, p < 0,01). Влияние патологических полиморфизмов в генах ANG II 235 M→T, фибриногена β 455 G→A, PON-1 192 Q→R, протромбина 20210 G→A, MTHFR 677 C→T не доказано; установлено, что они не имеют весомого влияния на развитие ЗРП при преэклампсии. Нейтральные гомозиготы FVL 1691 GG, PAI-1 5G/5G имеют протективные свойства для развития ЗРП при преэклампсии (p < 0,01, OR = 0,2, 95 % ДИ 0,09–0,45 и OR = 0,28 95 % ДИ 0,09–0,92 соответственно).

Выводы. Преэклампсия независимо связана с развитием ЗРП. Результаты не указывают на наличие ассоциаций между изученными полиморфизмами и повышенным риском задержки внутриутробного развития при преэклампсии у беременных.

Ключевые слова:

преэклампсия, осложнения беременности, задержка развития плода, полиморфизм генов, факторы риска.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 29–33

Polymorphism of genes of hemostasis system, endothelial dysfunction and regulation of blood pressure in pregnant woman with preeclampsia and fetal growth retardation

T. O. Loskutova

Objective. To study the distribution and effect of blood clotting, endothelial dysfunction, and blood pressure regulator gene polymorphisms on the development of fetal growth retardation in women with preeclampsia (PE).

Key words:

pre-eclampsia, pregnancy complications, fetal growth retardation, genetic polymorphism, risk factors.

Materials and methods. A prospective cohort study that included 36 women with PE and FGR and 97 with PE without FGR was conducted. A determinations of genes polymorphisms in factor V Leiden 1691 G → A (FVL), prothrombin 20210 G → A, plasminogen activator inhibitor 1 type 675 5G / 4G (PAI-1), fibrinogen β 455 G → A, paraoxonase 1 192 Q → R (PON-1), methylenetetrahydrofolatereductase 677 C → T (MTHFR), angiotensinogen II 235 M → T (AGT II) were performed.

Results. It was found that the early onset of preeclampsia (up to 34 weeks), the duration of hypertension more than 4 weeks increase the relative risk of developing FGR in PE by 3.77 (95 % CI 1.85–7.66) and by 2.1 (95 % DI 1.2–3.6) times respectively. The severity of PE increases the risk of FGR almost by 2 times (RR = 1.98, 95 % CI 1.07–3.69). It was found that the frequency of abnormal polymorphisms was equally high between groups (80.5 % vs. 68.0 %). It was revealed that two or more abnormal polymorphisms were observed more often in pregnant women with PE and FGR (OR = 2.17, 95 % CI 1.26–3.72, P < 0.01).

Conclusions. Pre-eclampsia is independently associated with the development of FGR. Our findings do not indicate that there are associations between studied maternal polymorphisms and an increased risk of intrauterine growth restriction in pregnant woman with preeclampsia.

Затримка розвитку плода (ЗРП) – важлива й актуальна проблема сучасного акушерства, оскільки супроводжується високою перинатальною захворюваністю та смертністю, інвалідизацією, неврологічним та інтелектуальним дефіцитом, розвитком хронічної патології в дітей у майбутньому. ЗРП є наслідком плацентарної недостатності та супроводжується народженням дітей із масо-ростовими параметрами нижче ніж 10 перцентилів для терміну гестації [1].

Багатоцентрове рандомізоване дослідження, що здійснене I. M. Bernstein et al. (2000), в яке залучили 196 медичних центрів і 20 000 новонароджених із ЗРП у терміні гестації 25–30 тижнів без аномалій розвитку, показало: ЗРП є фактором ризику ранньої неонатальної смертності (RR 2,77 95 % ДІ 2,31–3,33); РДС 1,19 (1,03–1,29), внутрішньоплодочкових крововиливів 1,13 (0,99–1,29), некротичного ентероколіту 1,27 (1,05–1,53) [1].

Частота ЗРП в Україні становить 12–36 % серед доношених і 16–47 % серед недоношених новонароджених [1]. Серед материнських факторів, що викликають ЗРП, провідними є хронічна артеріальна гіпертензія (АГ) і гестаційна АГ. У жінок із пreeклampсією (ПЕ) шанси ЗРП у 2,7 раза вищі (95 % ДІ 1,94–3,86) порівняно зі здоровими вагітними [1].

Фундаментальні дослідження показали, що ПЕ асоціюється з системною запальною відповіддю, ендотеліальною дисфункцією, дисбалансом ангіогенних та антиангіогенних факторів і метаболічними порушеннями [2–5]. Хоча до цього часу чіткі механізми розвитку ПЕ не з'ясовані, основну позицію в патогенезі посідає теорія про неповноцінну, або аномальну інвазію трофобласта [2,3].

Очевидно, що ПЕ, поряд з передчасними пологами, затримкою росту плода (ЗРП), його антенатальною загибеллю та іншими станами періоду вагітності, є мультифакторним захворюванням. Усі названі стани отримали назву «великі акушерські синдроми», котрі асоціюються з недостатньо глибокою плацентацією, що може бути пов'язано з різним ступенем зниження ремоделювання та обструктивними ушкодженнями спіральних артерій у зоні з'єднання або в міометрії (табл. 1) [2]. Введення терміну «великі акушерські синдроми» покликане пояснити невдачі робіт із прогнозування та профілактики акушерських захворювань, звернувши увагу дослідників і клініцистів на етіологічну гетерогенність станів, що мають спільні патогенетичні шляхи [2]. Спільним для станів, що

об'єднані поняттям «великі акушерські синдроми», є етіологічна гетерогенність, довга доклінічна фаза, захворювання плода, неефективне симптоматичне лікування, клінічні прояви мають адаптивні характеристики, у виникненні відіграють роль генетичні фактори та фактори довкілля.

ЗРП плода традиційно включається в діагностичні критерії тяжкої пreeклampсії, незалежно від інших материнських проявів хвороби, а сама пreeклampсія призводить до найбільш важких випадків ЗРП [6]. Є 2 фенотипово різні види пreeклampсії: рання та пізня. Рання починається до 34 тижня вагітності, має перебіг з ускладненнями, що загрожують життю матері та плода; частота коливається в межах 5–20 % усіх випадків ПЕ, наслідки для матері та плода викликані пошкодженням плаценти. Саме цей фенотип асоціюється з ЗРП, малими розмірами плаценти та характерними гістопатологічними порушеннями. Пізня пreeклampсія має відносно сприятливий перебіг, трапляється частіше (80 %) і пов'язана з материнськими чинниками: метаболічний синдром, ожиріння, хронічна АГ, захворювання нирок, цукровий діабет (табл. 2) [2]. Термін вагітності 34 тижні найчастіше розглядають як референтний, оскільки він корелює з порушеннями плацентації в ранні терміни [2].

З огляду на різні типи недостатньої плацентації при ПЕ та ПЕ з ЗРП, відповідно відсутність ремоделювання та відсутність з вогнищами обструкції, припустили, що в розвитку цих станів відіграють роль аномальні поліморфізми генів факторів згортання крові, стану ендотелію та регуляції АТ або їхні комбінації.

Мета роботи

Вивчити розподіл і вплив поліморфізмів генів факторів згортання крові, ендотеліальної дисфункції, регулятора артеріального тиску на виникнення затримки розвитку плода в жінок із ПЕ.

Матеріали і методи дослідження

Здійснили проспективне когортне дослідження, котре включало 133 жінки у другій половині вагітності. Критерій залучення в дослідження – наявність ПЕ відповідно до наказу МОЗ України № 676 від 31.12.2004 р. Діагностику затримки розвитку плода здійснювали згідно з наказом МОЗ України № 782 від 29.12.2005 р. Основну групу (О) сформували 36 жінок

із ПЕ та ЗРП; групу порівняння (П) – 97 вагітних із ПЕ без ЗРП.

Дослідили генетичні поліморфізми факторів згортання крові та фібринолізу (1691 G→A фактор V Leiden (FVL), 20210 G→A протромбін, 675 5G/4G інгібітор активатора плазміногену 1 типу (PAI-1), 455 G→A фібриноген β), ендотеліальної дисфункції (192 Q→R параоксоназа 1 (PON-1), 677 C→T метилентетрагідрофолатредуктаза (MTHFR)), регулятора артеріального тиску (235 M→T ангіотензиноген II (AGT II)) за допомогою алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції (ампліфікатор «MyCycle», виробник «Bio-rad», USA) з наступною детекцією методом електрофорезу у 3 % агарозному гелі (ультрафіолетовий транслюмінатор «Vilber Lourmat», Франція). Використовували комплект реагентів «SNP-експрес» (НВФ «Літех», Російська Федерація). Для аналізу використовували ДНК із лейкоцитів крові, яку виділяли за допомогою реагенту «ДНК-експрес-кров» (НВФ «Літех», Російська Федерація). Дослідження виконали на базі клініко-діагностичної лабораторії КЗ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня імені І. І. Мечникова».

Статистично результати дослідження опрацювали з використанням ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і Graph Pad Prism 5 (№ ліцензії 35B73650-6899-11DA-6784-00232A9018BE). Основні характеристики наведені у вигляді кількості спостережень (n), середньої арифметичної величини (M), стандартної помилки середньої (±m), відносних величин (абс., %), рівня статистичної значущості (p). Нормальність розподілу кількісних ознак оцінювали за допомогою критеріїв Шапіро–Уїлка та Колмогорова–Смірнова. Порівняння статистичних характеристик у групах виконали із використанням параметричних і непараметричних критеріїв: оцінювання вірогідності відмінностей середніх для нез'язаних вибірок – за критеріями Стьюдента (t), вірогідність відмінностей якісних показників – за критерієм Хі-квадрат Пірсона (χ²), в тому числі з поправкою Йетса (Yates corrected), точним критерієм Фішера. Оцінювання взаємозв'язку між чинниками виконали за коефіцієнтами кореляції Спірмена (r), показником відношення шансів (OR – odds ratio), показником відносного ризику (RR – relative risk) і їхніми 95 % довірчими інтервалами (CI).

Показник OR розраховували за формулою:

$$OR = \frac{a \times d}{c \times b} \quad (1);$$

де *a* – кількість випадків із наявністю фактора ризику в основній групі, *b* – кількість випадків із наявністю фактора ризику у групі порівняння, *c* – відсутність фактора ризику в основній групі, *d* – відсутність фактора ризику у групі порівняння.

95 % довірчий інтервал (95 % CI) для показника OR розраховували за формулою:

$$CI_{OR} = \exp\left[\ln\left[\frac{(a + 0,5) \times (d + 0,5)}{(c + 0,5) \times (b + 0,5)}\right] \pm 1,96 \times S\right] \quad (2);$$

де *a*, *b*, *c*, *d* – відповідають позначкам до формули 1, *S* – стандартна помилка OR.

Таблиця 1. Типи недостатності плацентациї, що пов'язана з несприятливими наслідками вагітності [2]

Тип ремоделювання спіральних артерій міометрія	Фенотип
Частковий	Передчасні пологи Передчасний розрив плодових оболонок ЗРП без гіпертензії
Відсутній	Преєклампсія
Відсутній із вогнищами обструкції	Преєклампсія з ЗРП Відшарування плаценти Інфаркти плаценти з АЗП

Таблиця 2. Відмінності ранньої та пізньої ПЕ [2]

Критерій	Рання ПЕ	Пізня
Поява клінічних симптомів	до 34 тижня	після 34 тижня
Ризик несприятливих наслідків	високий	низький
ЗРП	так	ні
Спадковість	так	ні
Морфологія плаценти	патологічна	нормальна
Етіологія	плацентарна	материнська
Фактори ризику (RR)	Сімейний анамнез (2,9)	Цукровий діабет (3,56) Багатоплідна вагітність (2,93) Хронічна АГ (2,47) Підвищений ІМТ (2,47) Вік матері понад 40 років (1,96) Кардіоваскулярні розлади (3,84)

Розрахунок стандартної помилки OR (*S*_{OR}):

$$S_{OR} = \sqrt{\frac{(a + b) \times (c + d)}{n \times (n - 1)}} \quad (3);$$

Обчислення RR виконали за формулою:

$$RR = \frac{\frac{a}{(a + b)}}{\frac{c}{(c + d)}} \quad (4);$$

Розрахунок стандартної помилки RR (*S*_{RR}):

$$S_{RR} = \sqrt{\frac{1 - \frac{a}{(a + b)}}{a} + \frac{1 - \frac{c}{(c + d)}}{c}} \quad (5);$$

Розрахунок довірчого інтервалу RR (*CI*_{RR}):

$$CI_{RR} = \exp(\ln RR \pm 1,96 \times S) \quad (6)$$

Розбіжність вважали вірогідною за умови *p* < 0,05.

Результати та їх обговорення

Середній вік жінок і поділ за віковими категоріями між групами майже не відрізнявся: в О групі – 27,1 ± 1,0 року, в групі П – 28,7 ± 0,6 (*p* > 0,05). Аналіз репродуктивної функції довів, що кількість жінок із пологами в анамнезі та середня кількість пологів в одній жінки у групах суттєво не відрізнялась.

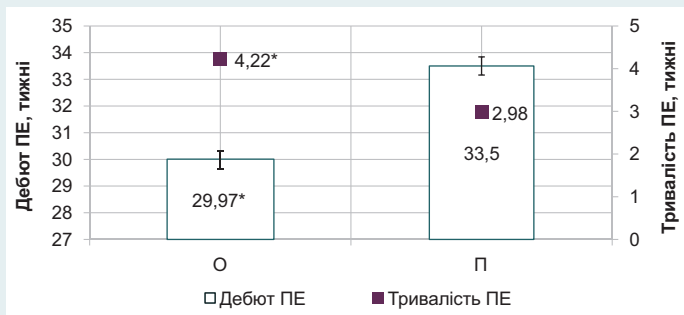


Рис. 1. Середній термін початку та тривалість прееклампсії у вагітних.

*: різниця показників статистично вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 3. Аналіз поєднань патологічних поліморфізмів за групами дослідження, n (%)

Поєднання поліморфізмів	Групи дослідження		χ^2	p
	Основна (n = 36)	Порівняння (n = 97)		
Без патологічних поліморфізмів	7 (19,4)	31 (32,0)	1,45*	0,23
1 поліморфізм	11 (30,5)	42 (43,2)	1,77	0,18
2 поліморфізми	11 (30,5)	12 (12,4)	6,07	0,01
3 і більше	7 (19,4)	12 (12,4)	0,57*	0,45

*: χ^2 з поправкою Йетса.

Таблиця 4. Частота генотипів у вагітних груп дослідження, n (%)

Групи дослідження	Генотип		
	MM	MT	TT
ANG 235 M→T			
О (n = 36)	7 (19,4)	18 (50,0)	11 (30,6)
П (n = 97)	34 (35,1)	38 (39,2)	25 (25,8)
Протромбін 20210 G→A	GG	GA	AA
О (n = 36)	27 (75,0)	7 (19,4)	2 (5,6)
П (n = 97)	88 (90,7)	6 (6,2)	3 (3,1)
FVL 1691 G→A	GG	GA	AA
О (n = 36)	24 (66,7)*	11 (30,6)	1 (2,8)
П (n = 97)	82 (84,5)	15 (15,5)	0 (0,0)
PAI-1 5G/4G	5G/5G	5G/4G	4G/4G
О (n = 36)	3 (8,3)*	25 (69,5)	8 (22,2)
П (n = 97)	26 (26,8)	49 (50,5)	22 (22,7)
Фібриноген β 455 G→A	GG	GA	AA
О (n = 36)	14 (38,9)	17 (47,2)	5 (13,9)
П (n = 97)	41 (42,3)	46 (47,4)	10 (10,3)
MTHFR 677 C→T	CC	CT	TT
О (n = 36)	21 (58,3)	10 (27,8)	5 (13,9)
П (n = 97)	60 (61,9)	26 (26,8)	11 (11,3)
PON-1 192 Q→R	QQ	QR	RR
О (n = 36)	18 (50,0)	13 (36,0)	5 (14,0)
П (n = 97)	50 (51,5)	32 (33,0)	15 (15,5)

*: різниця показників статистично вірогідна порівняно з відповідним показником групи порівняння ($p < 0,05$).

Середній строк початку ПЕ в О групі ($29,97 \pm 0,68$ тижня) менше, ніж у групі П ($33,50 \pm 0,34$ тижня) ($p < 0,01$) (рис. 1). Тривалість існування ПЕ у групі з ЗРП ($4,22 \pm 0,50$ тижня) більша в 1,42 раза, ніж у групі П ($2,98 \pm 0,22$ тижня, $p < 0,01$). З'ясували, що дебют прееклампсії в термін до 34 тижня гестації або раніше збільшує відносний ризик розвитку ускладнень в 3,77 раза ($p < 0,01$, $RR = 3,77$, 95 % ДІ 1,85–7,66),

а тривалість наявності ПЕ понад 4 тижні збільшує відносний ризик розвитку ЗРП у 2,1 раза ($p < 0,01$, 95 % ДІ 1,2–3,6). Між початком захворювання, вагою новонароджених та їхнім зростом встановили кореляційний зв'язок, який дорівнював $r = 0,76$ та $r = 0,77$ ($p < 0,01$) відповідно.

Середній гестаційний вік на момент пологів у О групі ($34,20 \pm 0,66$) був на 2,1 тижня менший, ніж у групі порівняння ($36,3 \pm 0,3$, $p < 0,01$). Це пов'язано з тяжкістю прееклампсії та розвитком ускладнень, що потребувало дострокових пологів. В основній групі прееклампсію легкого ступеня мали 11 (30,5 %) жінок; це менше, ніж у групі порівняння – 57 (52,6 %) ($p < 0,01$; $OR = 0,39$; 95 % ДІ 0,18–0,90). У групі із ЗРП прееклампсію середнього або тяжкого ступеня мали 25 (69,5 %) жінок, що більше, ніж у групі П – 46 (47,4 %) ($p < 0,01$; $OR = 2,5$; 95 % ДІ 1,11–5,68, $RR = 1,98$, 95 % ДІ 1,07–3,69).

У групі з ЗРП при ПЕ ($p < 0,05$) маса новонароджених була меншою в 1,5 раза ($1812,5 \pm 115,8$ г проти $2761,9 \pm 84,1$ г), зріст новонароджених був в 1,13 раза менше ($43,3 \pm 1,0$ см проти $49,08 \pm 0,49$ см), ніж у групі порівняння. Оцінку за шкалою Апгар на 1 хвилині менше ніж 7 балів у О групі мали 69,4 % проти 47,4 % у групі П ($p < 0,05$; $OR = 2,5$; 95 % ДІ 1,11–5,7), на 5 хвилині – 19,4 % проти 8,2 % відповідно.

Аналіз результатів тестування генів-регуляторів системи гемостазу, «ендотеліальної системи» та генів, що регулюють рівень артеріального тиску, показав високу частоту патологічних поліморфізмів у пацієток із прееклампсією незалежно від наявності ускладнень: 29 (80,5 %) жінок О групи і 66 (68,0 %) групи П. Важливу роль відіграє поєднаний вплив кількох патологічних генів або поліморфізмів, коли їхній патологічний ефект підсумовується. Як несприятливі генотипи розглядали гомо- і гетерозиготні мутації в гені протромбіну 20210 GA, AA, в гені FV Leiden 1691 GA, AA, MTHFR 677 CT, TT, гомозиготні поліморфізми в гені PAI-1 4G/4G, у гені FGB 455 AA, PON-1 192 RR, ANG 235 TT (табл. 3). Встановлено, що при існуванні 2 і більше мультигенних поліморфізмів відносний ризик розвитку ЗРП у жінок із ПЕ збільшується в 2,17 раза ($\chi^2 = 7,75$, $p < 0,01$, 95 % ДІ 1,26–3,72).

Результати тестування на наявність поліморфізмів у гені ANG II 235 M→T, фібриногену β 455 G→A, PON-1 192 Q→R, протромбіну 20210 G→A, MTHFR 677 C→T не виявили вірогідних змін між О і групою П (табл. 4).

Аналізуючи частоту генотипів гена FVL (1691 G→A) (табл. 4), виявлено: частота «нейтральних» гомозигот GG в О групі менше в 1,27 раза порівняно з групою П ($p < 0,01$, $OR = 0,37$, 95 % ДІ 0,15–0,89). Між вагою новонароджених ($r = 0,42$), їхнім зростом ($r = 0,38$) і мутацією FVL (1691 G→A) виявили статистично значущий взаємозв'язок ($p < 0,01$). Аналіз частот алелів і генотипів PAI-1 5G/4G показав зниження частоти нормального генотипу 5G/5G у О групі (табл. 4). Його частота знижена в 3,23 раза порівняно з групою П ($p < 0,05$, $OR = 0,25$, 95 % ДІ 0,07–0,88; $RR = 0,31$, 95 % ДІ 0,10–0,97). Кількість гетерозигот PAI-1 5G/4G, патологічних гомозигот 4G/4G між групами дослідження вірогідно не відрізнялась.

Висновки

1. Встановлено, що ранній початок прееклампсії (до 34 тижня), тривалість гіпертензії понад 4 тижні збільшує відносний ризик виникнення затримки розвитку плода при прееклампсії у 3,77 (95 % ДІ 1,85–7,66) раза та 2,1 (95 % ДІ 1,2–3,6) раза відповідно. Тяжкість прееклампсії збільшує ризик затримки розвитку плода майже в 2 рази (RR = 1,98, 95 % ДІ 1,07–3,69).

2. З'ясовано, що частота аномальних поліморфізмів була однаково високою незалежно від наявності затримки розвитку плода (80,5 % vs 68,0 %). Але для вагітних із прееклампсією та затримкою розвитку плода притаманні 2 і більше аномальних поліморфізми одночасно (OR = 2,17, 95 % ДІ 1,26–3,72, $p < 0,01$).

3. Вплив патологічних поліморфізмів у генах ANG II 235 M→T, фібриногену β 455 G→A, PON-1 192 Q→R, протромбіну 20210 G→A, MTHFR 677 C→T не підтверджено; встановлено, що вони не мають вагомого впливу на виникнення затримки розвитку плода при прееклампсії. Нейтральні гомозиготи FVL 1691 GG, PAI-1 5G/5G мають протективні властивості щодо розвитку затримки розвитку плода при прееклампсії ($p < 0,01$, OR=0,37, 95 % ДІ 0,15–0,89 та OR = 0,25, 95 % ДІ 0,07–0,88 відповідно).

Перспективи подальших досліджень полягають у з'ясуванні комбінацій патологічних поліморфізмів генів для виникнення ЗРП при ПЕ.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про автора:

Лоскутова Т. О., д-р мед. наук, доцент, професор каф. акушерства та гінекології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

Сведения об авторе:

Лоскутова Т. А., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. акушерства и гинекологии, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Information about author:

Loskutova T. O., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro.

Надійшла до редакції / Received: 11.01.2018

Після доопрацювання / Revised: 26.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 05.03.2018

Список літератури

- [1] Затримка росту плода: клініко-патогенетичні складові та засоби попередження. Адаптація до міжнародних клінічних установ / Ю.П. Вдовиченко, О.П. Танько, М.В. Самойлова, К.З. Шарашидзе. – К., 2017. – 44 с.
- [2] Ходжаева З.С. Ранняя и поздняя преэклампсия: парадигмы патобиологии и клиническая практика / З.С. Ходжаева, А.М. Холин, Е.М. Вихляева // Акушерство и гинекология. – 2013. – №10. – С. 4–11.
- [3] Hypertension in Pregnancy: executive summary / American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy // Obstetrics and Gynecology. – 2013. – Vol. 122. – №5. – P. 1122–1131.
- [4] Gathiram P. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology / P. Gathiram, J. Moodley // Cardiovascular Journal of Africa. – 2016. – Vol. 27. – №2. – P. 71–78.

- [5] Thrombophilia and Pregnancy Complications / L.E. Simcox, L. Ormesher, C. Tower, I.A. Greer // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. – №12. – P. 28418–28428.
- [6] Tranquilli A.L. Introduction to ISSHP new classification of preeclampsia / A.L. Tranquilli // Pregnancy Hypertens. – 2013. – №3. – Issue 2. – P. 58–9.

References

- [1] Vdovychenko, Yu. P., Tanko, O. P., Samoilo, M. V., & Sharashydzhe, K. Z. (2017) *Zatrymka rostu ploda: kliniko-patohenetychni skladovi ta zasoby poperedzhennia. Adaptatsiia do mizhnarodnykh klinichnykh ustanov [Fetal growth retardation: clinical and pathogenetic components and preventive measures. Adaptation to international clinical settings]*. Kyiv. [in Ukrainian].
- [2] Khodzhaeva, Z. S., Kholin, A. M., & Vikhlyayeva, E. M. (2013). *Rannaya i pozdnaya preeklampsiya: paradigmy patobiologii i klinicheskaya praktika [Early and late preeclampsia: pathobiology paradigms and clinical practice]*. *Akusherstvo i ginekologiya*, 10, 4–11. [in Russian].
- [3] American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy. (2013). *Hypertension in Pregnancy: executive summary*. *Obstetrics & Gynecology*, 122(5), 1122–1131. doi: 10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88.
- [4] Gathiram, P., & Moodley, J. (2016). Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovascular Journal of Africa*, 27(2), 71–78. doi: 10.5830/CVJA-2016-009.
- [5] Simcox, L., Ormesher, L., Tower, C., & Greer, I. (2015). Thrombophilia and Pregnancy Complications. *International Journal of Molecular Science*, 16(12), 28418–28428. doi: 10.3390/ijms161226104.
- [6] Tranquilli, A. (2013). Introduction to ISSHP new classification of preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 3(2), 58–9. doi: 10.1016/j.preghy.2013.04.006.

The course of pregnancy and its result in women who have diffuse non-toxic goiter

L. P. Shelestova, N. M. Radchenko

Donetsk National Medical University, Lyman, Ukraine

Key words:

goiter, pregnancy, parturition, obstetric labor complications.

Pathologia

2018; 15 (1), 34–37

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.129187

E-mail:

larysa.shelestova@gmail.com

Aim – to study the peculiarities of the pregnancy course and its result with women who have diffuse non-toxic goiter.

Materials and methods. The course of pregnancy and its result in 75 women with diffuse non-toxic goiter and in 75 women without thyroid pathology has been studied. The amount of thyroid-stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (FT₃) and free thyroxin (FT₄) was defined in blood serum, the concentration of iodine – in urine.

Results. The pregnancy in women who have diffuse non-toxic goiter goes with mild iodine deficiency (median 66.0 µg/l), an increase in TSH, a decrease in thyroid hormones and an integral thyroid index, compared with pregnant women without pathology of the thyroid gland. In 78.7 % (95 % CI 68.1–86.4 %) of women with diffuse non-toxic goiter, the thyroid gland enlargement is first detected during pregnancy. In 32.0 % (95 % CI 22.5–43.2 %) of women with diffuse nontoxic goiter in the second half of pregnancy subclinical hypothyroidism is developed. The presence of diffuse non-toxic goiter in the pregnant in comparison with the women without thyroid pathology increases the possibility of spontaneous abortion (OR 4.2; 95 % CI 2.0–8.9), iron-deficiency anemia (OR 2.3; 95 % CI 1.1–4.8), preeclampsia (OR 2.7; 95 % CI 1.2–6.2), placental dysfunction (OR 6.3; 95 % CI 3.1–12.8), fetal growth retardation (OR 5.6; 95 % CI 1.2–26.6), premature labor (OR 5.6; 95 % CI 1.2–26.6), untimely outpouring of amniotic fluid (OR 2.2; 95 % CI 1.1–4.4), labor abnormalities (OR 2.8; 95 % CI 1.2–7.0).

Conclusions. In women with diffuse non-toxic goiter the likelihood of complications increases during pregnancy and childbirth, which points to the need to develop therapeutic and preventive measures aimed at their reduction.

Ключові слова:

зоб, вагітність, пологи, акушерські ускладнення.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 34–37

Перебіг вагітності та її завершення в жінок із дифузним нетоксичним зобом

Л. П. Шелестова, Н. М. Радченко

Мета роботи – вивчити особливості перебігу вагітності та її завершення в жінок із дифузним нетоксичним зобом.

Матеріали та методи. Оцінили перебіг вагітності та її завершення в 75 жінок із дифузним нетоксичним зобом і в 75 жінок без патології щитоподібної залози. У сироватці крові визначили вміст тиреотропного гормона (ТТГ), вільного трийодтирону (вТ₃) і вільного тироксину (вТ₄), в сечі – концентрації йоду.

Результати. Вагітність у жінок із дифузним нетоксичним зобом перебігає на тлі йодної недостатності легкого ступеня (медіана 66,0 мкг/л), збільшення ТТГ, зниження тиреоїдних гормонів та інтегрального тиреоїдного індексу порівняно з вагітними без патології щитоподібної залози. Збільшення щитоподібної залози під час вагітності виявляють у 78,7 % (95 % ДІ 68,1–86,4 %) жінок. У 32,0 % (95 % ДІ 22,5–43,2 %) жінок із дифузним нетоксичним зобом у другій половині вагітності розвивається субклінічний гіпотиреоз. Наявність у вагітних дифузного нетоксичного зоба, порівняно з жінками без патології щитоподібної залози, збільшує ймовірність загрози мимовільного аборту (ВШ 4,2; 95 % ДІ 2,0–8,9), залізодефіцитної анемії (ВШ 2,3; 95% ДІ 1,1–4,8), преєклампсії (ВШ 2,7; 95 % ДІ 1,2–6,2), плацентарної дисфункції (ВШ 6,3; 95 % ДІ 3,1–12,8), затримки росту плода (ВШ 5,6; 95 % ДІ 1,2–26,6), завершення вагітності передчасними пологами (ВШ 5,6; 95 % ДІ 1,2–26,6), несвоєчасного відходження навколоплідних вод (ВШ 2,2; 95 % ДІ 1,1–4,4), аномалій пологової діяльності (ВШ 2,8; 95 % ДІ 1,2–7,0).

Висновки. У жінок із дифузним нетоксичним зобом підвищується ймовірність ускладнень під час вагітності та в пологах, що вказує на необхідність розробки лікувально-профілактичних заходів, спрямованих на їхнє зниження.

Ключевые слова:

зоб, беременность, роды, акушерские осложнения.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 34–37

Течение беременности и ее исход у женщин с диффузным нетоксическим зобом

Л. П. Шелестова, Н. Н. Радченко

Цель работы – изучить особенности течения беременности и ее исход у женщин с диффузным нетоксическим зобом.

Материалы и методы. Оценено течение беременности и ее исход у 75 женщин с диффузным нетоксическим зобом и у 75 женщин без патологии щитовидной железы.

Результаты. Беременность у женщин с диффузным нетоксическим зобом протекает на фоне йодной недостаточности легкой степени (медіана 66,0 мкг/л), увеличения ТТГ, снижения тиреоидных гормонов и интегрального тиреоидного индекса по сравнению с беременными без патологии щитовидной железы. Увеличение щитовидной железы во время беременности отмечено у 78,7 % (95 % ДИ 68,1–86,4 %) женщин. У 32,0 % (95 % ДИ 22,5–43,2 %) женщин с диффузным нетоксическим зобом во второй половине беременности развивается субклинический гипотиреоз. Наличие у беременных диффузного нетоксического зоба, в сравнении с женщинами без патологии щитовидной железы, увеличивает вероятность угрозы самопроизвольного аборта (ОШ 4,2; 95 % ДИ 2,0–8,9), железодефицитной анемии (ОШ 2,3; 95 % ДИ 1,1–4,8), преэклампсии (ОШ 2,7; 95 % ДИ 1,2–6,2), плацентарной дисфункции (ОШ 6,3; 95 % ДИ 3,1–12,8), задержки

роста плода (ОШ 5,6; 95 % ДИ 1,2–26,6), преждевременных родов (ОШ 5,6; 95 % ДИ 1,2–26,6), несвоевременного излития околоплодных вод (ОШ 2,2; 95 % ДИ 1,1–4,4), аномалий родовой деятельности (ОШ 2,8; 95 % ДИ 1,2–7,0).

Выводы. У женщин с диффузным нетоксическим зобом увеличивается вероятность осложнений во время беременности и в родах, что указывает на необходимость разработки лечебно-профилактических мероприятий, направленных на их снижение.

The most common form of thyroid pathology among women is diffuse non-toxic goiter, the diagnosing of which happens more often during pregnancy and lactation [1–3]. Its frequency depends on the content of iodine in the environment and fluctuates from 5–10 % to 80–90 % [1]. Nowadays it is generally admitted that iodine deficiency goiter is latent hypothyreosis: hyperplastic thyroid tissue can support euthyroid state only for a certain time. Long-time influence of factors that damage the reserved compensatory abilities of goiter-changed thyroid runs out and its further enlargement can't stop thyroid deficiency [1, 2]. As a result of increased demand of body in thyroid hormones, especially during pregnancy, after-labour period and during lactation it is possible that at first signs of subclinical and then manifesting hypothyreosis can appear [4,5], that may negatively affect the pregnancy and its results.

Aim

To study the peculiarities of the course of pregnancy and its result in women who have diffuse non-toxic goiter.

Materials and methods

The course of pregnancy and its result in 75 women with diffuse non-toxic goiter has been studied. Criteria for inclusion of patients into the group with diffuse non-toxic goiter: the thyroid gland volume is more than 18 cm³ according to the echography; absence of autoimmune process; registration in the women's consultation in the first trimester of gestation; absence of concomitant severe extragenital pathology. A group of patients without pathology of the thyroid gland and iodine deficiency comprised 75 women in the same gestation period. During registration for pregnancy all the women were consulted by the endocrinologist.

According to visual-palpatory evaluation of patients' thyroid the preliminary information about form, size, consistence and mobility of thyroid were obtained.

The diagnosis of diffuse enlargement of thyroid was based on the results of the ultrasonography made on the apparatus ALOKA-SSD-550-7,5 mHz (Japan). Thyroid volume was calculated by the formula of J. Brunn et al. (1981) [6].

The study of the thyroid status of pregnant women was carried out by determining serum levels of thyroid-stimulating hormone (TSH) and free thyroid hormones (free triiodothyronine (FT₃) and free thyroxin (FT₄)) levels in the blood serum and by immunoenzymatic method with the help of set of the company "Chema-Medica" (Moscow) and "Thyroid IFA-TTG" (Saint-Petersburg). Using the obtained data the integral thyroid index was calculated – this is the rate of thyroid hormones to their hypophyseal regulator according to the formula:

$$\text{Integral thyroid index} = \frac{\text{FT}_3 + \text{FT}_4}{\text{TSH}}$$

In norm the integral thyroid index equals to 7.04–27.21, the decrease of this index reflects even the initial stages of hypothyreosis [7].

For evaluation of the severity of autoimmune reactions the antibodies to the thyroid tissue – thyroglobulin were defined with the help of set "Thyroid IFA-TTG" (Saint-Petersburg) and microsomal fraction – "EIAgen Anti – TMAb" (Italy). The concentration of iodine in the urine was determined by the cerium-arsenic method.

The processing of statistical information data was held with the usage of software SPSS Statistics 17.0. As the majority of variables didn't correspond to normal distribution, they were represented by median (Me) and interquartile latitude – 25 and 75 percentile (25; 75 %). The comparison of indexes between groups was held with the help of non-parametric Mann–Whitney U-test. For frequency 95 % confidence interval (95 % CI) was defined by Wilson method. The comparisons of qualitative features were held by applying of Pearson Chi-square criterion with Yates's correction. Odds ratio (OR) and 95 % CI to this number was calculated.

Results and discussion

When assessing ioduria, it was noted that the median in pregnant women with diffuse non-toxic goiter corresponded to mild iodine deficiency (66.0 (50.2; 78.4) µg/l). According to the study, 77.3 % (58 of 75) of this group had mild iodine deficiency, and 22.7 % (17 of 75) had an average degree. Iodine preparations were prescribed for women of this group, according to the order of the Ministry of Health of Ukraine No. 415 of 15.07.2011. In pregnant women without a pathology of the thyroid gland, the excretion of iodine in the urine was 206 (160.2; 228.0) µg/l and corresponded to the normal iodine content.

In the pregnant with diffuse non-toxic goiter in comparison with the pregnant without thyroid pathology the statistically significant enlargement of TSH concentration was observed (2.9 (2.7; 3.2) against 2.3 (1.9; 2.6) µIU/ml; U = 613, Z = -8.3, P < 0.001) and decrease of thyroid hormones (FT₃ – (6.2 (5.9; 6.6) against 6.5 (6.1; 6.9) pmol/l; U = 2246, Z = -2.1, P = 0.033 and FT₄ – (15.1 (13.7; 16.4) against 15.8 (15.2; 17.0) pmol/l; U = 2129, Z = -2.6, P = 0.010). It is necessary to point out that in the pregnant who had diffuse non-toxic goiter the rate of integral thyroid index testified the initial state of hypothyreosis (7.4 (6.7; 8.3)) and were statistically significantly lower than in the pregnant without thyroid pathology – (9.4 (8.3; 12.1); U = 0, Z = -10.6, P < 0.001). In 28 (37.3 %, 95 % CI 27.3–48.6 %) of pregnant women, the index was below 7.04, indicating the initial stages of subclinical hypothyroidism (Fig. 1).

It should be noted that in 24 (32.0 %, 95 % CI 22.5–43.2 %) of women in the second half of pregnancy subclinical hypothyroidism developed. Diagnosis of sub-

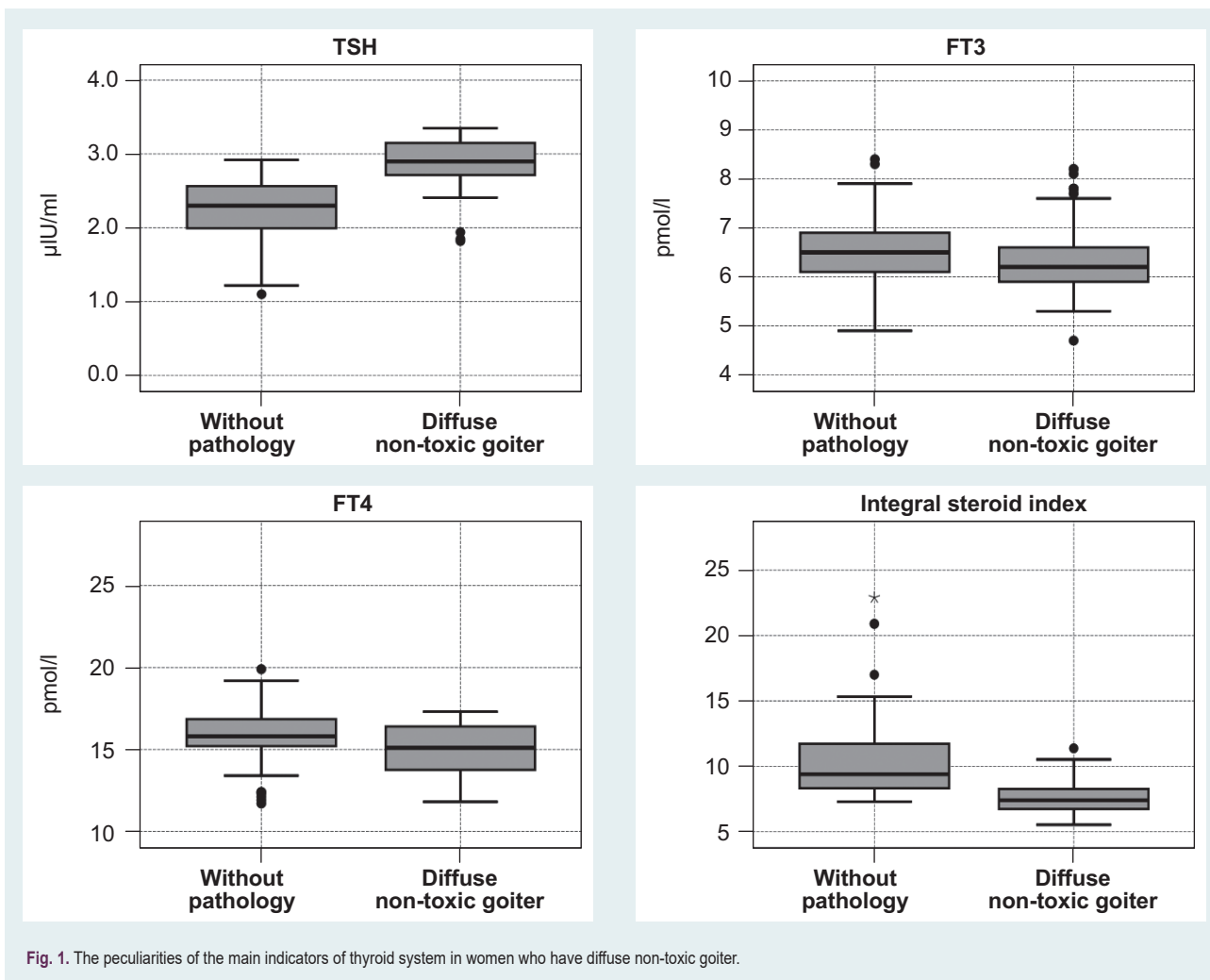


Fig. 1. The peculiarities of the main indicators of thyroid system in women who have diffuse non-toxic goiter.

clinical hypothyroidism was set on the basis of an increase in the TSH content of more than 3.0 $\mu\text{U/ml}$ for pregnant women in the second-third trimesters of pregnancy, the content of FT3 and FT4 was normal [8]. For pregnant women with subclinical hypothyroidism hormone replacement therapy with L-thyroxine preparations followed by TSH level control every 4 weeks during pregnancy was prescribed. The dose of L-thyroxine was selected individually so that the TSH level was less than 2.5 $\mu\text{U/l}$ and was calculated on the basis of 1.2 $\mu\text{g/kg}$ per day.

The increase of antibody titer to thyroglobulin and to microsomal fraction of thyroid gland was revealed with none of the pregnant.

Due to the research held it was registered that in the majority of women with diffuse non-toxic goiter, that is with 59 out of 75, that equaled to 78.7 % (95 % CI 68.1–86.4 %), the enlargement of thyroid was revealed namely during pregnancy, perhaps this is connected with the fact that during pregnancy the woman's thyroid experiences additional stress, the functional activity of thyroid increases and pregnancy can often provoke pathology of thyroid gland [1,4,5].

Analyzing the complaints of the pregnant it was noted that 21 (28.0 %; 95 % CI 19.1–39.0 %) patients with diffuse non-toxic goiter had clinical symptoms that are typical to hypofunction of thyroid: dry skin, weakness,

drowsiness, light pasty of eyelids and face, brittle or hair loss, headache, constipation. But, according to our point of view the given percent can be reduced due to the fact that women could connect these symptoms with pregnancy and not pay the proper attention to them.

The study of obstetrician anamnesis showed that 9 (31.0 %) out of 29 re-pregnant women with diffuse non-toxic goiter had spontaneous abortion in anamnesis while there were only 3 (7.5 %) out of 40 re-pregnant women without thyroid pathology, the difference is statistically significant ($\chi^2_{(1)} = 4.947$, $P = 0.026$).

Thus, the existence of diffuse non-toxic goiter increases the possibility of spontaneous abortion more than by five times (OR 5.6 %; 95 % CI 1.3–22.9) that corresponds to the literature data [2,5,9] about the fact that dysfunction of thyroid holds the first place among the causes of pregnancy miscarriage.

The course of the present pregnancy in women who have diffuse non-toxic goiter statistically significantly more often than in women without such pathology was complicated with the danger of spontaneous abortion (correspondingly 37 (49.3 %) cases against 14 (18.7 %); $\chi^2_{(1)} = 14.379$, $P < 0.001$; OR 4.2; 95 % CI 2.0–8.9), iron-deficiency anemia (29 (38.7 %) against 16 (21.3 %); $\chi^2_{(1)} = 4.571$, $P = 0.033$; OR 2.3; 95 % CI 1.1–4.8), pre-eclampsia (22 (29.3 %) against 10 (13.3 %); $\chi^2_{(1)} = 4.807$,

$P = 0.028$; OR 2.7; 95 % CI 1.2–6.2), placental dysfunction (51 (68.0 %) against 19 (25.3 %); $\chi^2_{(1)} = 25.741$, $P < 0.001$; OR 6.3; 95 % CI 3.1–12.8), fetal growth retardation – (10 (13.3 %) against 2 (2.7 %); $\chi^2_{(1)} = 4.438$, $P = 0.035$; OR 5.6; 95 % CI 1.2–26.6).

Also gestational course both in women who have diffuse non-toxic goiter and in women without thyroid pathology was complicated with edema of the pregnant (correspondingly 23 (30.7 %) and 17 (22.7 %); $\chi^2_{(1)} = 0.852$, $P = 0.356$; OR 1.5; 95 % CI 0.7–3.1), hypotension (17 (22.7 %) and 9 (12.0 %); $\chi^2_{(1)} = 2.280$, $P = 0.131$; OR 2.1; 95 % CI 0.9–5.2), gestational pyelonephritis (8 (10.7 %) and 5 (6.7 %); $\chi^2_{(1)} = 0.337$, $P = 0.562$; OR 1.7; 95 % CI 0.5–5.4).

It should be noted that during electrocardiographic examination the deviations were revealed characterized by decrease in voltage, violation of all types of conductivity and rhythm (26 (34.7 %) against 13 (17.3 %); $\chi^2_{(1)} = 4.990$, $P = 0.026$; OR 2.5; 95 % CI 1.2–5.4) in every third woman with diffuse non-toxic goiter.

Initial unfavourable background and complicated course of pregnancy in women who have diffuse non-toxic goiter reflected both in the course of pregnancy and labor results. In women who have diffuse non-toxic goiter premature labor happened more often than with women without pathology in thyroid gland (10 (13.3 %) against 2 (2.7 %); $\chi^2_{(1)} = 4.438$, $P = 0.035$; OR 5.6; 95 % CI 1.2–26.6), untimely outpouring of amniotic fluid (29 (38.7 %) against 17 (22.7 %); $\chi^2_{(1)} = 3.794$, $P = 0.051$; OR 2.2; 95 % CI 1.1–4.4), labor abnormalities (19 (25.3 %) against 8 (10.7 %); $\chi^2_{(1)} = 4.517$, $P = 0.034$; OR 2.8; 95 % CI 1.2–7.0). Also the tendency to the increase of frequency of Caesarian section (15 (20.0 %) against 7 (9.3 %); $\chi^2_{(1)} = 2.610$, $P = 0.106$; OR 2.4; 95 % CI 0.9–6.4) was registered in women who have diffuse non-toxic goiter.

Conclusions

1. In pregnant women with diffuse non-toxic goiter, the median corresponds to a mild degree of iodine deficiency (66.0 $\mu\text{g/l}$), a statistically significant increase in TSH, a decrease in thyroid hormones and an integral thyroid index, compared with pregnant women without pathology of the thyroid gland.

2. In 78.7 % (95 % CI 68.1–86.4 %) of women with diffuse non-toxic goiter, the thyroid gland enlargement is first detected during pregnancy. In 32.0 % (95 % CI 22.5–43.2 %) of women with diffuse nontoxic goiter in the second half of pregnancy subclinical hypothyroidism is developed.

3. In women with diffuse non-toxic goiter the likelihood of complications during pregnancy and childbirth increases, which points to the need to develop therapeutic and preventive measures aimed at their reduction.

Prospects for future scientific research. There is currently no national guidance orders, which clearly highlights the issues of diagnosis and treatment of changes in the thyroid gland in pregnant women. It is advisable to develop them, taking into account the existing recommendations of the American and European associations, which in recent years have been referenced by leading Ukrainian endocrinologists. The revealed complications during pregnancy and labor in women who have diffuse

non-toxic goiter point to the necessity of working out the treatment and preventive measures aiming to reduction of obstetric complications.

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

Information about authors:

Shelestova L. P., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Donetsk National Medical University, Lyman, Ukraine.
Radchenko N. M., MD, Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology, Donetsk National Medical University, Lyman, Ukraine.

Відомості про авторів:

Шелестова Л. П., д-р мед. наук, професор каф. акушерства та гінекології, Донецький національний медичний університет, м. Лиман, Україна.
Радченко Н. М., асистент каф. акушерства та гінекології, Донецький національний медичний університет, м. Лиман, Україна.

Сведения об авторах:

Шелестова Л. П., д-р мед. наук, профессор каф. акушерства и гинекологии, Донецкий национальный медицинский университет, г. Лиман, Украина.
Радченко Н. М., ассистент каф. акушерства и гинекологии, Донецкий национальный медицинский университет, г. Лиман, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 05.09.2017

Після доопрацювання / Revised: 20.12.2017

Прийнято до друку / Accepted: 09.01.2018

References

- [1] Savel'eva, G. M., Sukhikh, G. T., Serov, V. N., & Radzinskiy, V. E. (Eds.) (2015) *Akusherstvo. Nacional'noe rukovodstvo [Obstetrics. National guidance]*. Moscow: GEHOTAR-Media. [in Russian].
- [2] Romanenko, T. G., Zhaloba, G. N. & Chajka, O. I. (2015) *Sovremennyi vzglyad akushera-ginekologa na patologiyu shchitovidnoj zhelezy i eyo vliyaniya na reproduktivnoe zdorov'e zhenshhiny (klinicheskaya lekcija)* [The modern view of the obstetrician-gynecologist on the pathology of the thyroid gland and its effect on the reproductive health of women (clinical lecture)]. *Zdorov'e zhenshhiny*, 2, 8-13. [in Russian].
- [3] Shi, X., Han, C., Li, C., Mao, J., Wang, W., Xie, X., et al. (2015) Optimal and safe upper limits of iodine intake for early pregnancy in iodine-sufficient regions: a cross-sectional study of 7190 pregnant women in China. *J Clin Endocrinol Metab.*, 100(4), 1630-8. doi: 10.1210/jc.2014-3704.
- [4] Mao, G., Ding, G., Lou, X., Zhang, R., Zheng, P., Mo, Z., et al. (2015) Survey of iodine nutritional status in 2011, Zhejiang, China. *Asia Pac J Clin Nutr.*, 24(2), 234-44. doi: 10.6133/apjn.2015.24.2.08.
- [5] Wang, K., Zhang, J., Li, F., Zhang, W., Wang, H., Ding, L., et al. (2017) Urinary iodine in early pregnancy is associated with subclinical hypothyroidism in Tianjin, China: an observational study. *BMC Endocr Disord.*, 17(1), 10. doi: 10.1186/s12902-017-0162-x.
- [6] Brunn, J., Block, U., Ruf, G., Bos, I., Kunze, W. P., & Scriba, P. C. (1981) Volumetric analysis of thyroid lobes by real-time ultrasound (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr.* 106(41), 1338-40. doi: 10.1055/s-2008-1070506.
- [7] Nazarenko, G. I. & Kishkun, A. A. (2000) *Klinicheskaya ocenka rezul'tatov laboratornykh dannyykh [Clinical evaluation of laboratory data]*. Moscow : Medicina. [in Russian].
- [8] Kaminskyj, O. V. & Tatarchuk, T. F. (2017) Hipotyreozi i vahitnist: novi rekomendatsii shhodo osoblyvostei diahnozyky i taktiky likuvannya [Hypothyroidism and pregnancy: new recommendations on the features of the diagnosis and treatment modality]. *Mizhnarodnyi endokrynologichnyi zhurnal*, 13(2), 152-157. doi: 10.22141/2224-0721.13.2.2017.100605 [in Ukrainian].
- [9] Liu, H., Shan, Z., Li, C., Mao, J., Xie, X., Wang, W., et al. (2014) Maternal subclinical hypothyroidism, thyroid autoimmunity, and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Thyroid.*, 24(11), 1642-9. doi: 10.1089/thy.2014.0029.

Стан клітинної ланки вродженого імунітету в інфертильних чоловіків на тлі токсокарозної інвазії

Л. Л. Воронцова, М. І. Дуб, В. А. Коваленко

ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України»

Ключові слова:
клітинна ланка вродженого імунітету, токсокарозна інвазія, чоловіче безпліддя.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 38–44

DOI:
10.14739/2310-1237.2018.1.129328

E-mail:
zmaro32@gmail.com,
dub.maryana@gmail.com

Дослідження ролі різноманітних факторів у розвитку патоспермії (наявність токсокарозної інвазії, рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів, показники клітинної ланки вродженого імунітету) могло б доповнити вже наявні методи та дати можливість встановити вплив кожного фактора на ультраструктуру сперматозоїдів для кращого розуміння патогенезу порушень чоловічої репродуктивної функції.

Мета роботи – вивчення особливості порушень клітинної ланки вродженого імунітету в чоловіків із безпліддям на тлі токсокарозної інвазії.

Матеріали та методи. Обстежили 89 чоловіків віком від 20 до 45 років, яких поділили на 5 груп: перша (контрольна) – 12 фертильних чоловіків; друга (група порівняння) – 27 інфертильних пацієнтів із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і з відсутністю антитіл до токсокар; третя – 20 інфертильних чоловіків із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар; до четвертої та п'ятої груп увійшли по 15 інфертильних чоловіків із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар та їхньою відсутністю відповідно. Всім чоловікам виконали комплексне дослідження, що включало визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозної інвазії, вивчення стану клітинної ланки вродженого імунітету, оцінювання ступеня розладів імунної системи.

Результати. Незавершеність фагоцитозу нейтрофільної та моноцитарної ланок спостерігали в усіх групах зі збереженням функціонально-метаболического резерву у другій і п'ятій групах і виснаженням його у третій і четвертій. Результати оцінювання ступеня розладів імунної системи показали, що найбільш імунологічно компрометованими є групи без наявності токсокарозної інвазії, в яких встановили імунну недостатність 2–3 ступеня. У групах із наявністю токсокарозу визначали зміни від активації до імунної недостатності 2 ступеня (шляхом зростання поглинальної здатності моноцитів), що, можливо, зумовлено наявністю токсокарозної інвазії, яка, вочевидь, і викликає активацію саме моноцитарної ланки.

Висновки. Стан клітинної ланки вродженого імунітету в інфертильних чоловіків характеризується незавершеністю фагоцитозу як нейтрофільної, так і моноцитарної ланок. Наявність токсокарозної інвазії в цього контингенту хворих вносить певні зміни у фагоцитарну систему, що проявляється зростанням поглинальної здатності саме моноцитів, які є ключовими імунними факторами у захисті від гельмінтів.

Ключевые слова:
клеточное звено вродженого імунітету, токсокарозна інвазія, мужское бесплодие.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 38–44

Состояние клеточного звена врожденного иммунитета у инфертильных мужчин на фоне токсокарозной инвазии

Л. Л. Воронцова, М. И. Дуб, В. А. Коваленко

Исследование роли различных факторов в развитии патоспермии (наличие токсокарозной инвазии, уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, показателей клеточного звена врожденного иммунитета) могло бы дополнить уже существующие методы и позволить установить влияние каждого фактора на ультраструктуру сперматозоидов для более углубленного понимания патогенеза нарушенной мужской репродуктивной функции.

Цель работы – изучение особенностей нарушенной клеточного звена врожденного иммунитета у мужчин с бесплодием на фоне токсокарозной инвазии.

Материалы и методы. Обследовали 89 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет, которые были разделены на 5 групп: первую (контрольную) группу составили 12 фертильных мужчин; вторую (группу сравнения) – 27 инфертильных пациентов с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и с отсутствием антител к токсокарам; третью – 20 инфертильных мужчин с нормальным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам; четвертую и пятую группы – по 15 инфертильных мужчин с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и наличием антител к токсокарам и их отсутствием соответственно. Всем мужчинам проведено комплексное исследование, включающее определение уровня фрагментации ДНК сперматозоидов и наличия токсокарозной инвазии, изучение состояния клеточного звена врожденного иммунитета, оценку степени расстройств иммунной системы.

Результаты. Незавершенность фагоцитоза нейтрофильного и моноцитарного звеньев отмечена во всех исследуемых группах с сохранением функционально-метаболического резерва во второй и пятой группах и истощением его в третьей и четвертой. Результаты оценки степени расстройств иммунной системы показали, что наиболее иммунологически компрометируемые группы – без наличия токсокарозной инвазии, в которых наблюдали иммунную недостаточность 2–3 степени. В группах с наличием токсокароза определены изменения от активации до иммунной недостаточности 2 степени (за счет роста поглотительной способности моноцитов), что, возможно, обусловлено наличием токсокарозной инвазии, которая, очевидно, и вызывает активацию именно моноцитарного звена.

Выводы. Состояние клеточного звена врожденного иммунитета у инфертильных мужчин характеризуется незавершенностью фагоцитоза как нейтрофильного, так и моноцитарного звеньев. Наличие токсокарозной инвазии у данного контингента больных вносит определенные изменения в фагоцитарную систему, проявляется ростом поглотительной способности именно моноцитов, которые являются ключевыми иммунными факторами в защите от гельминтов.

Condition of a cellular link of innate immunity in infertile men against the background of toxocariasis invasion

L. L. Vorontsova, M. I. Dub, V. A. Kovalenko

Aim. Investigating the role of various factors in the development of pathospermia, such as: the presence of toxocariasis invasion, the level of DNA fragmentation of sperm, indices of the cellular link of innate immunity, could complement existing methods and will allow the determination of the share of influence of each factor on the ultrastructure of spermatozoa for a more in-depth understanding of the pathogenesis of violations of male reproductive function. That is why the aim of our research was to study the peculiarities of disorders of the cellular link of innate immunity in men with infertility against the background of toxocariasis invasion.

Materials and methods. 89 men aged from 20 to 45 years, which 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 normal level of DNA fragmentation of sperm and without antibodies to toxocariasis; the third group – 20 infertile men with normal level of DNA fragmentation of sperm and presence of antibodies to toxocariasis. The fourth and fifth groups included 15 infertile men with high levels of DNA fragmentation of sperm and the presence and absence of antibodies to toxocariasis respectively. A comprehensive research was conducted for all the men that included determination of sperm DNA fragmentation, presence of toxocariasis invasion and the study of the state of the cellular link of innate immunity as well as assessment of the degree of immune system disorders.

Results. The incompleteness of phagocytosis in neutrophilic and monocytic elements was observed in all studied groups, in the second and fifth groups with the preservation of the functional-metabolic reserve and the depletion of it in the third and fourth groups. The results of the assessment of the degree of immune system disorders have shown that most immunologically compromised are the groups without the presence of toxocariasis invasion, in which there was an immune failure of 2–3 degree. In groups with the presence of toxocariasis, on the contrary, changes from activation to immune failure of 2 degree (due to the growth of absorbing capacity of monocytes) were determined, which may be due to the presence of toxocariasis invasion, which, in turn, obviously causes the activation of the monocytic link.

Conclusions. The state of the cellular link of innate immunity in infertile men is characterized by incompleteness of phagocytosis of both neutrophilic and monocytic elements. The presence of toxocariasis invasion in this contingent of patients, in turn, introduces certain changes to the phagocytic system, which manifests itself as an increase in absorbing capacity of monocytes, which are key immune factors in the protection against helminths.

Key words:
innate immunity,
toxocariasis,
male infertility.

Pathologia
2018; 15 (1), 38–44

Зважаючи на тенденцію до збільшення частоти випадків чоловічого безпліддя, суперечливі підходи до тактики ведення таких пацієнтів, недостатньо ефективне лікування, можна стверджувати, що це пов'язано з нез'ясованими до кінця механізмами розвитку та перебігу захворювання. І хоча в ряді випадків причини інфертильності ідентифікуються доволі легко (наприклад, анатомічні та гормональні порушення), однак у значній кількості пацієнтів встановлення етіологічного фактора ускладнене (так зване ідіопатичне безпліддя), саме тому адекватна діагностика набуває особливого значення [1,2].

Останнім часом зниження фертильності у чоловіків пов'язують з поширенням негативного впливу різних факторів довкілля (екологічних, соціально-економічних, інфекційних), що діють на рівні організму, клітинному, молекулярному рівнях і призводять до патозооспермії [3–6]. Одним із таких факторів, що здатний викликати порушення репродуктивної функції в чоловіків, є токсокароз – один із найбільш поширених гельмінтозів, захворюваність яким стала серйозною медико-соціальною проблемою для багатьох країн, включаючи Україну. Зараженість населення токсокарозом коливається від 3–7 % в європейських країнах і до 50–82 % – в Індонезії. Зокрема, у США кількість серопозитивних осіб становить 13,9 %, у Польщі – 14,5 % [7]. В Україні, за даними офіційної статистики, щорічно реєструють 300–400 тис. випадків токсокарозу [8].

У 1999 р. В. Я. Бекишем висунута гіпотеза, що метаболіти гельмінтів, у тому числі метаболіти токсокар, можуть викликати не тільки порушення в генетичному апараті соматичних клітин господаря, але і в

його генеративних клітинах, а також є потенційними мутагенами статевих клітин ссавців і людини [9]. Так, під час дослідження експериментального токсокарозу встановлено: метаболіти личинок токсокар здатні генотоксично впливати на кінцеву стадію сперматогенезу – сперматозоїди сім'яників, зумовлюючи підвищення рівня цих клітин із пошкодженою одноланцюговою ДНК [10]. Однак вивчення впливу токсокарозої інвазії на репродуктивну систему обмежуються тільки дослідженнями, які виконані на тваринах (експериментальний токсокароз), саме тому важливо оцінити вплив цього гельмінтозу на розвиток порушень фертильності в чоловіків репродуктивного віку.

Тривалий час чоловічий репродуктивний тракт та імунну систему вивчали окремо як не пов'язані системи. Але в останні два десятиліття особливий інтерес виник до впливу імунної системи на чоловічу фертильність. Встановлено, що ця система відіграє важливу роль у репродукції людини, і зміна імунного гомеостазу може порушити нормальний репродуктивний процес і зумовити безпліддя [11,12]. Токсокароз, безумовно, також впливає на імунну систему хазяїна, і саме на клітини імунітету, котрі конституційно призначені для елімінації генетично чужорідності, якими є личинки токсокар [13–15].

В організмі господаря гельмінти викликають широкий спектр імунних реакцій, природа та механізм яких специфічні, оскільки гельмінти можуть бути джерелами численних антигенних подразників [16]. У фаховій літературі широко дискутується питання щодо ролі імунологічних порушень у розвитку чоловічого безпліддя. Завдяки достатньо великій кількості досліджень в

основному з'ясовані зміни клітинного імунітету, але відомості про стан системи фагоцитозу, включаючи нейтрофільні та моноцитарні ланки, майже відсутні, хоча було б правильно починати вивчення механізмів захисту саме з фагоцитозу як найбільш ранньої, термінової та ефективної реакції організму [17, 18].

Отже, дослідження ролі різноманітних факторів у розвитку патоспермії – наявності токсокарозої інвазії, рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів, показників клітинної ланки вродженого імунітету – могли б доповнити чинні методи та дали б змогу встановити вплив кожного фактора на ультраструктуру сперматозоїдів для кращого розуміння патогенезу порушень чоловічої репродуктивної функції.

Мета роботи

Вивчення особливостей змін клітинних факторів вродженого імунітету в чоловіків із порушенням репродуктивної функції на тлі токсокарозої інвазії.

Матеріали і методи дослідження

Обстежили 89 чоловіків віком від 20 до 45 років, котрі дали інформовану письмову згоду на участь у дослідженні, котре схвалене комітетом із біоетики ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України». Дослідження здійснили відповідно до етичних і морально-правових вимог наказу Міністерства охорони здоров'я України № 281 від 01.11.2000 р.

Пацієнтів поділили на п'ять груп:

– перша (контрольна) – 12 фертильних, практично здорових чоловіків, які пройшли обстеження як донори банку сперми (згідно з наказом МОЗ України № 787 від 09.09.2013 р.);

– друга (порівняння) – 27 інфертильних пацієнтів з нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і з відсутністю антитіл до токсокар;

– третя – 20 інфертильних чоловіків із нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар;

– четверта – 15 інфертильних чоловіків із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар;

– п'ята – 15 інфертильних чоловіків із високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів без антитіл до токсокар.

У чоловіків дослідних груп під час бактеріологічного дослідження еякуляту виявили бактеріоспермію, що зумовлена грампозитивною та грамнегативною флорою, а також наявність інфекцій, які передаються статевим шляхом.

Усім чоловікам виконали комплексне дослідження, що включало визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів, наявності токсокарозої інвазії та вивчення стану клітинних факторів вродженого імунітету.

Фрагментацію ДНК сперматозоїдів здійснили методом Sperm Chromatin Dispersion test (патент РФ № 2373288) з наступною візуалізацією за допомогою світлового мікроскопа GRANUM. За нормальні значення вважали рівень цього показника до 30 % із підра-

хованих 500 сперматозоїдів за допомогою світлового мікроскопа GRANUM.

Наявність токсокарозої інвазії встановлювали шляхом виявлення в сироватці крові кількості антитіл імуноглобулінів G (IgG) до антигенів токсокар імуноферментним методом за допомогою аналізатора фотометричного Immucorchem-2100 (НТІ, США) та з використанням набору реактивів «Вітротест» (Україна). Для кожної дослідної проби розраховували індекс позитивності за відношенням оптичної густини зразка до граничного значення негативного контролю. Результат вважали позитивним при значеннях >1,1.

Для дослідження клітинних факторів вродженої резистентності визначали фагоцитарну активність нейтрофілів і моноцитів крові. В основі дослідження – методика встановлення їх поглинальної і перетравлюваної здатності щодо мікробної тест-культури після спільної преінкубації (за Г. Н. Фрімелем) [19].

Кисневозалежний метаболізм нейтрофілів (НСТ-тест) і функціональний резерв клітин (стимульований НСТ-тест) визначали за М. Є. Віксманом, А. Н. Маянським [20].

Дослідження активності мієлопероксидази (МПО) нейтрофілів здійснювали цитохімічно за модифікованим методом Р. П. Нарцисова [21].

Вміст катіонних білків (КБ) у нейтрофілах визначали за допомогою методу з бромфеноловим синім за М. Г. Шубичем [22].

Вивчаючи стан клітинних факторів вродженого імунітету, візуальне оцінювання здійснювали за допомогою мікроскопа з імерсійною системою GRANUM. Під час виконання методик використовували такі прилади: центрифуга СМ-6, термостат ТС-80-М2, термостат ТW-2, лічильник лабораторний С-5, секундомір СОП, рН-метр 150 М, ареометр АОН-1, ваги електронні FR-H-600, гігрометр ВІТ-2, холодильник Indesit, термометр ТС-7М1.

Ступінь імунних розладів розраховували за універсальною формулою розладів імунної системи (ФРІС), запропонованою А. М. Земсковим та ін. [23]:

$(\text{показник хворого/нормальний показник} - 1) \times 100 \%$

Якщо розрахована величина має знак «мінус», у хворого визначається імунна недостатність (-1, -2, -3), якщо «плюс» – гіперфункція імунної системи (+1, +2, +3). Коли отримана величина знаходиться в інтервалі 1–33 %, це оцінюють як перший ступінь імунних розладів (-1), діапазон коливань від 34 % до 66 % відповідає другому ступеню (-2), перевищення 66 % – третьому (-3).

Статистично цифрові результати опрацювали за допомогою програми Statistica (StatSoft Statistica v.6.0.; номер ліцензії програми STA 862D175437Q) з використанням тесту Вальда-Вольфовиця (Wald-Wolfowitz runs test), порівнюючи дві незалежні групи. Різницю вважали вірогідною при досягнутому рівні значущості $p < 0,05$. Дані наведені як медіана (Me) і міжквартильний розмах (RQ), який являє собою різницю між значеннями 75-го і 25-го процентилей ($RQ = 75\% UQ - 25\% LQ$), де UQ – верхній квартиль; LQ – нижній квартиль.

Таблиця 1. Стан функціонально-метаболічного статусу нейтрофілів і моноцитів у фертильних та інфертильних чоловіків, Me (75%Q – 25%Q = RQ)

Показник, одиниці вимірювання	1 група (n = 12)	2 група (n = 27)	3 група (n = 20)	4 група (n = 15)	5 група (n = 15)
ФІН на 30 хв, %	66,5 (68,0–66,0 = 2,0)	50,0* (54,0–38,0 = 16,0)	38,0* (53,0–35,0 = 18,0)	38,0* (48,0–38,0 = 10,0)	45,0* (58,0–38,0 = 20,0)
ФЧН на 30 хв, у.о.	2,2 (2,3–2,1 = 0,2)	1,5* (1,8–1,3 = 0,5)	1,5* (1,7–1,4 = 0,3)	1,5* (1,7–1,4 = 0,3)	1,4* (1,5–1,3 = 0,2)
ФІН на 120 хв, %	56,0 (57,0–55,0 = 2,0)	40,0* (50,0–33,0 = 17,0)	38,0* (50,0–25,0 = 25,0)	39,0* (50,0–30,0 = 12,0)	42,0* (52,0–30,0 = 22,0)
ФЧН на 120 хв, у.о.	3,0 (3,1–2,9 = 0,2)	1,4* (1,7–1,2 = 0,5)	1,4* (1,8–1,2 = 0,6)	1,5* (1,7–1,4 = 0,3)	1,3* (1,5–1,0 = 0,5)
ФІМ на 30 хв, %	34,5 (36,5–33,0 = 3,5)	28,0 (30,0–25,0 = 5,0)	30,0* (44,0–25,0 = 19,0)	30,0 (34,0–25,0 = 9,0)	27,0* (28,0–24,0 = 4,0)
ФЧМ на 30 хв, у.о.	2,0 (2,2–1,9 = 0,3)	1,3* (1,5–1,2 = 0,3)	1,4* (1,5–1,3 = 0,2)	1,5* (1,8–1,4 = 0,4)	1,3* (1,5–1,2 = 0,3)
ФІМ на 120 хв, %	20,0 (21,5–19,0 = 2,5)	25,0* (30,0–20,0 = 10,0)	34,0 (40,0–20,0 = 20,0)	30,0 (31,0–22,0 = 9,0)	20,0 (25,0–20,0 = 5,0)
ФЧМ на 120 хв, у.о.	3,0 (3,2–2,8 = 0,4)	1,2* (1,5–1,1 = 0,4)	1,5* (1,7–1,4 = 0,3)	1,3* (1,7–1,2 = 0,5)	1,1** (1,3–1,0 = 0,3)
НСТсп, у.о.	2,1 (2,2–1,9 = 0,3)	1,7* (1,8–1,3 = 0,5)	1,5 (2,0–1,5 = 0,5)	1,7* (1,7–1,4 = 0,3)	1,9 (2,0–1,7 = 0,3)
НСТст, у.о.	2,0 (2,2–1,9 = 0,3)	2,0 (2,0–1,8 = 0,2)	1,8 (2,0–1,3 = 0,7)	1,7** (2,0–1,5 = 0,5)	2,0 (2,3–1,9 = 0,4)
КБ, у.о.	2,3 (2,3–2,2 = 0,1)	1,6* (1,8–1,5 = 0,3)	1,8* (1,9–1,6 = 0,3)	2,0* (2,0–1,5 = 1,6)	1,5* (1,9–1,2 = 0,7)
МПО, у.о.	2,2 (2,3–2,1 = 0,2)	2,4 (2,7–2,1 = 0,6)	2,8* (2,8–1,6 = 1,2)	2,3 (2,6–2,1 = 0,5)	2,3 (2,8–2,0 = 0,8)

*: $p < 0,05$ щодо 1 групи; **: $p < 0,05$ щодо 2 групи.

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження системи фагоцитозу в пацієнтів другої групи виявили зниження поглинальної функції нейтрофілів (ФІН) на 30 і 120 хв на 25 % і 29 % відповідно. Перетравлювана здатність нейтрофілів (ФЧН) також була знижена на 30 хв на 32 %, на 120 хв на 54 % щодо показників контрольної групи.

Під час дослідження моноцитарної ланки спостерігали зниження поглинальної функції на 30 хв і збільшення на 120 хв на 19 % і 25 % відповідно. Перетравлювана здатність була знижена як на 30 хв, так і на 120 хв – на 35 % та 60 % щодо показників контрольної групи відповідно (табл. 1).

Показники спонтанного НСТ-тесту знижені на 19 %, а стимульованого відповідали значенням контрольної групи.

Під час дослідження показників мікробіцидної системи виявили: КБ були знижені на 20 %, а показники МПО збільшені на 9 %, що є статистично невірним, але клінічно значущим.

Отже, в пацієнтів другої групи виявили зниження поглинальної та перетравлюваної здатності нейтрофілів, а також підвищення поглинальної та зниження перетравлюваної функції моноцитів, що свідчить про незавершеність фагоцитозу вказаних ланок на тлі збереження функціонально-метаболічного резерву клітин і виснаження мікробіцидної системи, зокрема КБ.

У пацієнтів третьої групи спостерігали зниження поглинальної здатності нейтрофілів на 30 і 120 хв на 43 % та 33 %; перетравлюваної – на 32 % та 54 % щодо групи контролю. Під час дослідження моноцитарної ланки спостерігали зниження поглинальної функції на 30 хв на 13 % та збільшення на 120 хв на 70 %; перетравлювана здатність знижена на 30 % і 50 % відповідно щодо групи контролю.

Показники НСТ-тесту (спонтанного та стимульованого) були знижені на 29 % і 10 % відповідно щодо групи контролю.

Вміст КБ був зниженим на 22 %, а МПО збільшеним на 27 % щодо групи контролю.

Отже, у третій групі спостерігали недостатність поглинальної та перетравлюваної функції нейтрофілів при підвищенні поглинальної та зниженні перетравлюваної здатності моноцитів. Це свідчить про незавершеність фагоцитозу як нейтрофільної, так і моноцитарної ланок на тлі виснаження функціонально-метаболічного резерву та дисбалансу мікробіцидної системи (підвищення МПО та зниження КБ).

У пацієнтів четвертої групи встановили зниження на 30 і 120 хв як поглинальної здатності нейтрофілів, так і перетравлюваної здатності на 43 % і 31 %, 32 % і 50 % щодо контрольної групи. У моноцитів спостерігали зниження поглинальної здатності на 30 хв на 13 % та збільшення на 120 хв на 50 % щодо контрольної групи; зниження перетравлюваної здатності на 30 і 120 хв на 25 % і 57 % відповідно щодо контрольної групи.

Показники НСТ-тесту (спонтанного та стимульованого) були знижені на 19 % та 15 % відповідно щодо контрольної групи.

Вміст КБ знижувався на 13 % щодо контрольної групи, значення МПО майже відповідали контролю.

Отже, в четвертій групі також спостерігали незавершений фагоцитоз як нейтрофільної, так і моноцитарної ланок (встановили зниження поглинальної та перетравлюваної здатності нейтрофілів, підвищення поглинальної та зниження перетравлюваної функції моноцитів) на тлі виснаження функціонально-метаболічного резерву та мікробіцидної системи.

У пацієнтів п'ятої групи спостерігали зниження поглинальної та перетравлюваної здатності нейтрофілів на 30 і 120 хв на 33 % і 25 % та 36 % і 57 % відповідно щодо контрольної групи. Поглинальна здатність моноцитів знижувалась на 30 хв на 22 % щодо контрольної групи, а на 120 хв відповідала її значенням. Перетравлювана здатність моноцитів була знижена на 30 і 120 хв на 35 % і 64 % відповідно щодо контрольної групи.

Показники НСТ-тесту спонтанного були зниженими на 9 %, а стимульованого відповідали значенням контрольної групи.

Вміст КБ був знижений на 35 % щодо контрольної групи, вміст МП майже відповідав контролю.

Отже, спостерігали зниження поглинальної та перетравлюваної здатності як нейтрофілів, так і моноцитів, що вказує на незавершеність фагоцитарної функції обох клітинних ланок вродженого імунітету на тлі збереження функціонально-метаболического резерву клітин і виснаження мікробіцидної системи.

Результати досліджень показали, що незавершеність фагоцитозу нейтрофільної та моноцитарної ланок визначали в усіх групах (2, 3, 4, 5 групи) зі збереженням функціонально-метаболического резерву у другій і п'ятій групах, виснаження його у третій і четвертій.

Виходячи з отриманих даних, цікаво визначити ступінь імунологічних розладів у всіх групах пацієнтів із порушеннями репродуктивної функції на тлі токсокарозної інвазії. Визначення ступеня розладів неспецифічної імунної системи дало можливість встановити найбільш імунологічно скомпрометовані ланки фагоцитозу.

Для другої групи ФРІС нейтрофільної ланки має вигляд $FIN_{30}^{-1} FCH_{30}^{-2} FIN_{120}^{-1} FCH_{120}^{-2} NST_{ст}^{-1}$ (властива недостатності 1–2 ступеня), для моноцитарної ланки – $FIM_{30}^{-1} FCM_{30}^{-2} FIM_{120}^{-1} FCM_{120}^{-3}$ (характерна для недостатності 1–3 ступенів).

Для третьої групи формула нейтрофільної ланки має вигляд $FIN_{30}^{-2} FCH_{30}^{-2} FIN_{120}^{-2} FCH_{120}^{-2} NST_{ст}^{-1} NST_{ст}^{-1}$ (властива недостатності 1–2 ступеня), для моноцитарної ланки – $FIM_{30}^{-1} FCM_{30}^{-1} FIM_{120}^{-2} FCM_{120}^{-2}$ (характеризує зміни від недостатності до активації 2 ступеня).

Для четвертої групи формула нейтрофільної ланки має вигляд $FIN_{30}^{-2} FCH_{30}^{-2} FIN_{120}^{-2} FCH_{120}^{-2} NST_{ст}^{-1} NST_{ст}^{-1}$ (властива недостатності 1–2 ступеня), для моноцитарної ланки – $FIM_{30}^{-1} FCM_{30}^{-1} FIM_{120}^{-2} FCM_{120}^{-2}$ (характеризує зміни від недостатності до активації 2 ступеня).

Для п'ятої групи формула нейтрофільної ланки має вигляд $FIN_{30}^{-2} FCH_{30}^{-2} FIN_{120}^{-1} FCH_{120}^{-2} NST_{ст}^{-1}$ (властива недостатності 1–2 ступеня), для моноцитарної ланки – $FIM_{30}^{-1} FCM_{30}^{-2} FCM_{120}^{-3}$ (характерна для недостатності 2–3 ступенів).

Судячи з результатів вивчення ступеня розладів імунної системи в пацієнтів усіх груп, можна зробити висновок: найбільш імунологічно скомпрометованими є друга й п'ята групи (без наявності токсокарозної інвазії), в яких спостерігали недостатність 2–3 ступенів.

У третій і четвертій групах визначили зміни ФРІС від активації до недостатності 2 ступеня (шляхом зростання поглинальної функції моноцитів), що, можливо, зумовлено наявністю токсокарозної інвазії, котра, вочевидь, і викликає активацію саме моноцитарної ланки.

В основному атака клітин паразита здійснюється за допомогою антитілозалежної клітинно опосередкованої цитотоксичності, і як ефекторні клітини при цьому діють саме макрофаги, котрі внаслідок фагоцитозу та продукції певних цитокінів сприяють швидкому вигнанню пошкодженого імунною реакцією гельмінта [24,25].

Отже, отримані нами дані узгоджуються зі сталою думкою про розвиток дисбалансу імунологічних показників на тлі паразитарної інвазії, що виражений у формі кількісних і функціональних змін серед моноцитів, нейтрофілів і лімфоцитів периферичної крові, а також у формі порушення нормальних співвідношень клітинних субпопуляцій, що є основою порушення імунологічної реактивності [26,27].

Висновки

1. У результаті дослідження встановили, що токсокароз викликає імунопатологічні реакції, зумовлені ступенем взаємної адаптації паразита та хазяяна.

2. Найбільш імунологічно компрометованими є групи без наявності токсокарозної інвазії (друга та п'ята), що проявляється незавершеністю фагоцитозу обох ланок зі змінами ФРІС (недостатність 2–3 ступенів) на тлі збереження функціонально-метаболического резерву.

3. У чоловіків з наявністю токсокарозної інвазії (третья та четверта групи) визначається незавершеність фагоцитозу як нейтрофільної, так і моноцитарної ланок зі змінами ФРІС (від недостатності до активації 2 ступеня) на тлі виснаження функціонально-метаболического резерву.

4. Дослідження клітинної ланки вродженого імунітету в чоловіків із порушенням репродуктивної функції є необхідною складовою комплексного обстеження, що дасть змогу вдосконалити діагностику чоловічого безпліддя та сприятиме розробленню патогенетично обґрунтованої тактики лікування.

Перспективи подальших досліджень. З огляду на наведені факти, планується комплексне вивчення стану вродженого та набутого імунітету, включаючи дослідження цитокінового статусу у фертильних та інфертильних чоловіків з урахуванням рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявності токсокарозної інвазії для розроблення нових патогенетично обґрунтованих підходів діагностики чоловічого безпліддя.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

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., старший 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».

Сведения об авторах:

Воронцова Л. Л., д-р мед. наук, профессор, ГЗ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

Дуб М. И., старший преподаватель каф. клинической лабораторной диагностики, ГЗ «Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины».

Коваленко В. А., канд. биол. наук, старший преподаватель каф. клинической лабораторной диагностики, ГЗ «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 in Biology, Senior Lecturer, State Establishment "Zaporizhzhia Medical Academy of Post Graduate Education of Ministry of Health of Ukraine".

Надійшла до редакції / Received: 22.01.2018

Після доопрацювання / Revised: 13.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 15.02.2018

Список літератури

- [1] Nordkap L. Male infertility / L. Nordkap, E. Carlsen, J. Fedder // *Ugeskr Laeger*. – 2012. – Vol. 41(174). – P. 2444–2448.
- [2] Centola G.M. Semen assessment / G.M. Centola // *Urol Clin North Am*. – 2014. – Vol. 1(41). – P. 163–167.
- [3] Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility / J. Castillo, J.M. Estanyol, J.L. Balleška, et al. // *Asian J Androl*. – 2015. – Vol. 17(4). – P. 601–609.
- [4] Guidelines on Male Infertility / A. Jugwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, et al. // *European Association of Urology*. – 2015. – 42 p.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Masperson C.N. The epidemiology and public health importance of toxocarasis: a soonosis of global importance / C.N. Masperson // *Int J Parasitol*. – 2013. – Vol. 43(12–13). – P. 999–1008.
- [8] Вісцеральний токсокароз: особливості клінічного перебігу (клінічний випадок) / О.В. Усачова, О.А. Дралова, О.В. Конакова, В.В. Бондарева // *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика*. – 2013. – №3. – С. 304–307.
- [9] Бекиш В.Я. Метаболиты гельминтов как вероятные мутагены половых клеток владельца / В.Я. Бекиш // *Вопросы экспериментальной биологии и медицины*: сб. науч. трудов. – Витебск, 1999. – С. 70–73.
- [10] Бекиш В.Я. Состояние генома владельца при гельминтозах / В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш. – Витебск: Изд-во ВГМУ, 2004. – 218 с.
- [11] Оценка влияния иммунологических факторов на структурную организацию хроматина сперматозоидов / М.Н. Тарасова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, И.А. Газиева // *Иммунология Урала: материалы VI конференции иммунологов Урала (28–31 октября 2007 г.)*. – 2007. – №1(6). – С. 165–167.
- [12] Этиология аутоиммунного мужского бесплодия / В.А. Божедомов, М.А. Николаева, И.В. Ушакова, и др. // *Акушерство и гинекология*. – 2013. – №2. – С. 68–76.
- [13] Иммунодиагностика токсокароза / П.Д. Новиков, Ю.Т. Никулин, Ж.В. Хотетовская, Д.К. Новиков // *Иммунология, инфектология, аллергология*. – 2007. – №2(65). – С. 65–72.
- [14] Адаменко Г.П. Токсокароз – неотложная проблема общественного здравоохранения / Г.П. Адаменко, Ю.Т. Никулин // *Медицинские новости*. – 2004. – №2. – С. 31–36.

- [15] Стибель В.В. Дослідження кількості Т-і В-лімфоцитів за дії *Toxocara canis* / В.В. Стибель, О.Б. Прийма, С.І. Пономар // *Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького*. – 2014. – Т. 16. – №3(60). – С. 330–334.
- [16] Начева Л.В. Клеточные реакции при гельминтозах / Л.В. Начева, А.В. Литягина // *Российский паразитологический журнал*. – 2012. – №3. – С. 80–86.
- [17] Савельева Н.Н. Фагоцитарная активность нейтрофилов крови у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом I–II степени тяжести на фоне паразитов / Н.Н. Савельева // *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. – 2016. – Т. 15. – №4. – С. 80–87.
- [18] Висмонт Ф.И. Воспаление (патофизиологические аспекты): учебное пособие / Ф.И. Висмонт. – Минск: БГМУ, 2006. – 48 с.
- [19] Фримель Н. Иммунологические методы / Г.Н. Фримель. – М.: Медицина, 1984. – 472 с.
- [20] Вискман М.Е. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросиногена тетразолия: методические рекомендации / М.Е. Вискман, А.Н. Мянский. – Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. – 21 с.
- [21] Нарцисов Р.П. Цитохимические исследования лейкоцитов / Р.П. Нарцисов // *Лабораторное дело*. – 1964. – №3. – С. 150–151.
- [22] Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего / М.Г. Шубич // *Цитология*. – 1974. – №10. – С. 1321–1322.
- [23] Руководство по клинической иммунологии для клинических врачей / А.М. Земсков, В.М. Земсков, В.А. Черешнев и др. – М.: Трианда-Х, 2011. – 288 с.
- [24] Makepeace B.L. Granulocytes in Helminth Infection – Who is Calling the Shots? / B.L. Makepeace, C. Martin, J.D. Turner, S. Specht // *Curr Med Chem*. – 2012. – Vol. 19(10). – P. 1567–1586.
- [25] Kreider T. Alternatively activated macrophages in helminth infections / T. Kreider, R.M. Anthony, J.F. Urban, W.C. Gause // *Curr Opin Immunol*. – 2007. – Vol. 19(4). – P. 448–453.
- [26] Гришина Е.А. Некоторые механизмы вторичной иммуносупрессии в процессе хронизации геогельминтозов / Е.А. Гришина, А.С. Довгалев // *Российский паразитологический журнал*. – 2016. – № 36(2). – С. 202–209.
- [27] Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity / G. Coakley, J.L. McCaskill, J.G. Borger et al. // *Cell Reports*. – 2017. – Vol. 19(8). – P. 1545–1557.

References

- [1] Nordkap, L., Carlsen, E., & Fedder, J. (2012). Male infertility. *Ugeskr Laeger*, 41(174), 2444–2448.
- [2] Centola, G. M. (2014). Semen assessment. *Urol Clin North Am*, 1(41), 163–167.
- [3] Castillo, J., Estanyol, J. M., Balleška, J. L., & Oliva, R. (2015). Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl*, 17(4), 601–609. doi: 10.4103/1008-682X.153302.
- [4] Jugwirth, A., Diemer, T., Dohle, G. R., Giwerzman, A., Kopa, Z., Krausz, C., & Tournaye, H. (2015). Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology*.
- [5] 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]. *Medycinskie aspekty zdorovya muzhchyny*, 2(17), 63–68. [in Ukrainian].
- [6] 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.
- [7] Masperson, C. N. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocarasis: a soonosis of global importance. *Int J Parasitol*, 43(12–13), 999–1008. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.004.
- [8] Usachova, O. V., Dralova, O. A., Konakova, O. V., & Bondareva, V. V. (2013). Vistseralnyy toksokaroz: osoblyvosti klinichnoho perebihu (klinichnyi vypadok) [Visceral toxocarasis: clinical features (case report)]. *Zbirnyk naukovykh prats spivrobitnykiv NMAPO imeni P.L. Shupyka*, 3, 304–307. [in Ukrainian].
- [9] Bekish, V. Ya. (1999). Metabolity gel'mintov kak veroyatnye mutageny polovykh kletok vladel'ca [Metabolites of helminths as probable mutagenes of the germ cells of the owner]. *Voprosy eksperimental'noj biologii i medicyny*. (P. 70–73). Vitebsk. [in Russian].
- [10] Bekish, V. Ya., & Bekish, O. -Ya. L. (2004). *Sostoyanie genoma vladel'ca pri gel'mintozakh [State of the owner's genome in helminthiasis]*. Vitebsk: Izd-vo VGMU. [in Russian].
- [11] Tarasova, M. N., Chistyakova, G. N., Remizova, I. I., Gazieva, I. A. (2007). Ocenka vliyaniya immunologicheskikh faktorov na strukturnuyu organizaciyu khromatina spermatozoidov [Assessment of the influence of immunological factors on the structural organization of sperm chromatin]. *Immunologiya Urala Proceedings of the VI Conference of immunologists of the Urals*, 1(6), 165–167. [in Russian].

- [12] Bozhedomov, V. A., Nikolayeva, M. A., Ushakova, I. V., Sporish, E. A., Rokhlikov, I. M., Lipatova, N. A., et al. (2013). Etiologiya autoimmunogo muzhskogo besplodiya [Etiology of autoimmune male infertility] *Akusherstvo i ginekologiya*, 2, 68–76. [in Russian].
- [13] Novikov, P. D., Nikulin, Yu. T., Hotetovskaya, J. V., & Novikov, D. K. (2007). Immunodiagnostika toksokaroza [Immunodiagnosis of toxocarasis]. *Immunologiya, infektologiya, allergologiya*, 2, 65–72. [in Russian].
- [14] Adamenko, G. P., & Nikulin, Yu. T. (2004). Toksokaroz – neotlozhnaya problema obschestvennogo zdravookhraneniya [Toksokaroz – an urgent public health problem]. *Medicinskie novosti*, 2, 31–36. [in Russian].
- [15] Stybel, V., Prijma, O., & Ponomar, S. (2014). Doslidzhennia kilkosti T- i B-limfotsytiv za diyi Toxocara canis [Studies quantities of T- and B-lymphocytes under the influence for action invasion Toxocara canis]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT im. S.Z. Hzhyskoho*, 16, 3(60), 330–334. [in Ukrainian].
- [16] Natcheva, L. V., & Lityagina, A. V. (2012). Kletochnye reakcii pri gel'mintozakh [Cellular reactions at helminthosis]. *Rossiiskij parazitologicheskij zhurnal*, 3, 80–86. [in Russian].
- [17] Savelyeva, N. N. (2016). Fagocitarnaya aktivnost' neitrofilov krovi u paciyentov s khronicheskim generalizovannym parodontitom I–II stepeni tyazhesti na fone parazitov [The phagocytic activity of blood neutrophils in patients with chronic generalized periodontitis of the 1st–2nd degree severity on the background of parasitoses]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 15(4), 80–87. [in Russian].
- [18] Vismont, F. I. (2006) *Vospalenie (patofiziologicheskie aspekty) [Inflammation (pathophysiological aspects)]*. Minsk: BGMU.
- [19] Frimel', G. N. (1984) *Immunologicheskie metody [Immunological methods]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
- [20] Viksman, M. E., & Mayanskij, A. N. (1979). *Sposob ocenki funkcional'noj aktivnosti neitrofilov cheloveka po reakcii vosstanovleniya nitrosinego tetrazoliya [Way of estimating the functional activity of human neutrophils by the reduction reaction of nitroblue tetrazolium]*. Kazan': Kazanskij NIIE'M. [in Russian].
- [21] Narcissov, R. P. (1964) Citokhimicheskie issledovaniya lejkcitov [Cytochemical researches of leukocytes]. *Laboratornoe delo*, 3, 150–151. [in Russian].
- [22] Shubich, M. G. (1974) Vyyavlenie kationnogo belka v citoplazme lejkciotov s pomosh'h'yu bromfenolovogo sinego [Identification of cationic protein in cytoplasm of leukocytes with bromophenol blue]. *Citologiya*, 10, 1321–1322. [in Russian].
- [23] Zemskov, A. M., Zemskov, V. M., Chereshev, V. A. (2011). *Rukovodstvo po klinicheskoy immunologii dlya klinicheskikh vrachej [Guide to Clinical Immunology for Clinical Physicians]*. Moscow: Triada-Kh. [in Russian].
- [24] Makepeace, B. L., Martin, C., Turner, J. D., Specht, S. (2012). Granulocytes in Helminth Infection – Who is Calling the Shots? *Curr Med Chem*. 19(10), 1567–1586.
- [25] Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F., Gause, W. C. (2007) Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*. 19(4), 448–453.
- [26] Grishina, E. A., Dovgalev, A. S. (2016). Nekotoryye mekhanizmy vtorichnoy immunosupressii v protsesse khronizatsii geogel'mintozov [Certain mechanisms of secondary immunosuppression under chonisation of geohelminthiasis]. *Russian Journal of Parasitology*. 36 (2), 202–209. [in Russian].
- [27] Coakley, G., McCaskill, J. L., Borger, J. G., Simbari, F., Robertson, E., Millar, M., Harcus, Y., McSorley, H. J., Maizels, R. M., Buck, A. H. (2017). Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Reports*. 19 (8), 1545-1557.

The interaction of morphological changes in the liver with the development of extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C

Yu. Yu. Riabokon, V. A. Tumanskiy, E. V. Riabokon

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

The purpose of the work was to analyze the connections of morphological changes in the liver with the manifestation of clinical signs of extrahepatic manifestations in patients with CHC.

Material and methods. The study included 86 patients with CHC. The correlation analysis of expressiveness degree of liver fibrosis and histological activity depending on the presence of clinical signs of extrahepatic manifestations of disease and changes of autoimmune parameters was carried out.

Results. It was found that the incidence of mixed cryoglobulins in the blood of patients with CHC had a dependence on the degree of fibrosis of the liver. In the presence of liver fibrosis F 3–4 mixed cryoglobulins were found in 94.2 % versus 64.7 % of patients with stages of liver fibrosis F 1–2 ($P < 0.01$). In patients with stages of liver fibrosis F 3–4, the quantitative content of mixed cryoglobulins, RF-IgM and CIC was higher than those of patients with stages of liver fibrosis F 1–2. In patients with fibrosis in the liver F 3–4 cryoglobulinemia incidence of vasculitis with formation of Meltzer's triad was higher than in patients with liver fibrosis F 1–2 (19.2 % versus 2.9 %, $P < 0.05$). Content of mixed cryoglobulins correlated with the degree of fibrosis of the liver ($r = +0.49$, $P < 0.01$). A factor A3 was more often detected in patients with stage F 3–4, compared with patients with stage F 1–2 of fibrosis (81.5 % versus 19.2 %, $P < 0.01$).

Conclusions. CHC patients with liver fibrosis F 3–4 are characterized with more frequent appearance of mixed cryoglobulins, higher content of RF-IgM and CIC in serum than in patients with liver fibrosis F 1–2. This explains the higher frequency of clinical manifestations of extrahepatic manifestations of immunocomplex genesis in patients with F 3–4 fibrosis. Histological activity of A3 in patients with CHC is most often combined with fibrosis of the liver F 3–4, which causes a high frequency of cryoglobulinemic vasculitis development in these patients.

Key words:

chronic hepatitis C, immunohistochemistry, extrahepatic manifestations.

Pathologia

2018; 15 (1), 45–48

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.129194

E-mail:

RyabokonZSMU@gmail.com

Взаємозв'язки морфологічних змін у печінці з розвитком позапечінкових проявів у хворих на хронічний гепатит С

Ю. Ю. Рябоконт, В. О. Туманський, О. В. Рябоконт

Мета роботи – проаналізувати зв'язки морфологічних змін у печінці з маніфестацією клінічних ознак позапечінкових проявів у хворих на ХГС.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 86 хворих на ХГС. Виконали аналіз взаємозв'язків ступеня виразності фіброзу печінки та гістологічної активності залежно від наявності клінічних ознак позапечінкових проявів захворювання та змін аутоімунних параметрів.

Результати. Встановили, що частота появи змішаних криоглобулінів у крові хворих на ХГС мала залежність від ступеня фіброзу печінки. За наявності фіброзу печінки F 3–4 змішані криоглобуліни виявляли у 94,2 % проти 64,7 % пацієнтів зі стадіями фіброзу печінки F 1–2 ($p < 0,01$). У хворих зі стадіями фіброзу печінки F 3–4 кількісний вміст змішаних криоглобулінів, RF-IgM і ЦІК були вищими за аналогічні показники пацієнтів зі стадіями фіброзу печінки F 1–2. У хворих із фіброзом печінки F 3–4 частота виявлення криоглобулінемічного васкуліту з формуванням триади Мельтцера була вища, ніж у пацієнтів із фіброзом печінки F 1–2 (19,2 % проти 2,9 %, $p < 0,05$). Вміст змішаних криоглобулінів корелював зі ступенем фіброзу печінки ($r = +0,49$, $p < 0,01$). Активність А3 частіше виявляли у хворих зі стадіями фіброзу печінки F 3–4 порівняно з пацієнтами, котрі мали стадії фіброзу F 1–2 (81,5 % проти 19,2 %, $p < 0,01$).

Висновки. ХГС у хворих із фіброзом печінки F 3–4 характеризується частішою появою змішаних криоглобулінів, вищим вмістом RF-IgM і ЦІК у сироватці крові, ніж у пацієнтів із фіброзом печінки F 1–2. Це пояснює більшу частоту клінічної маніфестації позапечінкових проявів імунотоксичного генезу в пацієнтів із фіброзом печінки F 3–4. Гістологічна активність А3 у хворих на ХГС найчастіше поєднується з фіброзом печінки F 3–4, що зумовлює високу частоту розвитку криоглобулінемічного васкуліту в цих хворих.

Ключові слова:

хронічний гепатит С, імуногістохімія, позапечінкові прояви.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 45–48

Взаимосвязи морфологических изменений в печени с развитием внепеченочных проявлений у больных хроническим гепатитом С

Ю. Ю. Рябоконт, В. А. Туманский, Е. В. Рябоконт

Цель работы – проанализировать взаимосвязи морфологических изменений в печени с манифестацией клинических признаков внепеченочных проявлений у больных хроническим гепатитом С.

Ключевые слова:

хронический гепатит С, иммуногистохимия, внепеченочные проявления.

Матеріали і методи. В дослідження включено 86 хворих ХГС. Проведено аналіз взаємозв'язків ступеня вираженості фіброза печінки і гистологічної активності в залежності від наявності клінічних ознак позапечінкових проявів захворювання і змін аутоімунних параметрів.

Результати. Установлено, що частота появи змішаних криоглобулінів в крові хворих ХГС мала залежність від ступеня фіброза печінки. При наявності фіброза печінки F 3–4 змішані криоглобуліни визначені у 94,2 % проти 64,7 % хворих зі стадіями фіброза печінки F 1–2 ($p < 0,01$). У хворих зі стадіями фіброза печінки F 3–4 кількісний вміст змішаних криоглобулінів, RF-IgM і ЦИК був вище аналогічних показників хворих зі стадіями фіброза печінки F 1–2. У пацієнтів з фіброзом печінки F 3–4 частота виявлення криоглобулінемічного васкуліту з формуванням триади Мельтцера була вище, ніж у пацієнтів з фіброзом печінки F 1–2 (19,2 % проти 2,9 %, $p < 0,05$). Вміст змішаних криоглобулінів корелював зі ступенем вираженості фіброза печінки ($r = +0,49$, $p < 0,01$). Активність АЗ частіше встановлена у хворих зі стадіями фіброза печінки F 3–4 порівняно з пацієнтами зі стадіями фіброза F 1–2 (81,5 % проти 19,2 %, $p < 0,01$).

Висновки. ХГС у хворих з фіброзом печінки F 3–4 характеризується більш частим виникненням змішаних криоглобулінів, більш високим вмістом RF-IgM і ЦИК в крові, ніж у пацієнтів з фіброзом печінки F 1–2. Це пояснює більш високу частоту клінічної манифестації позапечінкових проявів імунного характеру у хворих з фіброзом печінки F 3–4. Гистологічна активність АЗ у хворих ХГС найбільш часто поєднується з фіброзом печінки F 3–4, що обумовлює високу частоту розвитку криоглобулінемічного васкуліту у цих пацієнтів.

Chronic Hepatitis C (CHC) is characterized not only by the high risk of progression of liver fibrosis with the formation of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, but also a high incidence of extrahepatic manifestations that increase the risk of mortality in these patients [1–3]. The presence of features of liver damage in patients with the presence of extrahepatic manifestations is a controversial issue. In the first studies there was a hypothesis about the superiority of less pronounced liver damage in patients with CHC with mixed cryoglobulinemia, because the prevention of hepatocyte infection was explained by the possible blockade of receptors to very low density lipoproteins, through which HCV enters the liver cells by endocytosis by monoclonal IgM-k with activity of rheumatoid factor (RF) [4]. It is believed that HCV replicated in the cells of the immune system causes chronic stimulation, which creates conditions for poly- and monoclonal proliferation of B-lymphocytes, poly- and monoclonal production of IgM-RF, which is the basis of mixed cryoglobulins. HCV-infection is characterized by the unique immunological phenomenon: no other infection is noted with such a high frequency of RF production and its specificity [5,6]. In the research [7] on the contrary, it was shown that in the significant number of patients with HCV-infection mixed cryoglobulinemia was characterized by a distinct advantage of fibrosis with cirrhosis. According to the authors [8], it is IgM-RF in any living thing as the progression of liver fibrosis by stimulating Kupffer cells to synthesize paracrine compounds that accelerate the synthesis of extracellular matrix proteins.

The purpose of the work

To analyze the relationships of morphological changes in the liver with the manifestation of clinical signs of extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C.

Material and methods

The study included 86 patients of the hepatological centre of Zaporizhzhia Regional Infectious Clinical Hospital. The stage of liver fibrosis and histological activity were determined on the METAVIR scale in the morphological study of hepatobiopsy (conducted in the University Hos-

pital of ZSMU, MD, PhD, DSc, prof. V. A. Tumanskiy) or through noninvasive Fibrotest and Actitest. The age of the patients ranged from 18 to 60 years, there were 34 men, 52 women. Patients were divided into groups: 34 patients with stages F 1–2 and 52 patients with stages F 3–4 liver fibrosis. Histological Activity A1 was in 31 patients, A2 – 28 patients, A3 – in 27 patients.

Specific research methods included determination of the content of RF-IgM and RF-IgG in serum (ORGEN-TEC, Germany); circulating immune complexes (CIC) (Hycult biotech, USA) by the immunoassay method and the content of mixed cryoglobulins by spectrophotometric method. The control group included 30 healthy people. All the special researches were carried out in the Educational Medical and Laboratory Center of ZSMU (Head – MD, PhD, DSc, prof. A. V. Abramov).

Statistical analysis of the results was performed using the existing database of surveyed patients and healthy individuals in the program Statistica® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). The research results are presented as Me (Q_{25} ; Q_{75}). When evaluating the significance of quantitative features differences between samples Mann-Whitney criterion was used, qualitative characteristics – method of chi-square (χ^2). The degree of connection between the signs was estimated by the Spearman's rank correlation method.

Research results and their discussion

According to the results of the research, it was established that biochemical signs of mixed cryoglobulinemia were detected in 71 (82.5 %) patients with CHC, and the frequency of their appearance was dependent on the degree of liver fibrosis. In the presence of liver fibrosis F 3–4 mixed cryoglobulins were detected in 49 (94.2 %) patients versus 22 (64.7 %) patients with liver fibrosis stages F 1–2 ($\chi^2 = 12.4$; $P < 0.01$) This regularity was confirmed by the results of the comparison of the quantitative content of blood serum as mixed cryoglobulins and the content of RF and CIC. In patients with CHC liver fibrosis stages F 3–4 cryoglobulins mixed content, RF-IgM and CIC were significantly higher than similar rates in patients with liver fibrosis F 1–2 (Table 1).

The increase in the frequency of detection of mixed

cryoglobulins, the level of increase in their content, as well as the content of RF-IgM and CIC in serum in patients with CHC in the progression of liver fibrosis were associated with clinical manifestations of cryoglobulinemia syndrome. Thus, in patients with stages of liver fibrosis F 3–4, the frequency of detection of hemorrhagic cryoglobulinemic vasculitis with the formation of Meltzer's triad was higher than in patients with stages of liver fibrosis F 1–2 (19.2 % versus 2.9 %, $\chi^2 = 4.90$; $P < 0.05$). The positive correlation between the average level of the quantitative content of mixed cryoglobulins in the serum and the degree of expressiveness of the liver fibrosis ($r = +0.49$; $P < 0.01$) confirms the pattern found in our study. Analysis of other extrahepatic manifestations showed no statistically significant difference in the frequency of their detection ($P > 0.05$) in patients with CHC with different stages of liver fibrosis. However, isolated extrahepatic manifestations, namely, porphyria cutanea tarda, B-cell non-Hodgkin's lymphoma, were registered in rare cases only in patients with stage F 3–4 liver fibrosis (Table 2).

As a result of comparing the severity of liver fibrosis and histological activity, it was noted that high activity of A3 was more common in patients with stages of F 3–4 fibrosis compared to patients with stage of fibrosis F 1–2 (81.5 % vs. 19.2 %, $\chi^2 = 6.42$; $P < 0.01$). In this case, in the presence of histological activity of both A2 and A1, fibrosis of the liver F 1–2 and F 3–4 were recorded with the same frequency. The revealed pattern was confirmed by a positive correlation between the average degree of the stage of liver fibrosis and the degree of histological activity ($r = +0.36$, $P < 0.05$). Further analysis showed that in the presence of high histological activity A3 the frequency of detection of hemorrhagic cryoglobulinemic vasculitis and Meltzer's triads was superior in comparison to patients with histologic activity A1 (22.2 % vs. 3.2 %, $\chi^2 = 4.90$; $P < 0.05$).

The patterns found in our study indicate a significant role of the progression of the degree of liver damage in the manifestation of extrahepatic manifestations of immunocomplex genesis, primarily cryoglobulinemia syndrome. The idea that mixed cryoglobulinemia is a valuable prognostic indicator of the increased risk of progression of CHC in liver cirrhosis is confirmed by the presence of a higher degree of liver fibrosis on the METAVIR scale in patients with CHC with mixed cryoglobulinemia, in contrast to patients without this manifestation, for the same average indexes of histological activity of the process [9]. In the development of cryoglobulinemia syndrome at the stage of liver cirrhosis the disruption of the function of removal of immune complexes, in particular, mixed cryoglobulins, by the reticuloendothelial system plays a role [10]. In modern literature, the discussion of the features of pathogenetic mechanisms of liver damage in patients with CHC with mixed cryoglobulinemia is continued. It is believed that the CIC, which contains mixed cryoglobulins, is capable of binding to C1q-receptors on endothelial cells of blood vessels due to HCV core-proteins or bound to RF-IgM C1q-complex. The postponement of CIC in the blood vessels of the liver, activation of the complement system and the response of liver cells to inflammatory mediators lead to the formation of alternative-proliferative lesions of arteries of portal tracts [11]. According to [12], in patients

Table 1. Comparison of the quantitative content of mixed cryoglobulins, RF IgM/IgG and CIC in patients with CHC with different stages of liver fibrosis, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Indicator	Healthy people (n = 30)	Patients with CHC (n = 86)	
		F 1–2 (n = 34)	F 3–4 (n = 52)
Mixed cryoglobulins, opt.	<2.50	3.45 (2.19; 4.30)	4.23 (3.90; 4.85) ..
RF-IgM, IU/ml	<20	56.9 (19.9; 112.3)	104.8 (34.8; 202.0) ..
RF-IgG, IU/ml	<20	60.4 (29.6; 129.4)	78.5 (57.1; 114.2)
CIC, mAU/ml	184.8 (156.8; 197.3)	226.7 (201.2; 268.7)	535.0 (448.3; 865.6) ***

*: the difference is significant, compared with healthy people ($P < 0.05$); **: compared with patients with CHC liver fibrosis F 1–2 ($P < 0.05$).

Table 2. Comparison of the frequency of detection of clinical signs of extrahepatic manifestations of CHC in patients depending on the stage of liver fibrosis, abs (%)

Criterion	Patients with CHC with stages of fibrosis of the liver	
	F 1–2 (n = 34)	F 3–4 (n = 52)
Clinical signs of cryoglobulinemia syndrome		
Expression of general weakness	27 (79.4 %)	48 (92.3 %)
Arthralgia	14 (41.2 %)	27 (51.9 %)
Hemorrhagic cryoglobulinemic vasculitis	1 (2.9 %)	10 (19.2 %) *
Meltzer's Triad	1 (2.9 %)	10 (19.2 %) *
Kidney damage	1 (2.9 %)	1 (1.9 %)
Other extrahepatic manifestations		
Lesion of the thyroid gland	15 (44.1 %)	29 (55.8 %)
Diabetes mellitus 2	1 (2.9 %)	3 (5.8 %)
Dry syndrome	4 (11.8 %)	13 (25.0 %)
Lichen planus	1 (2.9 %)	1 (1.9 %)
Peripheral sensory polyneuropathy	1 (2.9 %)	2 (3.8 %)
Porphyria cutanea tarda	–	1 (1.9 %)
B-cell non-Hodgkin's lymphoma	–	1 (1.9 %)

*: the difference is significant ($P < 0.05$) compared with patients with stages of liver fibrosis F 1–2.

with CHC with mixed cryoglobulinemia, unlike patients without this manifestation, changes in small branches of a. hepatica are more often detected in the form of proliferation of smooth muscle cells (30.2 % vs. 3.3 %, $P < 0.05$), preferably in the presence of severe liver fibrosis. In addition, only patients with CHC with mixed cryoglobulinemia (15.9 %) showed increased lymphoid follicles in portal tracts. The expressiveness of morphological changes in the liver of patients with HCV-associated mixed cryoglobulinemia did not depend on the age, sex of patients and duration of the disease [12]. The aforementioned data of modern literature and the patterns found in our study, in our opinion, allow us to discuss faster rates of progression of liver fibrosis in patients with CHC in the presence of mixed cryoglobulinemia.

According to the authors [13] lower effectiveness of antiviral treatment using regimens containing interferon for CHC patients with mixed cryoglobulinemia is due to the heavier necrosis-inflammatory process in the liver and higher RF content. Recently, antiviral drugs with a direct mechanism of action have appeared, which have a higher efficiency and a high safety profile. It allowed treating patients with CHC, including mixed cryoglobulinemia, without interferon. In 2015, European Association for the Study of the Liver clinical protocols recommended to conduct antiviral treatment of CHC with extrahepatic manifestations of priority regardless of the degree of liver fibrosis (level of evidence A1) [14].

Conclusions

1. CHC in patients with stages of liver fibrosis F 3–4 is characterized by a more frequent appearance of mixed cryoglobulins in blood serum (94.2 % vs. 64.7 %, $P < 0.01$), their higher quantitative content, and higher content of RF-IgM and CIC in serum than in patients with liver fibrosis stages F 1–2 ($P < 0.05$). The revealed pattern explains a higher frequency a clinical manifestation of extrahepatic manifestations of immunocomplex genesis in patients with F 3–4 fibrosis, namely the development of the hemorrhagic cryoglobulinemic vasculitis with the formation of the Meltzer's triad (19.2 % vs. 2.9 %, $P < 0.05$) than in patients with stages of liver fibrosis F 1–2.

2. Histological activity of A3 in patients with CHC is most often combined with stages of liver fibrosis F 3–4 (81.5 %), which causes more frequent occurrence of hemorrhagic cryoglobulinemic vasculitis in patients with histological activity of A3, compared to A1 activity (22.2 % vs. 3.2 %, $P < 0.05$).

3. The incidence of extrahepatic manifestations not related to mixed cryoglobulinemia does not depend on the degree of expressiveness of the morphological changes in the liver, but some extrahepatic manifestations (porphyria cutanea tarda, B-cell non-Hodgkin's lymphoma) are registered in rare cases only in patients with fibrosis F 3–4.

Prospects for further research, in our opinion, the development of methods for early diagnosis of extrahepatic manifestations of CHC should be included for further individualization of treatment of these patients.

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

Information about authors:

Riabokon Yu. Yu., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Children Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Director of Human Clinical Pathology Institute, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.
Riabokon E. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Відомості про авторів:

Рябоконт Ю. Ю., д-р мед. наук, доцент каф. дитячих інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, директор Інституту клінічної патології людини, заслужений діяч науки і техніки України.
Рябоконт О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. інфекційних хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Рябоконт Ю. Ю., д-р мед. наук, доцент каф. детских инфекционных болезней, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, директор Института клинической патологии человека, заслуженный деятель науки и техники Украины.

Рябоконт Е. В., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. инфекционных болезней, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 29.03.2018

Після доопрацювання / Revised: 04.04.2018

Прийнято до друку / Accepted: 06.04.2018

References

- Negro, F., Forton, D., Craxi, A., Sulkowski, M., Feld, J. J., & Manns, M. P. (2015) Extrahepatic Morbidity and Mortality of Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*, 149(6), 1345–1360. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.035.
- Roccatello, D., Sciascia, S., Rossi, D., Solfiotti, L., Fenoglio, R., Menegatti, E., & Baldovino, S. (2017) The challenge of treating hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic vasculitis in the era of anti-CD20 monoclonal antibodies and direct antiviral agents. *Oncotarget*, 8(25), 41764–41777. doi: 10.18632/oncotarget.16986.
- Allison, R. D., Tong, X., Moorman, A. C., Ly, K. N., Rupp, L., Xu, F., et al. (2015) Increased incidence of cancer and cancer-related mortality among persons with chronic hepatitis C infection, 2006–2010. *Journal of Hepatology*, 63(4), 822–828. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.021.
- Agnello, A. (1997) Hepatitis C virus infection and type II cryoglobulinemia: an immunological perspective. *Journal of Hepatology*, 26(6), 1375–1379. doi: 10.1053/jhep.1997.v26.ajhep0261375.
- Yang, D. H., Ho, L. J., & Lai, J. H. (2014) Useful biomarkers for assessment of hepatitis C virus infectious-associated autoimmune disorders. *World Journal Gastroenterology*, 20(11), 2962–2970. doi: 10.3748/wjg.v20.i11.2962.
- Cacoub, P., Comarmond, C., Domont, F., Savey, L., Desbois, A. C., & Saadoun, D. (2016) Extrahepatic manifestation of chronic hepatitis virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 3–14. doi: 10.1177/2049936115585942.
- Milovanova, S. Yu., Kozlovskaya, L. V., & Gordovskaya, N. B. (2014) Polimorfizm klinicheskikh proyavlenij krioglobulinemicheskogo vaskulita, asociirovannogo s khronicheskim gepatitom C [Polymorphism of clinical manifestations of cryoglobulinemia-related vasculitis associated with chronic hepatitis C virus infection]. *Al'manakh klinicheskoy mediciny*, 30, 46–51. [in Russian].
- Atta, A. M., Oliveira, I. S., Sousa, G. M., Paraná, R., & Atta, M. L. (2010) Serum cytokine profile in hepatitis C virus carriers presenting cryoglobulinaemia and nonorgan-specific autoantibodies. *Microbial Pathogenesis*, 48, 53–56. doi: 10.1016/j.micpath.2009.12.002.
- Saadoun, D., Asselah, T., Resche-Rigon, M., Charlotte, F., Bedossa, P., Valla, D., et al. (2006) Cryoglobulinemia is associated with steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 43(6), 1337–1345. doi: 10.1002/hep.21190.
- Andrade, L. J., Santana de Melo, P. R., Atta, A. M., Atta, M. L., Jesus, L. S., Sousa, G. M., et al. (2011) Smooth muscle antibodies and cryoglobulinemia are associated with advanced liver fibrosis in Brazilian hepatitis C virus carriers. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(1), 66–8. doi: 10.1016/S1413-8670(11)70142-8.
- Dunaeva, N. V., Karev, V. E., Vorobyeva, O. A., Mazing, A. V., Lapin, S. V., Smirnov, A. V., & Gusev, D. A. (2016) Protivovirusnaya terapiya khronicheskogo gepatita C, oslozhnennogo sistemnym krioglobulinemicheskim vaskulitom [Antiviral therapy of chronic hepatitis C, complicated by systemic cryoglobulinemic vasculitis]. *Zhurnal infektologii*, 8(2), 40–47. [in Russian].
- Milovanova, S. Yu. (2013) *Smeshannaya krioglobulinemiya, asociirovannaya s khronicheskim gepatitom C: znachenie v razvitiy vnephechenochnykh pojavleniy, metody lecheniya* (Avtoref. dis... dokt. med. nauk) [Mixed cryoglobulinemia associated with chronic hepatitis C: significance in the development of extrahepatic events, methods of treatment. Dr. med. sci. diss.]. Moscow. [in Russian].
- Gragani, L., Visentini, M., Fognani, E., Urraro, T., De Santis, A., Petracca, L., et al. (2016) Prospective study of guideline-tailored therapy with direct-acting antivirals for hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *Journal of Hepatology*, 64(5), 1473–1482. doi: 10.1002/hep.28753.
- European Association for the Study of the Liver. (2015) EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Journal of Hepatology*, 63(1), 199–236. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.025.

Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы

М. А. Шишкин

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Цель работы – изучить особенности транскрипционной активности гена *K-RAS*, а также экспрессии мРНК генов *Ki-67* и *TP53* в сравнении с уровнями иммуногистохимической экспрессии кодируемых ими белков *Ki-67*, *p53* и каспазы-3 в колоректальной аденокарциноме (КРА) при прогрессии от I к IV стадии.

Материалы и методы. Проведено параллельное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое, патогистологическое исследование операционного материала КРА 40 пациентов (4 группы наблюдений – I, II, III, IV стадии болезни по градации pTNM, по 10 наблюдений в каждой группе), а также секционного материала 10 фрагментов стенки дистальных отделов толстого кишечника обычной гистологической структуры (группа контроля).

Результаты. КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *K-RAS* и гена *Ki-67*. По мере прогрессирования КРА от I к IV стадии имеет место возрастание транскрипционной активности гена *K-RAS* и снижение транскрипционной активности гена *Ki-67* в группах наблюдений. Опухолевые клетки КРА характеризуются средним уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации *Ki-67*, при этом установлена обратная корреляция между показателем уровня экспрессии *Ki-67* и показателем глубины инвазии pT опухоли. КРА характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *TP53* с тенденцией к увеличению при прогрессии от I к IV стадии развития, которая коррелирует с повышенной транскрипционной активностью гена *K-RAS*. КРА также характеризуется средним уровнем экспрессии онкопротеина *p53* и низким уровнем экспрессии маркера апоптотической дегенерации каспазы-3 при наличии обратной корреляции между повышенным уровнем транскрипционной активности гена *K-RAS* и низким уровнем апоптоза опухолевых клеток КРА.

Выводы. В ходе прогрессии КРА от I к IV стадии возрастает транскрипционная активность генов *K-RAS* и *TP53*, снижается транскрипционная активность гена *Ki-67*. Имеет место обратная корреляционная взаимосвязь между уровнем транскрипционной активности генов *K-RAS* и *TP53* и уровнем апоптоза опухолевых клеток КРА. Снижение уровня пролиферативной активности опухолевых клеток КРА, наблюдаемое при прогрессии опухоли от I к IV стадии, вероятнее всего, опосредуется вовлечением путей сигнализации, не связанных с RAS-протеином.

Ключевые слова:

колоректальный рак, иммуногистохимия, *K-RAS* ген.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 49–56

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129447

E-mail: Shishkin.stomat@gmail.com

Молекулярно-імуногістохімічна характеристика проліферації та апоптозу пухлинних клітин колоректальної аденокарциноми

М. А. Шишкін

Мета роботи – вивчити особливості транскрипційної активності гена *K-RAS*, а також експресії мРНК генів *Ki-67* і *TP53* у зіставленні з рівнями імуногістохімічної експресії кодованих ними білків *Ki-67*, *p53* та каспази-3 в колоректальній аденокарциномі (КРА) при прогресуванні від I до IV стадії.

Матеріали та методи. Виконали паралельне імуногістохімічне та молекулярно-генетичне, патогістологічне дослідження операційного матеріалу КРА 40 пацієнтів (4 групи спостереження – I, II, III, IV стадії хвороби за градациєю pTNM, 10 спостережень у кожній групі), а також секційного матеріалу 10 фрагментів стінки дистальних відділів товстої кишки звичайної гістологічної будови (група контролю).

Результати. КРА порівняно з незмінною слизовою оболонкою дистальних відділів товстої кишки характеризується підвищеною транскрипційною активністю гена *K-RAS* і гена *Ki-67*. З прогресуванням КРА від I до IV стадії виявили зростання транскрипційної активності гена *K-RAS* і зниження транскрипційної активності гена *Ki-67* у групах спостереження. Пухлинні клітини КРА характеризуються середнім рівнем експресії маркера клітинної проліферації *Ki-67*, при цьому встановлена зворотна кореляція між показником рівня експресії *Ki-67* та показником глибини інвазії pT пухлини. КРА характеризується підвищеною транскрипційною активністю гена *TP53* з тенденцією до збільшення за умов прогресування від I до IV стадії розвитку, що корелює з підвищеною транскрипційною активністю гена *K-RAS*. КРА також характеризується середнім рівнем експресії онкопротеїну *p53* та низьким рівнем експресії маркера апоптотичної дегенерації каспази-3 за наявності зворотної кореляції між підвищеним рівнем транскрипційної активності гена *K-RAS* і низьким рівнем апоптозу пухлинних клітин КРА.

Висновки. За умови прогресування КРА від I до IV стадії зростає транскрипційна активність генів *K-RAS* і *TP53*, знижується транскрипційна активність гена *Ki-67*. Визначили зворотний кореляційний взаємозв'язок між рівнем транскрипційної активності генів *K-RAS*, *TP53* та рівнем апоптозу пухлинних клітин КРА. Зниження рівня проліферативної активності пухлинних клітин КРА, що спостерігають під час прогресії пухлини від I до IV стадії, ймовірно, опосередковується залученням сигнальних шляхів, що не пов'язані з RAS-протеїном.

Ключові слова:

колоректальний рак, імуногістохімія, *K-RAS* ген.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 49–56

Key words:
colorectal cancer,
immunohisto-
chemistry,
K-RAS gene.

Pathologia
2018; 15 (1), 49–56

Molecular-immunohistochemical characteristics of proliferation and apoptosis of tumor cells in colorectal adenocarcinoma

M. A. Shyshkin

Aim – to study the features of *K-RAS* transcriptional activity gene, *Ki-67* and *TP53* mRNA genes expression levels in comparison with the immunohistochemical expression levels of Ki-67, p53 proteins and caspase-3 encoded by them in colorectal adenocarcinoma (CRA) with its progression from the I to the IV stage.

Materials and methods. Parallel immunohistochemical and molecular-genetic, pathohistological studies of operational material of CRA from 40 patients (4 study groups – I, II, III, IV stages of the disease according to pTNM classification – 10 cases in each group) with diagnosis of colorectal adenocarcinoma, and also sectional material of 10 fragments of distal colonic wall with normal histological structure were conducted.

Results. In comparison with unchanged mucosa of distal colon, CRA is characterized by the increased *K-RAS* gene and *Ki-67* gene activity. As CRA progresses from the I to IV stages, there is an increase in the transcriptional activity of the *K-RAS* gene and a decrease in the transcriptional activity of the *Ki-67* gene in the study groups. The tumor cells are characterized by the medium level of expression of *Ki-67*, which is the marker of cellular proliferation, herewith the reverse correlation between the *Ki-67* expression level and the tumor invasion level is present. CRA is characterized by the increased *TP53* gene transcriptional activity with the tendency to elevation, which happens during the progression of the tumor from the I to the IV stage and correlates with the increased *K-RAS* gene transcriptional activity. CRA is also characterized by the medium p53 expression level and the low level of caspase-3 expression, which is the marker of apoptotic degradation process, which happens in the presence of the reverse correlation between the increased *K-RAS* gene transcriptional activity and the low level of apoptosis of the tumor cells.

Conclusions. The *K-RAS* and *TP53* genes transcriptional activity increases, but the *Ki-67* gene transcriptional activity decreases during the process of CRA progression from the I to the IV stage. The inverse correlation between the level of transcription activity of the *K-RAS*, *TP53* genes and apoptosis of tumor cells of the colorectal adenocarcinoma was determined. The decline of proliferation level of the tumor cells, that is observed during the process of CRA progression from the I to the IV stage, is mediated by the signal pathways, which don't have connection with RAS-protein.

Колоректальний рак (КРР) входить в перелік 10 найбільш розповсюджених форм злоякісних новоутворень, стабільно займаючи лідируючі позиції серед причин смерті чоловіків і жінок в Україні [1]. Розвиток КРР – багатоступінчастий процес, характеризується послідовним накопленням генетических і епігенетических альтерацій. Класическою схемою кишечного канцерогенеза слугують послідовність «аденома – карцинома», в ході котрої спонтанно виникаючі молекулярно-генетическі аномалії опосередкують трансформацію умовно нормальної слизистої оболонки кишечника в аденому, аденому з тяжелою дисплазією і далі в інвазивний рак [2]. Згідно даним спеціалізованої літератури, мутації гена *K-RAS* виявляють в значительном кількості випадків КРР як на раних, так і на пізніх стадіях розвитку хвороби. Показатель частоти зустрічальності аномалій гена *K-RAS* в колоректальних аденомах досягає 30 %, для КРР даний показатель становить 30–68 % [3].

Ген *K-RAS* кодує RAS-протеїн – малу ГТФазу, котра активується в відгук на вплив внеклоточних стимулів, таких як фактори росту, цитокіни, гормони на соотвєтствующі рецепторні структури клоточних мембран, забезпечує при цьому передачу сигналу к ядерним структурам. При цьому білок RAS спосібен передавати не тільки активуючі сигнали, но і «отключать» ряд сигнальних каскадів путем гідролізу гуанозидтрифосфатів (ГТФ) до гуанозиддифосфатів (ГДФ) [4]. Найбільш розповсюджений варіант альтерації гена *K-RAS* в раку – це так називані «активуючі» мутації, котрі затрагивають 12 і 13 кодони і вызивають

стойкую активацію сигнальних путей, для котрих білок RAS в нормі забезпечує передачу сигналів в відгук на зовнішню стимуляцію. К останнім відносять PI3K/AKT/mTOR- і MAPK/ERK-сигнальні каскади, забезпечує регуляцію роботи генів, відповідальних за дифференцію нових клоточних поколінь, виживальність клоток, рівень їх проліферації і апоптозу, міжклоточні взаємодії і адгезію [5].

Хотя точний механізм онкогенного впливу *K-RAS* все ще не ясєн, було проведено немало дослідвань, посвященних изучению аномалій данного гена і їх ролі в кишечном канцерогенезі. Так, в мета-аналізі E. J. van Helden et al. (2017) показано, що мутації гена *K-RAS* лежать в основі резистентності КРР к таргетним інгібіторам епідермального фактора росту (EGFR) [6]. В роботі J. M. Loree, S. Kopetz (2017) устанвлено, що мутації *K-RAS* формують основу неспецифической хіміорезистентності КРР за счет блокування підконтрольних путей апоптозу [7]. Опубліковані дослідвань, в котрих описана залежність між аномальною активністю гена *K-RAS* і рівнем проліферативної активності клоток КРР, степеню гістологіческою дифференціювання опухолі, прогнозом для життя пацієнтів [8–10]. Однак результати цих дослідвань носять протирічливий характер, а точні механізми дисрегуляції роботи гена *K-RAS* і функціонально залежних сигнальних каскадів осталися до кінця не изученними.

Цель работы

Изучить особенности транскрипционной активности гена *K-RAS*, а также экспрессии мРНК генов *Ki-67* и

Таблица 1. Специфические пары праймеров, которые были использованы для анализа исследуемых и референтного генов

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>K-RAS</i>	F = AAGACAGAGAGTGGAGGATGC R = TGTCGGATCTCCCTCACAA	59.17 60.25	51	642/643
<i>Ki-67</i>	F = GTGGTTCGACAAGTGGCCTT R = ACAACTCTTCCACTGGGACG	60.82 59.61	51	106/107
<i>TP53</i>	F = CTGGATTGGCAGCCAGACT R = CTCCTCCATGGCAGTGACC	59.70	46	174/175
<i>β-actin (ACTB)</i>	F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	61.30 61.15	59	78/79

TP53 в сравнении с уровнями иммуногистохимической экспрессии кодируемых ими белков *Ki-67*, *p53* и *каспаза-3* в колоректальной аденокарциноме при прогрессии от I к IV стадии.

Материалы и методы исследования

Проведено параллельное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследование операционного материала колоректальной аденокарциномы (КРА) 40 пациентов. На основании предшествующего патоморфологического исследования операционного материала с учетом действующей классификации pTNM [11] выделили 4 группы, каждая из которых включала по 10 наблюдений: I стадия ($T_{1-2} N_0 M_0$), II стадия ($T_{3-4} N_0 M_0$), III стадия ($T_{1-4} N_{1-3} M_0$) и IV стадия болезни ($T_{1-4} N_{1-3} M_1$). В качестве группы контроля использовали 10 фрагментов стенки дистальных отделов толстого кишечника обычной гистологической структуры (секционный материал).

Операционный и секционный материал фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Гистоархитектонику оценивали в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, в серийных парафиновых срезах проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование по стандартной методике, предусмотренной производителями антител. Исследование пролиферативной активности клеток проводили с использованием антител *Mo a-Hu Ki-67 Antigen* (Clone MIB-1, DAKO, Denmark), уровня экспрессии белка *p53* – антител *Mo a-Hu p53 Protein* (Clone DO-7, DAKO, Denmark), уровня апоптоза клеток – антител *Mo a-Hu Caspase Ab-3* (Clone 3CSP03, Thermo Scientific, USA). Для визуализации использована система DAKO EnVision+ System с диаминобензидином (DAKO, Denmark).

Результаты ИГХ-исследования оценивали в микроскопе AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Germany), срезы фотографировали цифровой фотокамерой «Canon EOS 1000D» (Japan) в 5 полях зрения при увеличении $\times 200$. Ядерную экспрессию маркеров *Ki-67* и *p53* анализировали в цифровых фотоизображениях соответствующих ИГХ микропрепаратов с использованием пакета Photoshop CC (2014): при наличии в стандартизованном поле зрения менее 25 % иммунопозитивных клеток уровень экспрессии расценивали как низкий, при наличии 25–75 % иммунопозитивных клеток – как средний, при наличии в поле зрения более 75 % иммунопозитивных клеток – как высокий [12]. Экспрессию *каспаза-3* оценивали методом фотоцифровой морфометрии [13] в условных единицах оптической плотности (УЕОП) и градуировали на 4

уровня: негативная реакция – 0–20 УЕОП, низкий уровень экспрессии – 21–50 УЕОП, умеренный – 51–100 УЕОП, высокий уровень – более 100 УЕОП.

Параллельное молекулярно-генетическое исследование проведено в тех же 40 образцах КРА и 10 образцах стенки дистальных отделов толстого кишечника обычной гистологической структуры, фиксированных в формалине и залитых в парафин. Для получения тотальной РНК ткани депарафинировали в ксилоле и регидратировали в этаноле нисходящих концентраций (100 %, 96 %, 70 %). Далее полученные образцы гомогенизировали пестиком в ступке и помещали в пробирки «Ахуген» (USA) для повторной депарафинизации и регидратации. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора «Trizol RNA Prep 100» (Isogen Lab., LTD, RF). Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор «OT-1» (Syntol, RF). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H_2O , очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси (2,5 x) и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 минут при 9 °C.

Для определения уровня экспрессии мРНК использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», USA) и набор реактивов для проведения ПЦР–PB в присутствии SYBR Green R-402 (Syntol, RF). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу Syntaq с антителами, подавляющими активность фермента, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, dNTP-дезоксинуклеозидтрифосфат, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл путем добавления деионизированной H_2O . Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референтного генов подобраны при помощи программного обеспечения Primer-Blast и изготовлены фирмой Thermo Scientific (USA) (табл. 1).

Амплификация состояла из 45–50 циклов и проведена в таких условиях: денатурация – 95 °C, 15 секунд; отжиг – 59–61 °C, 30–60 секунд; элонгация – 72 °C, 30 секунд. В качестве референт-гена использован ген β -актина (*ACTB* gene). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли методом $\Delta\Delta Ct$. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, USA). В эксперимент включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы

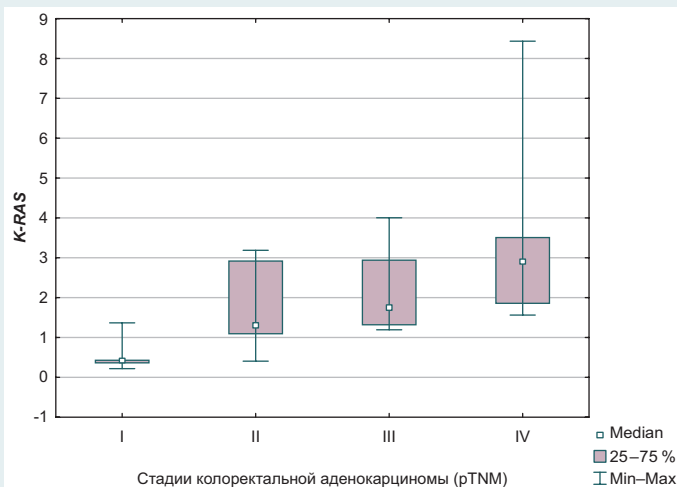


Рис. 1. Экспрессия мРНК гена *K-RAS* в колоректальной аденокарциноме на разных стадиях ее развития.

в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Каждая реакция амплификации выполнена на индивидуальных образцах, в трех повторах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе Statistica 6.0 (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану, нижний и верхний квартили, полученные данные представляли в виде [Me ($Q_1; Q_2$)]. Сравнение проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (при сравнении 2 групп наблюдений), а также рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (при сравнении 4 групп наблюдений). Значимость различий между частотой повышения относительной нормализованной экспрессии в группах исследования проверяли с помощью критерия χ^2 . 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 колоректальная аденокарцинома (КРА) в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *K-RAS*: случаи повышения уровня экспрессии мРНК гена составляют 87,5 % от общего числа наблюдений, отмечены достоверно чаще случаев снижения уровня экспрессии мРНК гена ($p < 0,05$), а уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* в КРА составляет 1,66 (1,19; 2,91). Имеет место тенденция к возрастанию транскрипционной активности гена *K-RAS* в группах исследования от I к IV стадии КРА по градации pTNM (рис. 1).

В I стадии КРА экспрессия мРНК гена *K-RAS* составляет 0,42 (0,36; 0,43), т. е. отмечено снижение транскрипционной активности гена *K-RAS*: сниженный

уровень экспрессии мРНК *K-RAS* имеет место в 80 % КРА I стадии и установлен достоверно чаще случаев повышенного уровня экспрессии мРНК этого гена ($p < 0,05$). Для последующих стадий болезни характерно значимое повышение транскрипционной активности гена *K-RAS*: во II стадии КРА экспрессия мРНК гена *K-RAS* составляет 1,31 (1,09; 2,91), повышенный уровень экспрессии мРНК этого гена установлен в 70 % опухолей II стадии, т. е. достоверно чаще, чем сниженный уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* ($p < 0,05$); на III стадии КРА уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* составляет 1,75 (1,31; 2,93), повышенный уровень экспрессии мРНК этого гена имеет место в 100 % опухолей; на IV стадии КРА в 100 % опухолей отмечен более высокий уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS*, уровень экспрессии мРНК этого гена составляет 2,91 (1,85; 3,50).

На основе данных специализированной литературы, именно «активирующие» мутации гена *K-RAS* служат причиной возрастания его транскрипционной активности. Как правило, это точечные мутации в пределах 12 и 13 кодонов – транзигция G–A и/или трансверсия G–T, которые приводят к синтезу ГТФазы с аномальной активностью [5]. В экспериментальной работе А. Т. Boutin et al. [3] показано возрастание активности гена *K-RAS* в последовательности «аденома – карцинома». По данным этих исследователей, аномальная активность *K-RAS*, проявляющаяся в ходе реализации такой последовательности, в большинстве случаев сопровождается снижением активности генов *APC* и *TP53*, а также избыточной активацией TGF- β -сигнального пути [3]. Эти наблюдения в целом согласуются с нашими результатами, однако не объясняют причину снижения транскрипционной активности гена *K-RAS* на I стадии развития КРА. Кроме того, в ряде работ [8–10] получены спорные данные касательно влияния аномальной активности *K-RAS* на уровни пролиферативной и апоптотической активности опухолевых клеток КРА, что послужило стимулом для изучения уровней транскрипционной активности соответствующих генов, а также ИГХ экспрессии их белковых продуктов.

Мы установили, что КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *Ki-67*: уровень относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 1,80 (1,04; 2,99). Повышенный уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* наблюдают в 80 % КРА, т. е. достоверно чаще случаев сниженной транскрипционной активности гена ($p < 0,05$). Результат сравнительного анализа показателей экспрессии мРНК гена *Ki-67* в последовательности «I – II – III – IV стадии КРА» свидетельствует о наличии тенденции к постепенному снижению транскрипционной активности гена при прогрессии рака (рис. 2).

Примечательно, что повышение транскрипционной активности гена *Ki-67* характеризует лишь I, II и III стадии развития КРА: на I стадии болезни уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 3,20 (2,31; 3,59), случаи повышенного уровня экспрессии мРНК гена – 100 % от числа наблюдений этой стадии; на II

стадии уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 2,92 (1,80; 3,50), случаи повышенного уровня экспрессии мРНК гена – также 100 % от числа наблюдений данной стадии; на III стадии болезни уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 1,27 (1,19; 2,08), случаи повышенного уровня экспрессии мРНК гена – 90 % от числа наблюдений данной стадии, установлены достоверно чаще случаев сниженного уровня экспрессии мРНК гена ($p < 0,05$).

Таким образом, на I, II и III стадиях развития КРА транскрипционная активность гена *Ki-67* значимо выше аналогичного показателя для нормальной слизистой. Однако при прогрессии заболевания, последовательной смене стадий транскрипционная активность *Ki-67* снижается относительно предшествующей стадии развития болезни: экспрессия мРНК гена на II стадии КРА меньше, чем экспрессия мРНК гена на I стадии КРА, а экспрессия мРНК гена *Ki-67* на III стадии КРА меньше экспрессии мРНК гена на II стадии болезни. IV стадия КРА отличается сниженной (относительно неизменной слизистой оболочки, а также относительно предшествующей ей III стадии болезни) транскрипционной активностью гена *Ki-67*: экспрессия мРНК гена *Ki-67* составляет 0,52 (0,28; 1,04), случаи сниженного уровня экспрессии мРНК гена – 90 % от числа наблюдений данной стадии, установлены достоверно чаще случаев повышенной транскрипционной активности гена ($p < 0,05$).

Результаты ИГХ-исследования уровня пролиферативной активности клеток КРА описаны в предыдущей работе [14]. Установлено, что опухолевые клетки КРА характеризуются средним уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации *Ki-67* – 41,20 (36,62; 59,42) %. Также отмечена обратная корреляционная связь средней силы ($r = -0,41$) между показателем уровня экспрессии *Ki-67* опухолевыми клетками и показателем глубины инвазии (pT) КРА, что согласуется с результатами параллельно проведенного молекулярно-генетического исследования. В работе A. Hegazy et al. [15] также установлена обратная корреляционная связь между уровнем пролиферативной активности и глубиной инвазии КРА. Однако вопрос о прогностической ценности определения уровня пролиферации опухолевых клеток КРА остается спорным [16].

В ряде работ описана прямая зависимость между аномальной активностью *K-RAS* в КРА и уровнем пролиферативной активности клеток опухоли [3,8,9]. Результаты выполненного нами корреляционного анализа не показали статистически достоверную связь между уровнями относительной нормализованной экспрессии мРНК генов *K-RAS* и *Ki-67* ($r = -0,19$; $p > 0,05$). Таким образом, снижение уровня пролиферативной активности в ходе прогрессии КРА от I к IV стадии развития, вероятнее всего, опосредуется вовлечением иных путей сигнализации, не связанных с *RAS*-протеином. Опубликованы работы, описывающие механизм угнетения пролиферации раковых клеток КРА за счет регуляторного воздействия отдельных семейств микроРНК [17–19], а также данные, согласно которым снижение пролиферативной активности опухолевых клеток КРА ассоциируется с активацией механизмов, запускающих эпителиально-мезенхимальный переход [20].

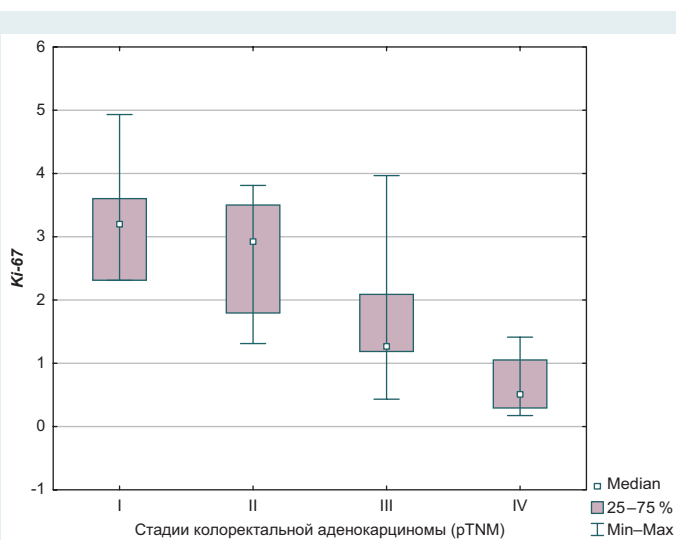


Рис. 2. Экспрессия мРНК гена *Ki-67* в colorectal adenocarcinome на разных стадиях ее развития.

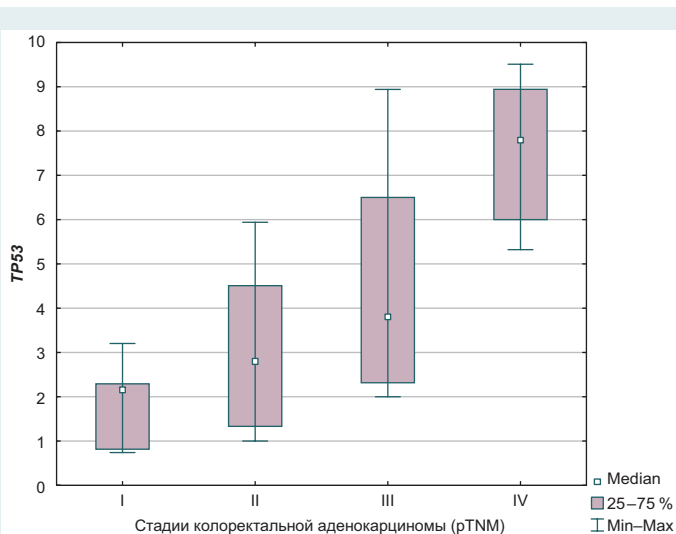


Рис. 3. Экспрессия мРНК гена *TP53* в colorectal adenocarcinome на разных стадиях ее развития.

В результате молекулярно-генетического исследования установлено, что КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника у 100 % больных характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *TP53*: уровень относительной нормализованной экспрессии мРНК этого гена составляет 3,50 (2,30; 6,50). По мере прогрессирования КРА от I к IV стадии имеет место четкая тенденция к повышению транскрипционной активности гена *TP53* (рис. 3).

Повышение транскрипционной активности гена *TP53* характеризует все стадии развития КРА: в I стадии болезни уровень относительной нормализованной экспрессии мРНК гена составляет 2,15 (0,82; 2,30), во II стадии – 2,80 (1,32; 4,50), в III стадии – 3,80 (2,32; 6,50), в IV стадии заболевания – 7,80 (5,99; 8,92).

Результаты ИГХ-исследования уровня экспрессии онкопротеина p53 клетками КРА описаны в предыдущей работе [14]. Установлено, что опухолевые клетки КРА характеризуются средним уровнем экспрессии p53 – 39,67 (15,69; 83,75) %. Также установлена средней силы корреляционная связь ($r = 0,36$) между степенью гистологической дифференцировки (G) КРА и экспрессией опухолевыми клетками онкопротеина p53. Данные современной научной литературы по этому вопросу носят противоречивый характер: опубликованы работы [15,21], результаты которых согласуются с полученными нами данными, а также исследования, результаты которых свидетельствуют об отсутствии корреляции между степенью гистологической дифференцировки КРР и экспрессией p53 клетками опухоли [22].

Проведенный нами корреляционный анализ показал статистически достоверную прямую средней силы связь между уровнями транскрипционной активности генов *K-RAS* и *TP53* ($r = 0,43$; $p < 0,05$). L. Du et al. [23] предложили использовать гены *K-RAS* и *TP53* в качестве биомаркеров, позволяющих дифференцировать диспластические изменения и ранние стадии развития карциномы, развивающейся на фоне хронических воспалительных заболеваний толстой кишки, однако вопрос о функциональной взаимосвязи между этими генами не был раскрыт в этой работе. Прямая взаимосвязь между функциональной активностью генов *K-RAS* и *TP53* находит обоснование в современных представлениях о функционировании PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути, активация которого опосредуется RAS-протеином. Известно [10], что экспрессия мутантного гена *TP53* регулируется рядом факторов транскрипции, среди которых E2F и FOXO3a. Последние, в свою очередь, служат мишенями для фосфорилирования киназой AKT – одним из ключевых звеньев упомянутого сигнального каскада [10]. В исследовании A. T. Boutin et al. [3] получены обратные данные, согласно которым аномальная активность *K-RAS* в последовательности «аденома – карцинома» реализуется на фоне снижения экспрессии *TP53*. Однако авторы [3] привязывают эти изменения к аномальной активности TGF- β -сигнального пути, который не является подчиненным RAS-протеину.

Ген *TP53* известен как «страж генома»: белок p53 (продукт гена *TP53*) при возникновении каких-либо повреждений структуры ДНК останавливает клеточный цикл и обеспечивает запуск репаративных процессов, а при невозможности репарации p53 запускает апоптотический каскад гибели клетки с дефектным геномом [21]. Относительно высокие уровни экспрессии *TP53* и его белкового продукта в карциномах обусловлены экспрессией мутантного гена *TP53* и, соответственно, мутантного онкопротеина p53. На основании данных специализированной литературы, онкопротеин p53 не способен к запуску апоптоза, а в отдельных случаях может оказывать обратное воздействие, блокируя передачу сигналов по соответствующим сигнальным каскадам [15].

ИГХ-исследование экспрессии маркера апоптотической дегенерации каспазы-3 клетками КРА показало, что опухолевые клетки КРА характеризуются низким

уровнем апоптоза: при фотоцифровой морфометрии уровень экспрессии каспазы-3 составил 28,72 (15,64; 76,71) УЕОП. Установлена прямая средней силы корреляционная связь ($r = 0,42$) между уровнем экспрессии онкопротеина p53 и уровнем экспрессии каспазы-3 клетками КРА, что согласуется с приведенными выше данными научной литературы касательно эффекта обратного воздействия мутантного протеина p53. По данным С. М. Pfeffer, A. T. K. Singh (2018), этот эффект может быть обусловлен блокировкой активации инициаторных каспаз -8 и -10, что, в свою очередь, обуславливает блокировку активации эффекторных каспаз, к числу которых относят и каспазу-3 [24]. Проведенный в данной работе корреляционный анализ показал наличие статистически достоверной обратной корреляции средней силы ($r = -0,44$, $p < 0,05$) между повышенным уровнем транскрипционной активности гена *K-RAS* и низким уровнем апоптоза опухолевых клеток КРА. Таким образом, полученные данные указывают на наличие функциональной взаимосвязи между генами *K-RAS*, *TP53* и уровнем апоптоза в КРА. Возрастающая транскрипционная активность генов *K-RAS* и *TP53*, очевидно, обуславливает снижение уровня апоптоза раковых клеток КРА.

Выводы

1. При прогрессии колоректальной аденокарциномы от I к IV стадии в градации pTNM в опухоли возрастает транскрипционная активность генов *K-RAS* и *TP53*, а также снижается транскрипционная активность гена *Ki-67*.
2. Имеет место обратная корреляционная взаимосвязь между уровнем транскрипционной активности генов *K-RAS* и *TP53* и уровнем апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы.
3. Снижение уровня пролиферативной активности опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы, наблюдаемое при прогрессии опухоли от I к IV стадии, вероятнее всего, опосредуется вовлечением путей сигнализации, не связанных с RAS-протеином.

Благодарность

Автор выражает благодарность профессору А. М. Камышному и сотрудникам ПЦР-лаборатории научного медико-лабораторного центра Запорожского государственного медицинского университета, с участием которых выполнены молекулярно-генетические исследования.

Финансирование

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

Конфликт интересов: отсутствует.

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

Сведения об авторе:

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

Відомості про автора:

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

Information about author:

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

Надійшла до редакції / Received: 26.03.2018

Після доопрацювання / Revised: 03.04.2018

Прийнято до друку / Accepted: 06.04.2018

Список литературы

- [1] Рак в Україні, 2015–2016 / З.П. Федоренко Л.О. Гулак, Ю.Й. Михайлович та ін. // Бюлетень національного канцер-реєстру України. – 2017. – №18. – 127 с.
- [2] Arvelo F. Biology of colorectal cancer / F. Arvelo, F. Sojo, C. Cotte // *Ecancermedalscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 520–534.
- [3] Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer / A.T. Boutin, W.T. Liao, M. Wang, et al. // *Genes & Development*. – 2017. – Vol. 31. – №4. – P. 370–382.
- [4] K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas / N. Margetis, M. Kouloukoussa, K. Pavlou, et al. // *In vivo*. – 2017. – Vol. 31. – №4. – P. 527–542.
- [5] Prognostic value of KRAS codon 13 gene mutation for overall survival in colorectal cancer: Direct and indirect comparison meta-analysis / M.S. Kwak, J.M. Cha, J.Y. Yoon, et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – Vol. 96. – №35. – P. E7882.
- [6] Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis / E.J. van Helden, C.W. Menke-van der Houven van Oordt, M.W. Heymans, et al. // *Cancer metastasis reviews*. – 2017. – Vol. 36. – №2. – P. 395–406.
- [7] Loree J.M. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer / J.M. Loree, S. Kopetz // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2017. – Vol. 9. – №8. – P. 551–564.
- [8] Xiuli L. KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis / L. Xiuli, M. Jakubowski, J.L. Hunt // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2015. – Vol. 135. – №2. – P. 245–252.
- [9] Coulson R. Molecular Profiling in Resectable Colorectal Liver Metastases: The Role of KRAS Mutation Status in Assessing Prognosis in the Preoperative Setting / R. Coulson // *Journal of the advanced practitioner of oncology*. – 2015. – Vol. 6. – №5. – P. 470–474.
- [10] Temraz S. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers / S. Temraz, D. Mukherji, A. Shamseddine // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – №19. – P. 22976–22988.
- [11] Sobin L.H. International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours / L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. – N. Y.: Wiley-Blackwell, 2009. – 50 pp.
- [12] Uhlén M. The Human Protein Atlas [Електронний ресурс] / M. Uhlén. – 2015. – Режим доступу: <http://www.proteinatlas.org>.
- [13] Патент 99314 Україна: МПК (2015) 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; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.05.15 // Бюлетень. – 2015. – №10. – 8 с.
- [14] Шишкін М.А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза колоректальной аденокарциномы / М.А. Шишкін // *Патология*. – 2016. – №3 (38). – С. 65–72.
- [15] Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study) / A. Hegazy, S.A. Daoud, W.S. Ibrahim, et al. // *Academic Journal of Cancer Research*. – 2014. – Vol. 7. – №3. – P. 168–172.
- [16] High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer / N. Melling, C.M. Kowitz, R. Simon, et al. // *Journal of Clinical Pathology*. – 2016. – №69. – P. 209–214.
- [17] Xiao R. miRNA-144 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells through GSPT1 / R. Xiao, C. Li, B. Chai // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2015. – Vol. 74. – P. 138–144.
- [18] miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A / Y. Yin, B. Zhang, W. Wang, et al. // *Clinical cancer research*. – 2014. – Vol. 20. – №23. – P. 6187–6199.
- [19] MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer / J. Thomas, M. Ohtsuka, M. Pichler, H. Ling // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – №12. – P. 28063–28076.

- [20] Long noncoding RNA VIM-AS1 promotes colorectal cancer progression and metastasis by inducing EMT / H. Rezanejad Bardaji, M.H. Asadi, M.M. Yaghoobi // *European Journal of Cell Biology*. – 2018. – Vol. 7. – P. 1035–1048.
- [21] p53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation / X. Li, J. Zhou, Z. Chen, W. Chang // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – №21(1). – P. 81–93.
- [22] A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis / Y. Wang, X.S. Wu, J. He, et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – №22. – P. 32854–32865.
- [23] KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: a meta-analysis / L. Du, J.J. Kim, J. Shen, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – №13. – P. 22175–22186.
- [24] Pfeiffer C.M. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy / C.M. Pfeiffer, A.T.K. Singh // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – №2. – P. 448–454.

References

- [1] Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Yu. Y., Horokh, Ye. L., Ryzhov, A. U., Sumkina, O. V., & Kutsenko, L. B. (2017). Rak v Ukraini, 2015–2016 [Cancer in Ukraine, 2015–2016]. *Biuletyn natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy*, 18. [in Ukrainian].
- [2] Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015) Biology of colorectal cancer. *Ecancermedalscience*, 9, 520–534. doi: 10.3332/ecancer.2015.520.
- [3] Boutin, A. T., Liao, W. T., Wang, M., Hwang S. S., Karpinets, T. V., Cheung, H., et al. (2017) Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes & Development*, 31(4), 370–382. doi: 10.1101/gad.293449.116.
- [4] Margetis, N., Kouloukoussa, M., Pavlou, K., Vrakas, S., & Mariolis-Sapsakos, T. (2017) K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. *In vivo*, 31(4), 527–542. doi: 10.21873/invivo.11091.
- [5] Kwak, M. S., Cha, J. M., Yoon, J. Y., Jeon, J. W., Shin, H. P., Chang, H. J., et al. (2017) Prognostic value of KRAS codon 13 gene mutation for overall survival in colorectal cancer: Direct and indirect comparison meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96(35), E7882. doi: 10.1097/MD.0000000000007882.
- [6] van Helden, E. J., Menke-van der Houven van Oordt, C. W., Heymans, M. W., Ket, J. C. F., & Verheul, H. M. W. (2017) Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer metastasis reviews*, 36(2), 395–406. doi: 10.1007/s10555-017-9668-y.
- [7] Loree, J. M., & Kopetz, S. (2017) Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9(8), 551–564. doi: 10.1177/175883401714997.
- [8] Xiuli, L., Jakubowski, M., & Hunt, J. L. (2015) KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(2), 245–252. doi: 10.1309/AJCP7FO2VAXIVSTP.
- [9] Coulson, R. (2015) Molecular Profiling in Resectable Colorectal Liver Metastases: The Role of KRAS Mutation Status in Assessing Prognosis in the Preoperative Setting. *Journal of the advanced practitioner of oncology*, 6(5), 470–474.
- [10] Temraz, S., Mukherji, D., & Shamseddine, A. (2015) Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(19), 22976–22988. doi: 10.3390/ijms160922976.
- [11] Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009) *International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours*. New York: Wiley-Blackwell.
- [12] Uhlén, M. (2015) The Human Protein Atlas. Retrieved from: <http://www.proteinatlas.org>.
- [13] Tumanyskiy, V. O., Yevsieiev, A. V., Kovalenko, I. S., & Zubko, M. D. (patentee) (2015) Patent 99314 Ukraine, MPK 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Sposib fototsyfrovoy morfometrii imunohistokhimichnykh preparativ [Patent of Ukraine 99314, IPC 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 The technique of digital morphometry of immunohistochemical slides]. *Biuletyn*, 10. [in Ukrainian].
- [14] Shyshkin, M. A. (2016) Sravnitel'naya immunogistokhimicheskaya kharakteristika proliferatsii i apoptoza kolorektal'noj adenokarcinomy [Comparative immunohistochemical study of proliferation and apoptosis in colorectal adenocarcinoma]. *Patologiya*, 3(38), 65–72. [in Russian]. doi: 10.14739/2310-1237.2016.3.87497.
- [15] Hegazy, A., Daoud, S. A., Ibrahim, W. S., El-Atrebi, K., Saker, M., & Abdel-Wahab, N. (2014) Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study). *Academic Journal of Cancer Research*, 7(3), 168–72. doi: 10.5829/idosi.ajcr.2014.7.3.1111.
- [16] Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., et al (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 69, 209–14. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202985.

- [17] Xiao, R., Li, C., & Chai, B. (2015) miRNA-144 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells through GSPT1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 138–144. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.006.
- [18] Yin, Y., Zhang, B., Wang, W., Fei, B., Quan, C., Zhang, J., et al. (2014) miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by down-regulating RAB22A. *Clinical cancer research*, 20(23), 6187–6199. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1030.
- [19] Thomas, J., Ohtsuka, M., Pichler, M., & Ling, H. (2015) MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28063–28076. doi: 10.3390/ijms161226080.
- [20] Rezanejad Bardaji, H., Asadi, M. H., & Yaghoobi, M. M. (2018) Long noncoding RNA VIM-AS1 promotes colorectal cancer progression and metastasis by inducing EMT. *European Journal of Cell Biology*, 7, 1035–1048. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.04.004.
- [21] Li, X., Zhou, J., Chen, Z., & Chang, W. (2015). p53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 84–93. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.
- [22] Wang, Y., Wu, X. S., He, J., Ma, T., Lei, W., & Shen, Z. Y. (2016) A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Oncotarget*, 7(22), 32854–32865. doi: 10.18632/oncotarget.9056.
- [23] Du, L., Kim, J. J., Shen, J., Chen, B., & Dai, N. (2017) KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(13), 22175–22186. doi: 10.18632/oncotarget.14549.
- [24] Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018) Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448–454. doi: 10.3390/ijms19020448.

Експресія білка NF-L в сенсомоторній корі при моделюванні транзиторної ішемії на тлі сенсibiliзації мозковим антигеном та імунокорекції змін, що виникли

Л. М. Яременко¹, О. М. Грабовий², Л. П. Бідна¹, С. Є. Шепелєв¹, М. М. Груша¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Національний інститут раку, м. Київ, Україна

Мета роботи – вивчити рівень експресії білка NFP-L у сенсомоторній корі головного мозку щурів при моделюванні транзиторної ішемії на тлі сенсibiliзації мозковим антигеном та імунокорекції імунофаном змін, що виникли.

Матеріали та методи. Здійснили експеримент на 185 білих статевозрілих щурах-самцях масою 260–290 г. Застосували гістологічні, імуногістохімічний, морфометричний і статистичний методи дослідження.

Результати. Показано, що сенсibiliзація мозковим антигеном викликає дифузні дегенеративні зміни в корі головного мозку та зниження експресії NFP-L. Це зумовлює посилення виразності ураження мозку при гострому порушенні кровообігу порівняно з тим, коли сенсibiliзацію не здійснювали. У відновлювальний період після транзиторної ішемічної атаки виявили значно менше, ніж за відсутності сенсibiliзації, округлих телець із порівняно високим рівнем експресії NFP-L, котрі кваліфікували як колби (конуси) росту нервових волокон. Це дає змогу стверджувати: сенсibiliзація мозковим антигеном затримує регенерацію нервових волокон, що є важливим компонентом компенсаторно-відновлювальних процесів у корі мозку після ішемічної атаки. Імунофан за умов моделювання комбінованого імунно-судинного ураження мозку виявив протекторні властивості та зменшував виразність зниження експресії NFP-L. Ці ефекти імунофану, особливо у відновлювальний період після ураження мозку, пов'язуємо з його імунomodulatory ефектом. Останнє підтверджується зіставленням динаміки відновлення експресії NFP-L в ураженій і контрлатеральній півкулі, яка зазнавала імунного ушкодження, а ішемія була відсутня.

Висновки. Сенсibiliзація мозковим антигеном призводить до дифузних дегенеративних змін у корі великого мозку, які супроводжуються зниженням експресії NFP-L. Попередня сенсibiliзація мозковим антигеном при гострому порушенні мозкового кровообігу призводить до посилення виразності ураження мозку й зниження експресії NFP-L, уповільнює та змінює динаміку її відновлення. Ефектом застосування імунофану є зменшення змін експресії NFP-L у сенсомоторній корі, викликаних як при сенсibiliзації мозковим антигеном, так і при її комбінації з транзиторним порушенням мозкового кровотоку.

Ключові слова:

ішемія, NF-L-протеїн (NFP-L), сенсibiliзація ЦНС, імунomodulatory.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 57–61

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129443

E-mail: L.yaremenko03@gmail.com

Экспрессия белка NF-L в сенсомоторной коре при моделировании транзиторной ишемии на фоне сенсibiliзации мозговым антигеном и иммунокоррекции возникших изменений

Л. М. Яременко, А. Н. Грабовой, Л. П. Бидна, С. Е. Шепелев, М. М. Груша

Цель работы – изучить уровни экспрессии белка NFP-L в сенсомоторной коре головного мозга крыс при моделировании транзиторной ишемии на фоне сенсibiliзации мозговым антигеном и иммунокоррекции возникших изменений имунофаном.

Материалы и методы. Проведен эксперимент на 185 белых половозрелых крысах-самцах массой 260–290 г. Применены гистологические, иммуногистохимический, морфометрический и статистический методы.

Результаты. Показано, что сенсibiliзация мозговым антигеном вызывает диффузные дегенеративные изменения в коре головного мозга и снижение экспрессии NFP-L. Это приводит к усилению выраженности поражения мозга при остром нарушении кровообращения по сравнению с тем, когда сенсibiliзация не проводилась. В восстановительный период после транзиторной ишемической атаки оказывалось значительно меньше, чем при отсутствии сенсibiliзации, округлых телець со сравнительно высоким уровнем экспрессии NFP-L, которые кваліфіцировали как колбы (конусы) роста нервных волокон. Это позволяет утверждать, что сенсibiliзация мозговым антигеном задерживает регенерацию нервных волокон, которая является важным компонентом компенсаторно-восстановительных процессов в коре мозга после ишемической атаки. Имунофан в условиях моделирования комбинированного иммунно-сосудистого поражения головного мозга оказывал протекторные свойства и уменьшал выраженность снижения экспрессии NFP-L. Эти эффекты имунофана, особенно в восстановительный период после поражения мозга, связываем с его иммуномодулирующим эффектом. Последнее подтверждается сопоставлением динамики восстановления экспрессии NFP-L в пораженном и контрлатеральном полушарии, которое получало иммунное повреждение при отсутствии ишемии.

Выводы. Сенсibiliзация мозговым антигеном приводит к диффузным дегенеративным изменениям в коре большого мозга, которые сопровождаются снижением экспрессии NFP-L. Предыдущая сенсibiliзация мозговым антигеном при остром нарушении мозгового кровообращения приводит к усилению выраженности поражения мозга и снижению экспрессии NFP-L, замедляет и меняет динамику его восстановления. Эффектом применения имунофана является уменьшение изменений экспрессии NFP-L в сенсомоторной коре, вызванных как при сенсibiliзации мозговым антигеном, так и при ее сочетании с преходящим нарушением мозгового кровотока.

Ключевые слова:

ишемия, NF-L-протеин (NFP-L), сенсibiliзация ЦНС, иммуномодуляция.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 57–61

Key words:
ischemia,
NF-L-protein (NFP-L),
central nervous
system
sensitization,
immunomodulation.

Pathologia
2018; 15 (1), 57-61

Expression of NF-L protein in the sensorimotor cortex during the modeling of transient ischemia against the background of sensitization by brain antigen and immunocorrection of the changes

L. M. Yaremenko, A. N. Grabovoy, L. P. Bidna, S. Ye. Shepelev, M. M. Grusha

Aim. To study the levels of NFP-L protein expression in the sensorimotor cortex of rats in the simulation of transient ischemia against the background of sensitization by the brain antigen and immunocorrection of the resulting changes by imunofan.

Materials and methods. The study was conducted on 185 male mature white rats from Wistar line weighted 260–290 g, in which the damage of the brain was modulated. The brain for study was taken on the 1st, 3rd, 10th, 30th and 90th days after the start of the experiment. The histological, immunohistochemical, morphometric and statistical methods were used.

Results. Observations have shown that sensitization with the brain antigen causes diffuse degenerative changes in the cerebral cortex and a decrease in NFP-L expression. This background leads to an increase in the severity of brain damage in acute circulatory disturbances compared with when no sensitization was performed. After transient ischemic attack, the recovery period was significantly less than in the absence of sensitization, rounded corpuscles with a relatively high level of expression of NFP-L, which we qualified as nerve growth flasks (cones). This allows us to say that sensitization by the brain antigen delays the regeneration of nerve fibers, which is an important component of compensatory-recovery processes in the cerebral cortex after ischemic attack. Imunofan under the conditions of modeling of combined immune-vascular lesions of the brain had protective properties and reduced the severity of the decrease in NFP-L expression. We attribute these effects of imunofan, especially in the recovery period after brain damage in the first place, to its immunomodulatory effect which is confirmed by comparing the dynamics of the restoration of NFP-L expression in the affected and contralateral hemispheres, where the latter experienced immune damage in the absence of ischemia.

Conclusions. Sensitization by the brain antigen leads to diffuse degenerative changes in the cerebral cortex, which are accompanied by a decrease in the expression of NFP-L. Previous sensitization by brain antigen in acute impairment of cerebral circulation leads to increased severity of brain damage and decreased expression of NFP-L, slows and changes the dynamics of its recovery. The effect of imunofan use is to reduce changes in NFP-L expression in the sensorimotor cortex caused by both sensitization with the brain antigen and in combination with transient impairment of cerebral blood flow.

Порушення мозкового кровообігу – одна з найбільш значущих соціальних проблем, оскільки є основною причиною інвалідності та смерті в усьому світі [1]. З цих позицій актуальним є встановлення значення різних патогенетичних ланок судинних уражень мозку та розробка способів корекції нейродегенеративних процесів, які вони викликають [1,2].

Останнім часом елементи цитоскелета нейрона розглядають як ключові ланки у процесі переходу до тривалого пошкодження нервової тканини [3]. Нейрофіламенти (NF) є найбільш поширеними елементами цитоскелета нейронів, що підтримують форму клітин і калібр їхніх відростків, а також виконують роль координатора аксонального транспорту.

До складу проміжних філаментів нейронів входять три імуногістохімічно відмінні протеїни: з низькою (NF-L, 68 kDa), середньою (NF-M, 150 kDa) та високою (NF-H 200 kDa) молекулярною масою. NFP-L є найменш вивченим, зокрема при судинній патології мозку [3].

Порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єра при судинних ураженнях мозку – відомий факт. Воно супроводжується виходом нейрон-специфічних білків у кров, що призводить до сенсibilізації організму та суттєвих змін імунної системи [4].

Основними особливостями індукованої інсультом імуносупресії є лімфопенія, зокрема зниження кількості Т-лімфоцитів, та дезактивація моноцитів у периферичній крові [5]. Поступово зростають титри протимозкових антитіл [4]. У цих умовах Т-лімфоцити все частіше визнають ключовими модуляторами запальних каскадів при гострому ішемічному інсульті. Т-клітини через гуморальну секрецію (інтерферон- γ) та негайні цитотоксичні механізми (перфорин) є основними шляхами для відстроченого постішемічного пошкодження тканин [6].

Тому доцільним вважаємо оцінити ефекти синтетичного імуномодулятора, похідного тимопоетину, гексопептиду аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргініну (імунофан), який проявляє імунорегулюючі та детоксикаційні властивості, пригнічує вільнорадикальні процеси пероксидного окиснення ліпідів, запобігає пошкодженню лімфоцитів і гранулоцитів, що викликане дією патогенних факторів середовища, зменшує виразність імунних порушень, зумовлених порушенням мозкового кровообігу [7].

Мета роботи

Вивчити рівні експресії NFP-L у сенсомоторній корі головного мозку щурів при моделюванні транзиторної ішемії на тлі сенсibilізації мозковим антигеном та імунокорекції імунофаном змін, які виникли.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на 185 статевозрілих самцях білих щурів лінії Вістар вагою 260–290 г, яких утримували у віварії на стандартному раціоні по 5 тварин у клітці з вільним доступом до харчування та води, постійним світло-затемненим режимом згідно з «Принципами догляду за лабораторними тваринами». Досліди виконали згідно з міжнародними принципами гуманного поводження з тваринами, що викладені в «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (NIH publ. No. 93 23, revised 1985).

Тварин поділили на 6 груп. Щури групи К (умовно інтактні, контроль; n = 10) не зазнавали жодних утруднень. Тварини всіх інших груп за 12 діб до відтворення моделі ішемії були сенсibilізовані 20 % водно-со-

льовим екстрактом (антигеном) гомологічної тканини мозку (вміст білка 0,33–0,50 мг/мл за Лоурі), який отримали за загальноприйнятою методикою. Щурам підшкірно вводили в 1 день – 0,5 мл, 2 день – 1 мл, 3 день – 1,5 мл екстракту. Тварини групи Кс (контроль, сенсibilізовані; n = 35) не зазнавали жодних інших втручань. Тваринам групи ПОс (псевдооперовані, сенсibilізовані; n = 35) виконували оперативний доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізацію, після чого рану зашивали. Щурам групи ПСАС (перев'язка сонної артерії, сенсibilізовані; n = 35) здійснювали аналогічний доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізацію, після чого в артерію вводили 0,2 мл фізіологічного розчину та накладали лігатуру. Тваринам груп МЕАС (з мікроемболізацією басейну сонної артерії, сенсibilізовані; n = 35) та МЕАС+і (МЕАС+імунфан; n = 35) моделювали гостре порушення мозкового кровообігу шляхом введення в ліву загальну сонну артерію 0,2 мл розчину, базовий склад якого містив 20 мл відмитих ізольованих адипоцитів, 2,8 мл 10 % CaCl₂, 10 г твіну та 0,9 % NaCl до загального об'єму 100 мл [8], після чого на артерію накладали лігатуру. При цьому щури МЕАС+і отримували підшкірно по 0,5 мкг імунфану (НВП «Біонокс», РФ) на 1–10, 21–23, 30–32 та 50–51 день експерименту. Тваринам груп ПОс та ПСАС підшкірно вводили фізіологічний розчин за аналогічною схемою. Оперативні втручання виконали з використанням тіопенталового наркозу (50 мг/кг).

Головний мозок для досліджень одержували від тварин через 12/1, 15/3, 10/22, 30/42 та 102/90 діб після сенсibilізації мозковим антигеном/оперативного втручання після надмірного введення тіопенталу натрію (200 мг/кг). Череп щура у строк до 1 хвилини розтинали, ізолювали мозок, який розділяли на три частини фронтальними перерізами. Середню частину поміщали в 10 % забуферений холодний формалін (рН 7,4, Т 4 °С) на 24 год. Зразки ущільнювали за стандартною методикою в парафін і виготовляли фронтальні зрізи 4 мкм завтовшки, забарвлювали азур II-еозином.

Імуногістохімічну реакцію для виявлення NFP-L ставили з максимальною стандартизацією температурних режимів та часу обробки. Зрізи мозку депарафінували та регідратували. Демаскування антигенів виконали в цитратному буфері (рН 6,0) при 98 °С протягом 20 хв. Зрізи інкубували 30 хв у термостаті при 22 °С з первинними антитілами до NFP (Monoclonal Mouse Anti-Human Neurofilament Protein, Clone 2F11, Ready-to-Use, «Дакко», Данія). Продукти імуногістохімічної реакції візуалізували за допомогою системи детекції EnVision FLEX («Дакко», Данія). Як позитивний контроль використовували зрізи мозку щурів із гарантовано визначеною позитивною реактивністю щодо NFP-L, а для отримання негативного контролю виконували названі процедури, але без застосування первинних антитіл. Частину зрізів додатково забарвлювали гематоксиліном Gill.

Гістологічні препарати вивчали та фотографували за стандартизованих умов (×400, 1280×960 пікселів RGB) за допомогою мікроскопа Olympus BX51, цифрової камери Olympus C3040ZOOM, комп'ютера із програмним забезпеченням Olympus DP-Soft 3.2. Зображення зрізів вивчали за допомогою системи аналізу зображення

ImageJ 1,46. Для цього зображення піддавали трансформації у 8-бітні (Image→Type→8 bit), задавали параметри вимірювання (Calibrate→Function→Pixel inverter→Ok; Analyze→Set measurements→Mean Gray Value), у головному меню обирали фігуру неправильної форми та позначали ділянки нейропілю гангліонарного шару кори великих півкуль (по 5 ділянок для лівої та правої), при натисканні клавіші «М» отримували значення питомої оптичної густини (умовні одиниці, у.о.). Розраховували середні значення показника, стандартне відхилення, помилку та вірогідність середнього. Статистичну значущість відмінностей між показниками визначали за t-критерієм Стьюдента. Мінімальним статистично значущим рівнем вважали p < 0,05.

Результати та їх обговорення

У сенсомоторній корі щурів контрольної групи, що мала звичайну будову, виявили чималу кількість імуногістохімічно маркованих тонких нервових волокон у складі нейропілю. У перікаріонах, початкових ділянках дендритів, аксональних горбиків і товстих аксонах експресію NFP-L майже не визначали. Нервові волокна з експресією NFP-L розташовувались у нейропілі хаотично. На поверхні тіл нейронів і товстих дендритів часто виявляли щільне сплетення мічених волоконних терміналей. У цих локусах у багатьох випадках можна було спостерігати дрібні округлі тільця з інтенсивною експресією NFP-L. Їхній діаметр дещо перевищував товщину NFP-L-позитивних тонких нервових волокон. Зрідка виявляли поодинокі вертикально орієнтовані нервові волокна. Отже, патерн виявлення NFP-L-позитивних нервових волокон у наших експериментах дає змогу припустити, що використаний клон антитіл щодо цього протеїну зв'язувався переважно з філаментами в тонких термінальних розгалуженнях і кінцевих апаратах нервових волокон [9].

У тварин групи Кс через 12, 15 і 22 доби після сенсibilізації в корі мозку виявляли помірний периваскулярний набряк. Нейрони часто були деформовані та мали глибоку гіперконденсовану хроматофілну субстанцію. Іноді спостерігали явища хроматолізу. Виявляли поодинокі, а іноді і групи гіперхромних нейронів, які дегенерують, рідше – некротично змінених нейронів. Часто визначали осередки дрібногубчастої дегенерації. З часом ці явища ставали менш виразними, але визначили збільшення кількості гліоцитів у корі мозку, які наприкінці дослідження (102 доба після сенсibilізації) могли утворювати невеличкі скупчення. З 12 до 22 доби після сенсibilізації спостерігали статистично значуще поступове зниження NFP-L, після чого відбувалося його зростання, наприкінці експерименту (102 доба) майже досягаючи вихідного рівня (рис. 1). Вірогідної різниці рівнів експресії NFP-L у правій і лівій півкулях у групі Кс не виявили.

У щурів груп ПОс і ПСАС стан кори великих півкуль із боку ураження майже не відрізнявся від показників групи Кс, як і рівень експресії NFP-L (рис. 1). У правій півкулі цих тварин (контрлатеральній щодо втручання), візуально не фіксували зміни стану кори, які спостерігали у тварин групи Кс. Рівні експресії NFP-L також статистично значущо не відрізнялися (рис. 1).

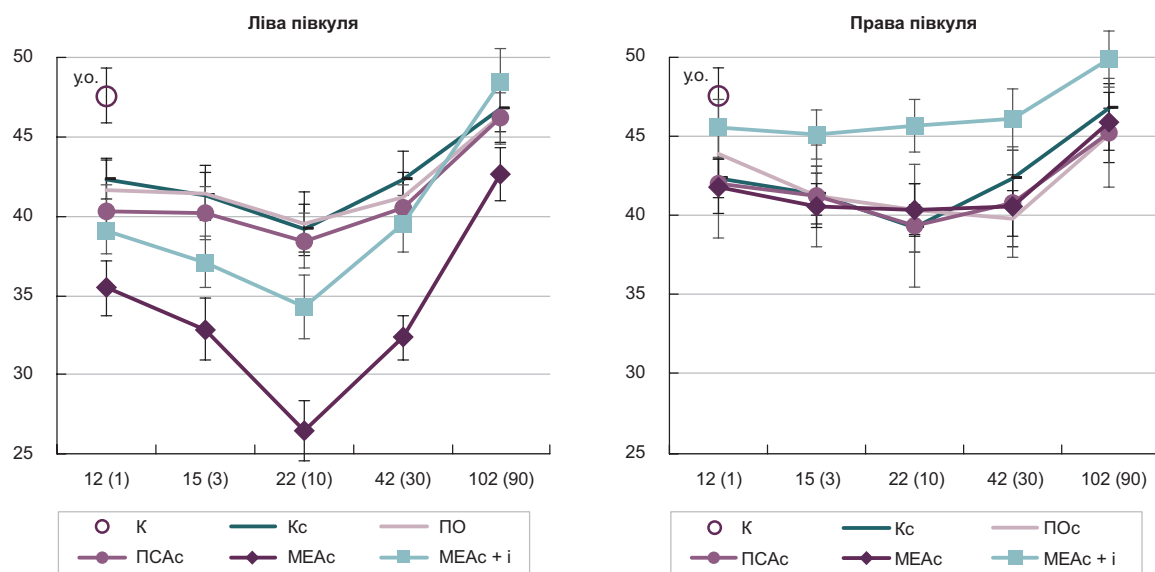


Рис. 1. Зміни експресії NFP-L у сенсомоторній корі великих півкуль мозку щурів при моделюванні транзиторної ішемії на тлі попередньої сенсibilізації мозковим антигеном та імунорекції змін, що виникли (питома оптична густина (у.о.)).

К: інтактний контроль; **Кс:** контроль, сенсibilізація; **ПОс:** псевдооперація, сенсibilізація; **ПСАс:** перев'язування лівої загальної сонної артерії, сенсibilізація; **МЕАс:** мікроемболія адипоцитами судин у басейні лівої загальної сонної артерії, сенсibilізація; **МЕАс + і:** тварини МЕАс+і, які отримували імунфан; **12(1)-102(90):** доби після початку сенсibilізації (моделювання порушення кровотоку).

Мікроемболізація судин церебральної півкулі на тлі попередньої сенсibilізації мозковим антигеном призводила до виразних дегенеративних і деструктивних змін у корі ураженої півкулі, що супроводжувалися чималим зниженням експресії NFP-L. Через одну добу після відтворення мікроемболії спостерігали виразне зменшення кількості NFP-L позитивних волокон та інтенсивності їхнього забарвлення. У нейропілі виявляли нечисленні марковані глибокі утворення, які іноді складали ланцюжки, що, ймовірно, були нервовими волокнами, що дегенерують. На 3 та 10 добу після МЕАс встановили зменшення експресії NFP-L (рис. 1). На 10 добу на загальному тлі іноді визначали ділянки з більшою кількістю мічених нервових волокон. Крім того, виявляли нечисленні округлі утворення розміром 1–3 мкм із порівняно високою інтенсивністю експресії NFP-L. Зрідка можна було простежити, що вони розташовані на кінцях нервових волокон. Через 30 діб після МЕАс у складі нейропілі виявляли збільшення кількості NFP-L⁺ волокнистих елементів і статистично значуще збільшення загальної кількості NFP-L порівняно попереднім строком спостереження (рис. 1). На 90 добу дослідження виявили зростання кількості мічених нервових волокон і загального вмісту NFP-L, який визначали кількісно (рис. 1). У контрлатеральній півкулі зміни експресії NFP-L при МЕАс майже не відрізнялися від тих, які спостерігали у групі Кс.

Імунофан у щурів із МЕАс загалом не змінював динаміку експресії NFP-L і щільність маркованих нервових волокон у сенсомоторній корі ураженої півкулі, але виразність цих змін була меншою, а з 10 доби після ішемічної атаки вона ставала статистично значущою порівняно з групою МЕАс (рис. 1). На 10 та 30 добу після відтворення ішемії марковані нервові волокна часто були товщі, ніж при МЕАс. На 102/90 добу дослідження кількісне значення вмісту NFP-L у ней-

ропілі кори мозку поверталось до контрольного рівня (рис. 1). Зменшення змін експресії NFP-L спостерігали також у контрлатеральній (правій) півкулі, що на 3, 10 і 30 добу були статистично значущо вищими порівняно з групою Кс (рис. 1).

Отже, спостереження показали: сенсibilізація мозковим антигеном викликає дифузні дегенеративні зміни в корі головного мозку та зниження експресії NFP-L. Це зумовлює посилення виразності ураження мозку при гострому порушенні кровообігу порівняно з тим, що відбувається без сенсibilізації. Крім того, сенсibilізація призводить до зміни динаміки відновлення експресії NFP-L. Останнє проявляється поступовим його зростанням протягом відновлювального періоду після ішемії, а за відсутності попередньої сенсibilізації визначили пікове перевищення вихідного рівня через місяць після відтворення мікроемболії [9].

У відновлювальний період при МЕАс виявляли значно менше, ніж за відсутності сенсibilізації, округлих тілець з порівняно високим рівнем експресії NFP-L, котрі кваліфікували як колби (конуси) росту нервових волокон [9]. Це дає підстави вважати, що сенсibilізація мозковим антигеном затримує регенерацію нервових волокон, яка є важливим компонентом компенсаторно-відновлювальних процесів у корі мозку після ішемічної атаки [10].

Імунофан за умов моделювання комбінованого імунно-судинного ураження мозку виявив протекторні властивості та зменшував виразність зниження експресії NFP-L. Ці ефекти імунофану, особливо у відновлювальний період після епізоду ураження мозку, пов'язуємо з його імунотулювальним ефектом [7]. Це підтверджується зіставленням динаміки відновлення експресії NFP-L в ураженій і контрлатеральній півкулі, яка зазнавала імунного ушкодження, а ішемія була відсутня.

Висновки

1. Сенсibiliзація мозковим антигеном призводить до дифузних дегенеративних змін у корі великого мозку, які супроводжуються зниженням експресії NFP-L.

2. Попередня сенсibiliзація мозковим антигеном при гострому порушенні мозкового кровообігу призводить до посилення виразності ураження мозку й зниження експресії NFP-L, уповільнює та змінює динаміку його відновлення.

3. Ефектом застосування імунофану є зменшення змін експресії NFP-L у сенсомоторній корі, що викликані і при сенсibiliзації мозковим антигеном, і при її комбінації з транзиторним порушенням мозкового кровотоку.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Яременко Л. М., канд. мед. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Грабовий О. М., д-р мед. наук, професор, науково-дослідне відділення цитопатології та патологічної анатомії, Національний інститут раку, м. Київ, Україна.

Бідна Л.П., канд. біол. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Шепелев С. Є., канд. біол. наук, доцент каф. біології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Груша М. М., канд. біол. наук, доцент каф. біології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Сведения об авторах:

Яременко Л. М., канд. мед. наук, доцент каф. гистологии и эмбриологии, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.

Грабовой О. М., д-р мед. наук, профессор, научно-исследовательское отделение цитопатологии и патологической анатомии, Национальный институт рака, г. Киев, Украина.

Бидна Л.П., канд. биол. наук, доцент каф. гистологии и эмбриологии, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.

Шепелев С. Е., канд. биол. наук, доцент каф. биологии, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.

Груша М. М., канд. биол. наук, доцент каф. биологии, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина.

Information about authors:

Yaremenko L. M., MD, PhD, Associate Professor, Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Grabovoy O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Research Department of Cytopathology and Pathologic Anatomy, Ukrainian National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine.

Bidna L.P., PhD, Associate Professor, Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Shepelev S. Ye., PhD, Associate Professor, Department of Biology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Grusha M. M., PhD, Associate Professor, Department of Biology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 25.01.2018

Після доопрацювання / Revised: 02.03.2018

Прийнято до друку / Accepted: 11.03.2018

Список літератури

- [1] Зозуля А.І. Проблеми, які стоять перед дослідниками щодо цереброваскулярних хвороб в цілому та інсульту зокрема / А.І. Зозуля, Г.О. Слабкий, І.С. Зозуля // Український медичний часопис. – 2014. – №5. – С. 112–120.
- [2] Alterations in neurofilaments and the transformation of the cytoskeleton in axons may provide insight into the aberrant neuronal changes of Alzheimer's disease / J.C. Vickers, M.T. Kirkcaldie, A. Phipps, A.E. King // *Brain research bulletin*. – 2016. – №126. – Part 3. – P. 324–333.
- [3] Up-regulation of neurofilament light chains is associated with diminished immunoreactivities for MAP2 and tau after ischemic stroke in rodents and in a human case / W. Härtig, M. Krueger, S. Hofmann, et al. // *J Chem Neuroanat*. – 2016. – №78. – P. 140–148.
- [4] Antigen presentation after stroke / F. Miró-Mur, X. Urra, M. Gallizioli, et al. // *Neurotherapeutics*. – 2016. – Vol. 13. – №4. – P. 719–728.
- [5] Lymphocyte-to-monocyte ratio on day 7 is associated with outcomes in acute ischemic stroke / M.G. Park, M.K. Kim, S.H. Chae, et al. // *Neurological Sciences*. – 2017. – Vol. 39(2). – Issue 2. – P. 243–249.
- [6] Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke / A. Liesz, W. Zhou, E. Mracsko, et al. // *Brain*. – 2011. – Vol. 134. – Part 3. – P. 704–720.
- [7] Лебедев В.В. Гидрофильный гексапептид имунофан – гиперактивный регулятор транспортных белков множественной лекарственной устойчивости / В.В. Лебедев, С.А. Новиков // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2006. – Т. 142. – №12. – С. 649–651.
- [8] Патент 36843, МПК G09B 23/00, Україна. Спосіб моделювання комбінованого судинно-імунного пошкодження мозку / О.М. Грабовий, Л.М. Яременко; опубл. 10.11.2008 // *Бюлетень*. – №21.
- [9] Yaremenko L.M. Changes in the expression of neurofilament protein in the rat sensorimotor cortex induced by microembolization of blood vessels: Effect of Immunomodulation / L.M. Yaremenko, A.N. Grabovoy // *Neurophysiology*. – 2016. – Vol. 48. – №2. – P. 111–116.
- [10] Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke / Y. Ueno, M. Chopp, L. Zhang, B. Buller, et al. // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43. – №8. – P. 2221–2228.

References

- [1] Zozulia, A. I., Slabkyi, H. O., & Zozulia, I. S. (2014). Problemy, yaki stoiat pered doslidnykamy shodo tserebrovaskuliarnykh khvorob v tsilomu ta insultu zokrema. [Problems facing researchers regarding cerebrovascular diseases in general and stroke in particular]. *Ukrainskyi medychyi chasopys*, 5, 112–120 [in Ukrainian].
- [2] Vickers, J. C., Kirkcaldie, M. T., Phipps, A., & King, A. E. (2016). Alterations in neurofilaments and the transformation of the cytoskeleton in axons may provide insight into the aberrant neuronal changes of Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*, 126(3), 324–333. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.07.012.
- [3] Härtig, W., Krueger, M., Hofmann, S., Preißler, H., Märkel, M., Frydrychowicz, C., et al. (2016). Up-regulation of neurofilament light chains is associated with diminished immunoreactivities for MAP2 and tau after ischemic stroke in rodents and in a human case. *J Chem Neuroanat*, 78, 140–148. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.09.004.
- [4] Miró-Mur, F., Urra, X., Gallizioli, M., Chamorro, A., & Planas, A. M. (2016). Antigen presentation after stroke. *Neurotherapeutics*, 13(4), 719–728.
- [5] Park, M. G., Kim, M. K., Chae, S. H., Kim, H. K., Han, J., & Park, K. P. (2017). Lymphocyte-to-monocyte ratio on day 7 is associated with outcomes in acute ischemic stroke. *Neurological Sciences*, 39(2), 243–249. doi: 10.1007/s10072-017-3163-7.
- [6] Liesz, A., Zhou, W., Mracsko, E., Karcher, S., Bauer, H., Schwarting, S., et al. (2011) Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain*, 134(3), 704–720. doi: 10.1093/brain/awr008.
- [7] Lebedev, V. V., & Novikov, S. A. (2006) Hidrofil'nyj geksapeptid imynofan – giperaktivnyj regulyator transportnykh belkov mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti [Hydrophilic hexapeptide imunofan – hyperactive regulator of transport proteins of multiple drug resistance]. *Byulleten' e'ksperimental'noj biologii i medicyny*, 142(12), 649–651 [in Russian].
- [8] Hrabovyi, O. M., & Yaremenko, L. M. (patentee) (2008). Patent 36843, MPK G09B 23/00, Ukraine. Sposib modeliuвання kombinovanoho sudynno-immunoho poskodzhennia mozku [Patent 36843, IPC G09B 23/00, Ukraine. Method of modeling of combined vascular-immune brain damage]. *Biuletyn*, 21. [in Ukrainian].
- [9] Yaremenko, L. M., & Grabovoy, A. N. (2016) Changes in the expression of neurofilament protein in the rat sensorimotor cortex induced by microembolization of blood vessels: effect of immunomodulation. *Neurophysiology*, 48(2), 111–116.
- [10] Ueno, Y., Chopp, M., Zhang, L., Buller, B., Liu, Z., Lehman, N. L., et al. (2012). Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke*, 43(8), 2221–2228. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.646224.

Патоморфологічні особливості хронічних гастродуоденітів у дітей із дисплазією сполучної тканини

О. М. Муквіч¹, Т. Д. Задорожна¹, О. В. Лавренчук², Т. М. Арчакова¹

¹ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ, ²КНП «Центр первинної медико-санітарної допомоги № 1» Шевченківського району, м. Київ, Україна

Ключові слова:
дисплазія
сполучної тканини,
гастродуоденіт, діти.

Патологія. – 2018. –
Т. 15, № 1(42). –
С. 62–67

DOI:
10.14739/2310-1237.
2018.1.128818

E-mail:
ov.lavrenchuk@
gmail.com

Ефективність прогнозування перебігу хвороби та лікувальних засобів при хронічних гастродуоденітах (ХГД) у дітей визначається наявністю генетичного дефекту синтезу колагену, що лежить в основі патогенезу дисплазії сполучної тканини (ДСТ). Порушення метаболізму колагену спричиняє морфологічні зміни мукоциліарного бар'єра, які впливають на клінічний перебіг захворювання, модулювання захисних факторів і процесів репарації. Важливе значення має морфологічне оцінювання стану слизової оболонки шлунка (СОШ) та дванадцятипалої кишки (ДПК) для персоналізованого підходу до вибору терапевтичної тактики при ХГД, що асоціюються з ДСТ.

Мета роботи – оцінити патоморфологічні особливості СОШ і ДПК у дітей із ХГД, який асоційований із ДСТ.

Матеріали та методи. Морфологічні дослідження ендоскопічних біоптатів шлунка та ДПК у 63 дітей віком від 11 до 17 років. Матеріал опрацювали за гістологічною методикою з забарвленням гематоксилін–еозином і за Ван Гізоном. Статистичний аналіз включав розрахунок відношення шансів, довірчих інтервалів і р-значення.

Результати. Встановили залежність морфологічних змін від вираженості ДСТ і реакції на протокольну терапію: вогнища фіброзу OR = 7,00 і 5,25, інфільтрація еозинофілами OR = 3,68 та 3,67, дистрофічні зміни епітелію OR = 2,34 та 3,02, зміна архітектоники залоз OR = 3,68 та 3,28 відповідно. Неефективній відповіді на терапію притаманна щільна лімфоцитарно-плазмоцитарна інфільтрація епітелію залоз і власної пластинки (81,3 %), виражений дифузний набряк (68,8 %), нерівномірне розташування залоз зі зміною архітектоники та дистрофічно зміненим епітелієм (62,5 %). Виражені морфологічні зміни мають 78,6 % дітей без ДСТ, які не відповідають на терапію, хоча при асоційованій патології відсутність відповіді на лікування не має чіткого зв'язку з морфологічною формою ХГД.

Висновки. Запальні процеси СОШ і ДПК у дітей із ДСТ характеризуються лімфогістоцитарною інфільтрацією власної пластинки, поверхневого епітелію та епітелію залоз, набряком, дистрофічними змінами епітелію залоз і поширеними вогнищами фіброзу, що підвищує ризик ранньої хронізації, формування атрофічних процесів. Для оцінювання перебігу, прогнозу ХГД необхідно врахування клінічних ознак ДСТ, котрі впливають на патогенетичні процеси у слизовій оболонці.

Ключевые слова:
дисплазия
соединительной
ткани,
гастродуоденит,
дети.

Патология. – 2018. –
Т. 15, № 1(42). –
С. 62–67

Патоморфологические особенности хронических гастродуоденитов у детей с дисплазией соединительной ткани

Е. Н. Муквич, Т. Д. Задорожная, О. В. Лавренчук, Т. Н. Арчакова

Эффективность прогнозирования течения болезни и лечебных средств при хронических гастродуоденитах (ХГД) у детей определяется наличием генетического дефекта синтеза коллагена, что лежит в основе патогенеза дисплазии соединительной ткани (ДСТ). Нарушение метаболизма коллагена приводит к морфологическим изменениям мукоцилиарного барьера, которые влияют на клиническое течение заболевания, моделирование защитных факторов и процессов репарации. Важное значение имеет морфологическая оценка состояния слизистой оболочки желудка (СОЖ) и двенадцатиперстной кишки (ДПК) для персонализированного подхода к выбору терапевтической тактики при ХГД, ассоциированном с ДСТ.

Цель работы – оценить патоморфологические особенности СОШ и ДПК у детей с ХГД, ассоциированным с ДСТ.

Материалы и методы. Морфологические исследования эндоскопических биоптатов желудка и ДПК у 63 детей в возрасте от 11 до 17 лет. Материал обработан по гистологической методике с окраской гематоксилин–еозином и по Ван Гизону. Статистический анализ включал расчет отношения шансов, доверительных интервалов и р-значения.

Результаты. Установлена зависимость морфологических изменений от выраженности ДСТ и реакции на протокольную терапию: очаги фиброза OR = 7,00 и 5,25, инфильтрация еозинофилами OR = 3,68 и 3,67, дистрофические изменения эпителия OR = 2,34 и 3,02, изменение архитектоники желез OR = 3,68 и 3,28 соответственно. Неэффективному ответу на терапию присуща плотная лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация эпителия желез и собственной пластинки (81,3 %), выраженный диффузный отек (68,8 %), неравномерность зон расположения желез с изменением архитектоники и дистрофически измененным эпителием (62,5 %). Выраженные морфологические изменения отмечены у 78,6 % детей без ДСТ, которые не отвечают на терапию, хотя при ассоциированной патологии отсутствие ответа на лечение не имеет четкой связи с морфологической формой ХГД.

Выводы. Воспалительные процессы СОЖ и ДПК у детей с ДСТ характеризуются лимфогистиоцитарной инфильтрацией собственной пластинки, поверхностного эпителия и эпителия желез, отеком, дистрофическими изменениями эпителия желез и распространенными очагами фиброза, что повышает риск ранней хронизации и формирования атрофических процессов. Для оценки течения и прогноза ХГД необходимо учитывать клинические признаки ДСТ, которые влияют на патогенетические процессы в слизистой оболочке.

Pathological and morphological properties of chronic gastroduodenitis in children with connective tissue dysplasia

O. M. Mukvich, T. D. Zadorozhnaja, O. V. Lavrenchuk, T. N. Archakova

Predictive chronic gastroduodenitis (CGD) treating in children is bound to genetically controlled collagen synthesis underpinning the connective tissue dysplasia (CTD). Collagen metabolic disorder affects morphological changes of mucosal-cellular barrier determining clinically-aided repair processes. Morphologic assessment enables personalized approaches to handle inflammatory processes in upper gastro-intestinal tract (GIT) associated with extracellular matrix disorders.

Aim: examining patho-morphologic properties of gastric and duodenal mucosa in children with CGD associated with CTD.

Materials and methods. Morphologic examination of endoscopic biopsies in 63 children, 11–17 years old. Samples were processed by hematoxylin eosin section staining. The influence of dysplasia and patient's response to standard therapy on morphological changes were assessed using odd ratio statistics, confidence limits, and p-values.

Results. Dependency of morphological changes versus the CTD degree and patient response to standard therapy: foci of fibrosis OR = 7 and 5.25, eosin infiltration OR = 3.684 and 3.667, dystrophic epithelium changes OR = 2.344 and 3.023, change in glands architectonics OR = 3.684 and 3.279, respectively. Biopsy samples from patients with CTD and weak therapy response feature dense lymphocyte-plasmocyte infiltration of gland epithelium and lamina propria (81.3 %), pronounced diffuse edema (68.8 %), and uneven gland localization with changed architectonics and dystrophically modified epithelium (62.5 %). 78.6 % not therapy-responsive children without DCT have morphologically pronounced CGD whereas irresponsiveness in children with the associated pathology isn't strongly connected with CGD morphology.

Conclusion. Gastric and duodenal mucosa inflammation in children with expressed CTD features are characterized with lympho-histological infiltration of lamina propria and surface gland epithelium, increased edema, dystrophic changes of gland epithelium, and spread fibrosis loci indicating high risk of early chronicity and atrophic process formation. The account of clinical CTD conditions affecting pathogenic mucosal processes stipulates adequate CGD development assessment.

Key words: connective tissue dysplasia, diseases gastritis, hypertrophic, children.

Pathologia 2018; 15 (1), 62–67

З кожним роком збільшується частота гастроентерологічної патології, серед якої одне з перших місць посідають хвороби верхнього відділу шлунково-кишкового тракту (ШКТ), а саме хронічний гастродуоденіт (ХГД), котрий характеризується мультифакторним генезом, прогресивним перебігом із частими рецидивами та ранньою хронізацією запального процесу з формуванням деструктивних, ерозивних процесів, що значно погіршують якість життя [1–3]. Безсумнівно, ефективність прогнозування перебігу хвороби та профілактично-лікувальних засобів при ХГД визначається наявністю коморбідних станів, одним із яких є генетично детермінований дефект синтезу колагену, що лежить в основі патогенезу дисплазії сполучної тканини (ДСТ). Сполучну тканину вважають нині основною системозв'язувальною тканиною організму, що становить більше ніж половина маси тіла, підтримує основні гомеостатичні параметри організму, бере безпосередню участь у перебігу як фізіологічних і пристосувальних реакцій організму, так і патологічних станів [4]. Порушення метаболізму колагену у слизовій оболонці (СО) визначає формування морфологічних особливостей мукоциліарного бар'єра ШКТ, який містить найбільшу кількість колагену [5], що не може не впливати на клінічний перебіг, модулювання захисних факторів і процесів репарації [6, 7].

У попередніх дослідженнях виявили: перебіг ХГД у дітей на тлі дезорганізації сполучної тканини характеризується раннім дебютом, агресивним, прогресивним перебігом з частими загостреннями, рецидивами, вираженими проявами симптомів неспецифічної інтоксикації, схильністю до формування деструктивних форм уражень верхніх відділів ШКТ та імунобіохімічних уражень приепітеліального прошарку [8]. Тому в умовах персоналізованого підходу до вибору терапе-

втичних заходів особливого значення набуває оцінювання структуральних змін СО при запальних процесах верхніх відділів ШКТ, що асоціюються з дезорганізацією екстракорпорального матриксу. У визначенні механізмів пошкодження СО важливе значення має оцінювання морфологічних змін біопатів шлунка та ДПК, яке дає змогу не тільки здійснити точнішу діагностику ХГД, але й визначити прогноз перебігу хвороби й обґрунтувати необхідність інтенсифікації терапевтичних заходів, що визначило актуальність дослідження.

Мета роботи

Оцінити патоморфологічні особливості слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки в дітей із хронічним гастродуоденітом, який асоційований з дезорганізацією сполучної тканини.

Матеріали і методи дослідження

Для верифікації діагнозу ХГД виконали морфологічні дослідження біопатів шлунка та ДПК у 63 дітей віком від 11 до 17 років.

Біопати фіксували в 10 % розчині нейтрального забуферного формаліну та опрацьовували за загальноприйнятою гістологічною методикою з забарвленням зрізів гематоксилін–еозином і за Ван Гізеном. Дослідження біопатів виконали на мікроскопі Ахіоскоп 40 (ФРН) із фотодокументуванням. Біопсію виконали згідно з загальною декларацією з біоетики та прав людини, що ухвалена Генеральною конференцією ЮНЕСКО 19 жовтня 2005 р.

Ступінь вираженості диспластичних проявів наведений згідно з класифікацією Т. Мілковської-Дімітрової в модифікації Л. Н. Абакумової [9].

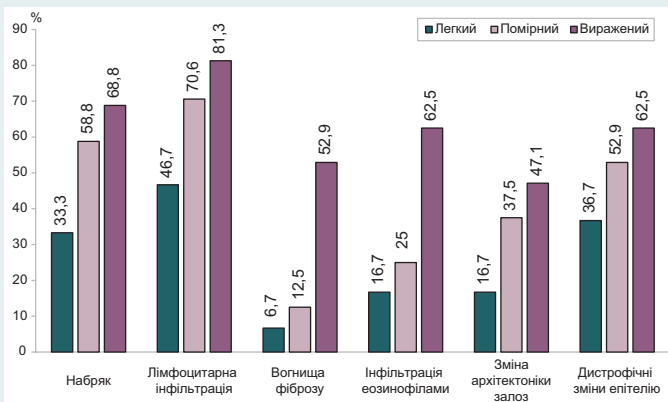


Рис. 1. Прояв морфологічних змін СОШ і ДПК при ХГД у дітей залежно від ступеня ДСТ.
Лімфоцитарна інфільтрація: лімфоцитарна інфільтрація власної пластинки та епітелію залоз.

Таблиця 1. Відношення шансів за певними показниками в різних підмножинах пацієнтів, згрупованих залежно від наявності ДСТ

Фактор \ наслідок	Немає	Є	OR	p	95 % LB CI	95 % UB CI
OR набряку залежно від фактора – наявність у пацієнтів ДСТ						
ДСТ немає	20	10	3,50	0,02	1,238	9,891
ДСТ є	12	21				
OR лімфоцитарної інфільтрації власної пластинки та епітелію залоз залежно від фактора – наявність у пацієнтів ДСТ						
ДСТ немає	16	14	3,57	0,02	1,223	10,429
ДСТ є	8	25				
OR виникнення фокусів фіброзу залежно від фактора – наявність у пацієнтів ДСТ						
ДСТ немає	28	2	7,00	0,017	1,404	34,908
ДСТ є	22	11				
OR інфільтрація еозинофілами залежно від фактора – наявність у пацієнтів ДСТ						
ДСТ немає	25	5	3,68	0,03	1,129	12,021
ДСТ є	19	14				
OR зміна архітекτονіки залоз залежно від фактора – наявність у пацієнтів ДСТ						
ДСТ немає	25	5	3,68	0,03	1,129	12,021
ДСТ є	19	14				
OR дистрофічні зміни епітелію залежно від фактора – наявність у пацієнтів ДСТ						
ДСТ немає	19	11	2,34	0,099	0,85	6,461
ДСТ є	14	19				

OR: відношення шансів («odds ratio»); p-значення: вірогідність нульової гіпотези про відсутність відмінності шансів; LB CI: нижня межа довірчого інтервалу («lower bound of confidence interval»); UB CI: верхня межа довірчого інтервалу («upper bound of confidence interval»).

Вплив факторів на морфологічні зміни статистично встановили, розрахувавши відношення шансів, верхню та нижню межі 95 % довірчого інтервалу та p-значення з використанням системи R.

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів свідчив про наявність у слизовій оболонці шлунка та ДПК структурних змін, які в більшості дітей характеризувались лімфоцитарно-плазмодитарною інфільтрацією власної пластинки та епітелію залоз – у 81,3 %, інфільтрацією еозинофілами – у 62,5 %, набряком – у 68,8 %, дистрофічними змінами епітелію – у 62,5 %, вогнищами фіброзу – у 52,9 %, зміною архітекτονіки залоз – у 47,1 %, що підтверджувало запальний генез захворювань верхніх відділів ШКТ. При цьому в біптатах СО антрального відділу шлунка

визначили різке підвищення щільності лімфоцитарно-плазмодитарного інфільтрату, який мав поширений характер і майже в усіх випадках виявлявся на всій площині СО.

Структурні зміни слизових оболонок оцінили у групах залежно від кількості балів клінічних диспластичних проявів: легкий (до 12 балів), помірний (13–23 бали) і виражений (більше ніж 24 бали) ступінь диспластичних проявів. Загальна відносна кількість дітей у кожній групі прийнята за 100,0 % (рис. 1).

У дітей із вираженими проявами ДСТ у 47,1 % визначили зміну архітекτονіки залоз, які були розташовані нерівномірно, частина з них деформована, кістозно розширена та вислана дистрофічно зміненим або частково атрофованим епітелієм. У власній пластинці виявили набряк (68,8 %) і вогнища фіброзу (52,9 %). У частини цих дітей встановили сплюснення поверхневого епітелію з наявністю мікроерозій. У слизовій оболонці шлунка подібні зміни визначали формування атрофії з незворотною втратою шлункових залоз і заміщенням їх фіброзною тканиною.

У 62,5 % дітей із вираженими проявами ДСТ у власній пластинці виявили інфільтрацію еозинофілами, кількість яких досягала 10–15 у полі зору. Морфологічне значення еозинофільної інфільтрації складно чітко інтерпретувати. Однією з причин може бути розвиток гастроінтестинальної алергії, яка реалізується шляхом підвищеної проникності СО для потенційних алергенів в умовах порушення структури екстрацелюлярного матриксу. Підвищена кількість еозинофілів у СОШ і ДПК може визначати появу антигенних властивостей білкових структур клітин у тканинах із недостатньою функцією колагену.

У дітей із помірним ступенем ДСТ найчастіше (70,6 %) виявляли лімфоцитарну інфільтрацію власної пластинки та епітелію залоз, менше – набряк (58,8 %) та дистрофічні зміни епітелію (52,9 %). Зміна архітекτονіки залоз встановлена у 37,5% цих дітей, у 25,0 % виявлена інфільтрація власної пластинки еозинофілами, у 12,5 % обстежених визначили окремі фокуси фіброзу власної пластинки.

У дітей із легким ступенем ДСТ щільність лімфоцитарної інфільтрації залежала від тривалості запального процесу, але запальний інфільтрат спостерігали у власній пластинці. Вогнища фіброзованої строми виявили у 6,7 % пацієнтів із частими рецидивами при тривалості ХГД понад 3–4 роки. У 16,7 % цих дітей встановлена зміна архітекτονіки залоз та інфільтрація власної пластинки еозинофілами за наявності чітких клінічних симптомів істинної харчової алергії.

Для підтвердження залежності морфологічних змін СОШ від ступеня вираженості ДСТ обчислили відношення шансів (OR) [12], що дає змогу визначити вплив відсутності та наявності ДСТ у конкретній групі спостережень (із легкими та вираженими проявами ДСТ) у дітей із ХГД.

Серед морфологічних даних простежується статистично значущі, з вірогідністю 95 % (відповідні p-значення становлять <0,05) відношення шансів між такими показниками запального процесу: вогнища фіброзу OR = 1,13 (95 % довірчий інтервал становить 1,00–1,28), інфільтрація еозинофілами OR = 0,83

(0,76–0,90), дистрофічні зміни епітелію OR = 1,08 (1,01–1,15), зміна архітекtonіки залоз OR = 2,28 (2,14–2,42). За наявності набряку OR = 1,03 (0,97–1,09) та лімфоцитарної інфільтрації епітелію залоз і власної пластинки OR = 1,01 (0,96–1,06) статистично значущий із вірогідністю 95 % (відповідні р-значення <0,05) зв'язок не простежується (табл. 1).

Результат и свідчать, що запальні процеси у верхніх відділах ШКТ у дітей із вираженими проявами дезорганізації сполучної тканини мають більший ризик ранньої хронізації з частішим формуванням атрофічних змін. Тому для оцінювання перебігу та прогнозу ХГД необхідне врахування клінічних ознак ДСТ.

Інтерес становило визначення морфологічних особливостей ХГД, враховуючи бальну оцінку ДСТ та ефективність відповіді на терапію (згідно з протоколом), яку оцінювали за кількістю рецидивів ХГД на рік. Відповідно до цих критеріїв дітей із ХГД поділили на групи:

група А – діти з кількістю балів ДСТ ≤ 12 , які мали задовільну відповідь на протокольную терапію, рецидиви не частіше 1 разу на рік, не потребували стаціонарного етапу лікування;

група В – діти з кількістю балів ≤ 12 , рецидиви частіше 2–3 разів на рік; більшість цих дітей мала обтяжений за хронічними захворюваннями ШКТ сімейний анамнез і потребувала госпіталізації;

група С – діти з помірним і вираженим ступенем дисплазії (ДСТ 13–52 бали), частота рецидивів – 1–2 рази на рік, без потреби в госпіталізації;

група D – діти з помірним і вираженим ступенем дисплазії (ДСТ 13–52 бали), частими загостреннями, які часто потребували стаціонарного лікування.

У дітей групи А встановили незначну лімфоцитарно-плазмочитарну інфільтрацію власної пластинки та епітелію залоз – у 43,8 %, дистрофічні зміни епітелію – у 37,5 %, вогнищевий набряк – у 31,3 % (рис. 2). У невеликій кількості дітей спостерігали поодинокі фокуси фіброзу та зміну архітекtonіки залоз (6,3 %), наявність до 5 еозинофілів у полі зору (12,5 %).

Лімфоцитарну інфільтрацію поверхневого епітелію та епітелію залоз виявили у 50,0 % дітей групи В. У цій групі визначили дистрофічні зміни епітелію – у 41,2 %, вогнищевий набряк – у 35,7 %, порушення архітекtonіки залоз власної пластинки – у 29,4 %, еозинофілію – 21,4 %, вогнища фіброзу – 7,1 %.

Під час морфологічного дослідження СОШ і ДПК дітей, які увійшли до групи С, встановили виражену інфільтрацію власної пластинки, у 70,6 % – інфільтрацію поверхневого епітелію та епітелію залоз лімфоцитами, плазматичними клітинами. Здебільшого (58,8 %) набряк мав виражений, дифузний характер, на відміну від попередніх груп. Дистрофічні зміни епітелію залоз виявили у 52,9 % дітей, зміну архітекtonіки залоз – у 41,2 %, вогнища фіброзу – у 29,4 %, інфільтрацію еозинофілами власної пластинки – у 35,3 %. У дітей цієї групи виявили кістозно розширені залози, епітелій яких сплюснений і злущений у просвіт.

У біоптатах пацієнтів групи D із найбільшою частотою визначали щільну лімфоцитарно-плазмочитарну інфільтрацію епітелію залоз і власної пластинки (81,3 %), виражений набряк, який мав дифузний

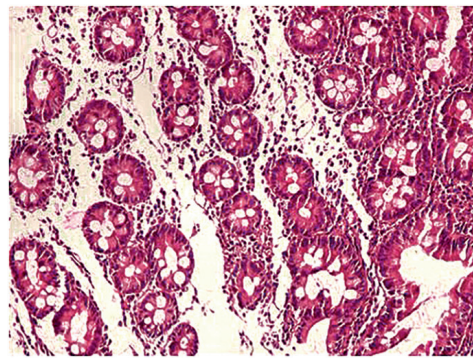


Рис. 2. Мікрофото. Слизова оболонка дванадцятипалої кишки. Дифузна запальна інфільтрація та набряк власної пластинки слизової оболонки. Забарвлення гематоксилином–еозином. Зб.: 10×20.

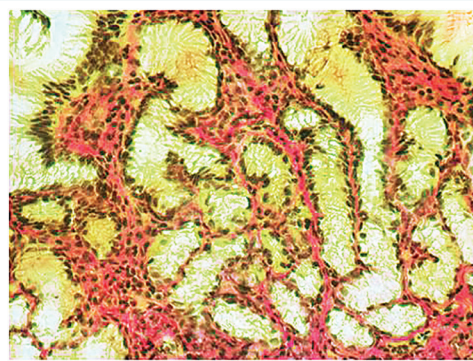


Рис. 3. Мікрофото. Слизова оболонка шлунка. Фіброз власної пластинки слизової оболонки. Забарвлення за Ван Гізеном. Зб.: 10×20.

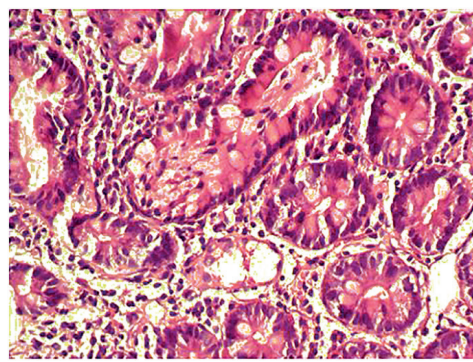


Рис. 4. Мікрофото. Слизова оболонка дванадцятипалої кишки. Сплюснення та дистрофія епітелію залоз слизової оболонки. Забарвлення гематоксилином–еозином. Зб.: 10×20.

характер (68,8 %). У 62,5 % дітей цієї групи виявили порушення архітекtonіки та дистрофію епітелію, що їх вистилає (рис. 3).

У 3 дітей цієї групи визначили наявність мікроерозій в антральних відділах шлунка. У 43,8 % цих дітей виявили інфільтрацію еозинофілами власної пластинки більше ніж 10–15 клітин у полі зору, у 37,5 % спостерігали поширені вогнища фіброзу у власній пластинці (рис. 4).

Частота виявлення окремих морфологічних змін СОШ і ДПК у дітей у названих групах наведена на рис. 5.

Отже, частина дітей із тих чи інших причин не мають достатньої відповіді на стандартне лікування. Цікавим є визначення структурних особливостей СОШ і ДПК у дітей, які не мають ефективною відповіді на протокольную терапію.

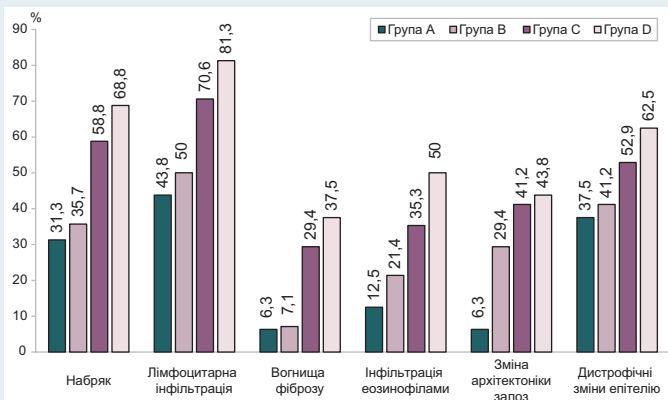


Рис. 5. Морфологічні зміни СОШ і ДПК при ХГД на тлі ДСТ.

Таблиця 2. Відношення шансів за морфологічними показниками залежно від відповіді на протокольну терапію.

Фактор \ наслідок	Немає	Є	OR	p	95 % LBСI	95 % UBСI
OR набряку залежно від фактора – відповідь на протокольну терапію (добре або погано)						
Добре (А + С)	22	12	6,49	0,001	2,129	19,807
Погано (В + D)	10	19				
OR лімфоцитарної інфільтрації власної пластинки та епітелію залоз (ЛІВПЕЗ) залежно від фактора – відповідь на протокольну терапію (добре або погано)						
Добре (А + С)	15	13	3,33	0,026	1,153	9,633
Погано (В + D)	9	26				
OR виникнення фокусів фіброзу залежно від фактора – відповідь на протокольну терапію (добре або погано)						
Добре (А + С)	35	4	5,25	0,014	1,397	19,733
Погано (В + D)	15	9				
OR інфільтрація еозинофілами залежно від фактора – відповідь на протокольну терапію (добре або погано)						
Добре (А + С)	32	8	3,67	0,024	1,188	11,314
Погано (В + D)	12	11				
OR зміна архітекτονіки залоз залежно від фактора – відповідь на протокольну терапію (добре або погано)						
Добре (А + С)	31	8	3,28	0,037	1,072	10,024
Погано (В + D)	13	11				
OR дистрофічні зміни епітелію залежно від фактора – відповідь на протокольну терапію (добре або погано)						
Добре (А + С)	21	11	3,02	0,034	1,083	8,441
Погано (В + D)	12	19				

OR: відношення шансів («odds ratio»); p-значення: вірогідність нульової гіпотези про випадковість результату; LBСI: нижня межа довірчого інтервалу («lower bound of confidence interval»); UBСI: верхня межа довірчого інтервалу («upper bound of confidence interval»).

Для підтвердження залежності морфологічних змін СОШ і ДПК (набряк, лімфоцитарна інфільтрація поверхневого епітелію та епітелію залоз, вогнища фіброзу, інфільтрація еозинофілами, зміна архітекτονіки залоз і дистрофічні зміни епітелію) від впливу на них протокольної терапії, незалежно від бальної оцінки ДСТ, обчислили відношення шансів (табл. 2). Кількість пацієнтів із гарною реакцією організму на протокольну терапію обчислена як сума груп А і С, а кількість пацієнтів зі слабкою відповіддю – як сума груп В і D.

Порівняльний аналіз патоморфологічних змін при запальних процесах СО шлунку та ДПК свідчить, що діти з вираженими проявами ДСТ мають вищий ступінь лімфоцитозитарної запальної інфільтрації зі значним вмістом еозинофілів, вираженим набряком,

дистрофічними змінами епітелію залоз і поширеними вогнищами фіброзу, що збігається з даними інших авторів [10]. Результати доводять більший ступінь тяжкості морфологічних проявів запального процесу у верхніх відділах ШКТ і виражений фіброзні та ерозивні процеси у власній пластинці цих дітей. Формування в більшості з них атрофічних процесів із ранньою хронізацією супроводжувалось у частини дітей розвитком гастроінтестинальної гіперсенсibiliзації, що доведено також дослідниками [11].

Висновки

1. Встановили залежність окремих морфоструктурних змін СОШ і ДПК від ступеня вираженості ДСТ: вогнища фіброзу OR = 1,13 (1,00–1,28), інфільтрація еозинофілами OR = 0,83 (0,76–0,90), дистрофічні зміни епітелію OR = 1,08 (1,01–1,15), зміна архітекτονіки залоз OR = 2,28 (2,14–2,42).

2. Виявили залежність окремих морфоструктурних змін СОШ і ДПК від дворівневого ступеня відповіді пацієнта на протокольну терапію: вогнища фіброзу OR = 5,25 (1,397–19,733), інфільтрація еозинофілами OR = 3,67 (1,188–11,314), дистрофічні зміни епітелію OR = 3,02 (1,083–8,441), зміна архітекτονіки залоз OR = 3,28 (1,072–10,024).

3. Запальні процеси СОШ і ДПК у дітей із вираженими проявами ДСТ і відсутністю ефективної відповіді на протокольну терапію ХГД характеризуються лімфоцитозитарною інфільтрацією власної пластинки епітелію та епітелію залоз із чималим вмістом еозинофілів (81,3 %), поширеним набряком (68,8 %), дистрофічними змінами епітелію залоз і поширеними вогнищами фіброзу (62,5 %), що визначає високий ризик ранньої хронізації з формуванням істинних атрофічних процесів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Муквич О. М., д-р мед. наук, головний науковий співробітник відділення хвороб сполучної тканини в дітей, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ.
Задорожна Т. Д., д-р мед. наук, професор, член-кор. НАМН України, керівник лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ.
Лавренчук О. В., дільничний лікар-педіатр, КНП «ЦПМСД № 1» Шевченківського району, м. Київ, Україна.

Арчакова Т. М., канд. мед. наук, старший науковий співробітник лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ.

Сведения об авторах:

Муквич Е. Н., д-р мед. наук, главный научный сотрудник отделения болезней соединительной ткани у детей, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», г. Киев.
Задорожная Т. Д., д-р мед. наук, профессор, член-кор. НАМН Украины, руководитель лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», г. Киев.

Лавренчук О. В., участковый врач-педиатр, КНП «ЦПМСД № 1» Шевченковского района, г. Киев, Украина.

Арчакова Т. Н., канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины», г. Киев.

Information about authors:

Mukvich O. M., MD, PhD, DSc, Chief Researcher, SI "Institute of pediatrics, obstetrics and gynaecology of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Zadorozhnaja T. D., MD, PhD, DSc, Professor, Corresponding Member of NAMS of Ukraine, Head of the Laboratory of Pathomorphology, SI "Institute of pediatrics, obstetrics and gynaecology of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Lavrenchuk O. V., MD, District Doctor Pediatrician, Public Non-Profit Enterprise "Center of Primary Medical and Sanitary Health № 1", Shevchenko District, Kyiv, Ukraine.

Archakova T. N., MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Pathomorphology, SI "Institute of pediatrics, obstetrics and gynaecology of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Надійшла до редакції / Received: 06.10.2017

Після доопрацювання / Revised: 02.03.2018

Прийнято до друку / Accepted: 12.03.2018

Список літератури

- [1] Динамика клинико-морфологических и микробиологических изменений при хроническом гастродуодените у детей / Н.Ю. Каныкова, Е.А. Жукова, Е.И. Шабунина и др. // Практическая медицина. – 2012. – №6(61). – С. 86–89.
- [2] Наказ МОЗ України «Про затвердження уніфікованих клінічних протоколів медичної допомоги дітям із захворюваннями органів травлення» від 29.01.2013 р. №59 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.moz.gov.ua>.
- [3] Марушко Ю.В. Особливості перебігу хронічного гастродуоденіту, морфологічних змін та стану гастропротекції у дітей на фоні дефіциту цинку / Ю.В. Марушко, А.О. Асонов, С.Г. Гчка // Здоровье ребенка. – 2014. – №4. – С. 7–12.
- [4] Нестеренко З.В. Дисплазия соединительной ткани – медико-социальный феномен XXI века / З.В. Нестеренко // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2012. – №1(5). – С. 17–23.
- [5] Гастроинтестинальный барьер: структурные и молекулярные детерминанты в норме и при ulcerogenezе / Э.Ф. Баринов, П.Г. Кондратенко, О.Н. Сулаева и др. // Украинский журнал хирургии. – 2013. – №4. – С. 96–104.
- [6] Состояние коллагеновых волокон в слизистой желудка у школьников с заболеваниями гастродуоденальной зоны в популяциях Сибири / Т.В. Поливанова, А.С. Пуликов, В.А. Вшивков, Н.Г. Муравьева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – №9(2). – С. 82–85.
- [7] Collagen peptides ameliorate intestinal epithelial barrier dysfunction in immunostimulatory Caco-2 cell monolayers via enhancing tight junctions / Q. Chen, O. Chen, I. Martins et al. // Food & function. – 2017. – Vol. 8. – №3. – P. 1144–11513.
- [8] Муквич Е.Н. Состояние мукоцеллюлярного барьера желудочно-кишечного тракта у детей с дисплазией соединительной ткани / Е.Н. Муквич, О.В. Лавренчук // Вопросы организации и информатизации здравоохранения: материалы III Евразийского конгресса ревматологов (Приложение). – 2016. – №5. – С. 234–237.
- [9] Аббакумова Л.Н. Клинические формы дисплазии соединительной ткани у детей: учебное пособие / Л.Н. Аббакумова. – СПб.: СПб-ГПМА, 2006. – С. 47.
- [10] Нечаева Г.И. Дисплазия соединительной ткани: основные гастроэнтерологические проявления / Г.И. Нечаева, Е.А. Лялюкова, М.Ю. Рожкова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – №6. – С. 66–69.
- [11] Особенности гастроинтестинальных поражений при пищевой аллергии у детей дошкольного возраста. / Н.Е. Сазанова, Е.И. Шабунина, Н.Ю. Широкова, Н.М. Хохлова // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 24. – №4(1). – С. 24–27.
- [12] Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
- [29, 2013 №59]. Retrieved from <http://www.moz.gov.ua>. [in Ukrainian].
- [3] Marushko, Yu. V., Asonov, A. O., & Gichka, S. G. (2014) Osoblyvosti perebihu khronichnoho hastrroduodenuitu, morfolohichnykh zmin ta stanu hastrprotekttsii u ditei na foni defitsytu tsynku [Features of clinical course of chronic gastroduodenitis, morphological changes and gastroprotection state in children with zinc deficiency]. *Zdorov'e rebenka*, 4, 7–12. [in Ukrainian].
- [4] Nesterenko, Z. V. (2012) Displaziya soedinitel'noj tkani – mediko-social'nyj fenomen XXI veka [Connective tissue dysplasia – medical and social phenomenon of the XXI century]. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik*, 1(5), 17–23. [in Russian].
- [5] Barinov, E. F., Kondratenko, P. G., Sulaeva, O. N., Zharikov, S. O., & Delyi, V. Yu. (2013). Gastrointestinalnyj barjer: strukturnye i molekuliarnye determinanty v norme i pri ultserogenezе [Gastrointestinal barrier — structural and molecular determinants under physiological conditions and in ulcerogenesis]. *Ukrainskiy zhurnal khirurgii*, 4, 96–104. [in Russian].
- [6] Polivanova, T. V., Pulikov, A. S., Vshivkov, V. A., & Muraviyova, N. G. (2014) Sostoyanie kollagenovykh volokon v slizistoy zheludka u shkol'nikov s zabolevaniyami gastrroduodenal'noj zony v populyaciyakh Sibiri [Tate of collagen fibers in stomach mucosa in schoolchildren with gastrroduodenal diseases in Siberial populations]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovanij*, 9(2), 82–85. [in Russian].
- [7] Chen, Q., Chen, O., Martins, I., Hou, H., Zhao, X., Blumberg, J., & Li, B. (2017) Collagen peptides ameliorate intestinal epithelial barrier dysfunction in immunostimulatory Caco-2 cell monolayers via enhancing tight junctions *Food & function*, 8(3), 1144–1151. doi: 10.1039/c6fo01347c.
- [8] Mukvich, E. N., & Lavrenchuk, O. V. (2016). Sostoyanie mukocelulyarnogo bar'era zheludочно-kishechnogo trakta u detej s displaziej soedinitel'noj tkani [State of the mucosal cellular barrier of the gastrointestinal tract in children with connective tissue dysplasia]. *Voprosy organizacii i informatizacii zdavokhraneniya*. Proceedings of the 3rd Eurasian Congress of Rheumatologists, 5, 234–237. [in Russian].
- [9] Abbakumova, L. N. (2006). *Klinicheskie formy displazii soedinitel'noj tkani u detej [Clinical forms of connective tissue dysplasia in children]*. Saint Petersburg. [in Russian].
- [10] Nechaeva, G. I., Lyalyukova, E. A., & Rozhkova, M. Yu (2010) Displaziya soedinitel'noj tkani: osnovnye gastro'nterologicheskie proyavleniya [Connective tissue dysplasia: major gastroenterological manifestations]. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya ghastr'o'nterologiya*, 6, 66–69. [in Russian].
- [11] Sazanova, N. Ye., Shabounina, Ye. I., Galova, Ye. A., & Khokhlova, N. M. (2009) Osobennosti gastrointertinal'nykh porazhenij pri pishchevoj allergii u detej doshkol'noho vozrasta [Feature of gastrointestinal disorders in nutritional allergy in preschool children] *Sibirskij medicinskij zhurnal*, 24, 4(1), 24–27. [in Russian].
- [12] Glanz, S. (1998) *Mediko-biologicheskaya statistika [Medical and biological statistics]*. Moscow: Praktika. [in Russian].

References

- [1] Kankova, N. U., Zhukova, E. A., Shabunina, E. I., Vidmanova, T. A., Mayanskaya, I. W., & Shirokova, N. U. (2012) Dinamika kliniko-morfologicheskikh i mikrobiologicheskikh izminenij pri khronicheskom gastrroduodenuite u detej [Clinical, morphological and microbiological changes and their dynamics of chronic gastroduodenitis in children]. *Prakticheskaya medicina*, 6(61), 86–89. [in Russian].
- [2] *Nakaz MOZ Ukrainy «Pro zatverzhennia unifikovanykh protokoliv medychnoi dopomohy ditiam iz zakhvoriuvanniamy orhaniv travlenniia» vid 29.01.2013 №59 [Ministry of Health Defining unified protocols of medical assistance to children with digestive system diseases from January*

The course of bronchial asthma associated with metabolic syndrome in children with different phenotypes depending on vitamin D₃ level

T. L. Protsiuk¹, Ye. V. Herasymova¹, L. O. Protsiuk¹, N. M. Surkova²

¹National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine, ²Vinnytsia Regional Children's Clinical Hospital, Ukraine

Key words:

asthma, metabolic syndrome, children, vitamin D₃.

Pathologia

2018; 15 (1), 68–72

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.129321

E-mail:

rossata@ukr.net

Objective: to establish specific features of BA course in children with various phenotypes on the background of metabolic syndrome, depending on serum vitamin D₃ level.

Subjects and methods. 106 children with BA participated in the study. 42 patients had BA associated with metabolic syndrome (MS), and 64 had BA with no MS. By the phenotype 61 (57.5 %) of patients had allergen-induced (allergic) asthma and 45 (42.5 %) – virus-induced (non-allergic) BA. The control group consisted of 44 children (the patients with MS and those without MS and BA), average age 15.5 ± 1.3 years. All the patients underwent a unified complex of diagnostic investigations: general physical examination, measurement of waist circumference and body mass index (BMI), clinical blood test, spirometry, lipid profile. Weight categories (normal weight, excess weight and obesity) were determined by percentiles (P) of BMI variation series with regard to age, as indicated in WHO recommendations. Serum 25(OH)D levels were determined by enzyme immunoassay. Vitamin D level ≥20 ng/ml was considered sufficient, 11–20 ng/ml – insufficient, ≤10 ng/ml – deficient. General and specific serum IgE levels were determined by enzyme immunoassay. The data obtained were processed with Statistica 8 program, P values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results. In the group of patients with vitamin D₃ level below 20 ng/ml, 19.5 % had controlled BA and 41.3 % – uncontrolled BA, while among the children with vitamin D₃ level over 20 ng/ml, 30.4 % had controlled BA and 8.6 % – uncontrolled BA ($\chi^2 = 9.12$, $P < 0.05$). Mean value of vitamin D₃ concentration in the control group was significantly higher than in the patients with BA associated with MS and BA without MS ($P < 0.05$). The relationship between OW, obesity and atopy was confirmed by high serum level of sIgE antibodies in those weight categories. High sIgE levels to allergens from the pollen of meadow grass, weeds and trees, animal epithelium, household dust mite, food and fungal allergens were determined much more frequently in the children with OW and obesity than in those with NW. In the patients with BA associated with MS and vitamin D₃ level below 20 ng/ml, FEV1 and FVLC values appeared to be significantly lower as compared to those with vitamin D₃ level over 20 ng/ml ($P = 0.002$). Inverse relationship between the most important parameters of external respiration function and BMI was established: VLC ($r_{xy} = -0.45$, $P = 0.002$), FVLC ($r_{xy} = -0.52$, $P = 0.001$), FEV1 ($r_{xy} = -0.78$, $P = 0.001$), respectively.

Conclusions. The severity of BA as well as the degree of its control in the patients with different phenotypes was found to be influenced by both the presence of MS and vitamin D₃ level. Therefore, vitamin D deficiency can be one of the risk factors of BA and MS development, and can affect the severity of both BA and MS course. Vitamin D₃ deficiency and the presence of MS greatly influence FEV1, FVLC, PEF values, decreasing the indices of external respiration in children and leading to more severe obstruction.

Ключові слова:

бронхіальна астма, метаболічний синдром, діти, вітамін D₃.

Патологія. – 2018. –

Т. 15, № 1(42). – С. 68–72

Особливості перебігу бронхіальної астми на тлі метаболічного синдрому в дітей із різними фенотипами залежно від показників вітаміну D₃

Т. Л. Процюк, О. В. Герасимова, Л. О. Процюк, Н. М. Суркова

Мета роботи – встановити особливості перебігу бронхіальної астми (БА) у дітей із різними фенотипами на тлі метаболічного синдрому залежно від рівня вітаміну D₃ в сироватці крові.

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь 106 дітей, хворих на БА: 42 дитини з діагнозом БА в поєднанні з метаболічним синдромом (МС), 64 дитини з БА без МС. Алерген-індукований фенотип встановили у 57,5 % хворих на БА, вірус-індукований – у 42,5 %. Група контролю – 44 дитини (пацієнти з МС і без МС і БА), середній вік – 15,5 ± 1,3 року. Всім хворим виконали єдиний комплекс діагностичних досліджень: загальне фізикальне обстеження, визначення об'єму талії та індексу маси тіла (ІМТ), аналіз крові клінічний, спірометрія, визначення ліпідного спектра. Вагові категорії (нормальна, надмірна вага та ожиріння) визначали за перцентилями (P) варіаційного ряду ІМТ з урахуванням віку відповідно до рекомендацій ВООЗ. Рівні 25-(ОН)D у сироватці крові визначили за допомогою імуноферментного аналізу. Рівень вітаміну D₃ ≥20 нг/мл розцінювали як достатній, 11–20 нг/мл – недостатній, ≤10 нг/мл – дефіцит. Загальний і специфічні рівні сироваткових ІgЕ визначили за допомогою ІФА. Результати опрацювали в програмі Statistica 8, статистично вірогідними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

Результати. У групі хворих із рівнем вітаміну D₃ нижче ніж 20 нг/мл пацієнти з контрольованим перебігом БА становили 19,5 %, а з неконтрольованим – 41,3 %; серед хворих із рівнем вітаміну D₃ понад 20 нг/мл контрольований перебіг БА встановили у 30,4 % пацієнтів, неконтрольований – у 8,6 % ($\chi^2 = 9,12$, $p < 0,05$). Середній показник концентрації вітаміну D₃ в контрольній групі був вірогідно вищим, ніж у групах хворих на БА в поєднанні з МС і БА без МС ($p < 0,05$). У дітей із надмірною масою тіла та ожирінням значно частіше, ніж у дітей із нормальною вагою, визначали високі рівні sIgE до алергенів із пилку лучних трав, бур'янів і дерев, епітелію тварин, кліщів побутового пилу, харчових і грибкових алергенів. У хворих на БА в поєднанні з МС і показниками рівня вітаміну D₃ нижче ніж 20 нг/мл, показники ОФВ₁ і ФЖЄЛ виявилися вірогідно нижчими порівняно з пацієнтами з рівнем вітаміну D₃ понад 20 нг/мл ($p = 0,002$). Встановили зворотний взаємозв'язок найбільш значущих параметрів функції зовнішнього дихання з ІМТ: ЖЄЛ ($r_{xy} = -0,45$, $p = 0,002$), ФЖЄЛ ($r_{xy} = -0,52$, $p = 0,001$), ОФВ₁ ($r_{xy} = -0,78$, $p = 0,001$) відповідно.

Висновки. Важкість і контрольованість перебігу БА у хворих із різними фенотипами залежить як від наявності МС, так і від рівня вітаміну D₃, дефіцит вітаміну D₃, відповідно, може бути одним із факторів ризику розвитку БА і МС, а також впливати на тяжкість перебігу БА і МС. Дефіцит вітаміну D₃ і наявність МС суттєво впливають на показники ОФВ₁, ФЖЕЛ, ПШВ, знижуючи показники зовнішнього дихання в дітей, призводять до більш виражених обструктивних змін.

Особенности течения бронхиальной астмы на фоне метаболического синдрома у детей с различными фенотипами в зависимости от показателей витамина D₃

Т. Л. Процюк, Е. В. Герасимова, Л. А. Процюк, Н. М. Суркова

Цель работы – установить особенности течения бронхиальной астмы (БА) у детей с различными фенотипами на фоне метаболического синдрома в зависимости от уровня витамина D₃ в сыворотке крови.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 106 детей, больных БА: 42 ребенка с диагнозом БА в сочетании с метаболическим синдромом (МС), 64 ребенка с БА без МС. Аллерген-индуцированный фенотип установлен у 57,5 % больных, вирус-индуцированный – у 42,5 %. Группа контроля состояла из 44 детей (пациенты с МС и без МС и БА), средний возраст – 15,5 ± 1,3 года. Всем больным проведен единый комплекс диагностических исследований: общее физикальное обследование, установление окружности талии и индекса массы тела (ИМТ), клинический анализ крови, спирометрия, определение липидного спектра. Весовые категории (нормальная, избыточный вес и ожирение) определяли по перцентили (P) вариационного ряда ИМТ с учетом возраста в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Уровни 25-(ОН)D₃ в сыворотке крови, показатели общего и специфических уровней сывороточных IgE определяли с помощью ИФА. Уровень витамина D₃ ≥20 нг/мл расценивали как достаточный, 11–20 нг/мл – недостаточный, ≤10 нг/мл – дефицит. Результаты обработали в программе Statistica 8, статистически достоверными считали различия при p < 0,05.

Результаты. В группе детей с уровнем витамина D₃ ниже 20 нг/мл больные с контролируемым течением БА составили 19,5 %, с неконтролируемым – 41,3 %; среди больных с уровнем витамина D₃ более 20 нг/мл контролируемое течение БА установлено у 30,4% пациентов, неконтролируемое – у 8,6 % ($\chi^2 = 9,12$, p < 0,05). Средний показатель концентрации витамина D₃ в контрольной группе достоверно выше, чем в группах больных БА в сочетании с МС и БА без МС (p < 0,05). У детей с избыточной массой тела и ожирением значительно чаще, чем у детей с нормальным весом определены высокие уровни sIgE к аллергенам из пыльцы луговых трав, сорняков и деревьев, эпителия животных, клещей бытовой пыли, пищевым и грибковым аллергенам. У больных БА в сочетании с МС и показателями уровня витамина D₃ ниже 20 нг/мл показатели ОФВ₁ и ФЖЕЛ оказались достоверно ниже по сравнению с больными с уровнем витамина D₃ более 20 нг/мл (p = 0,002). Установлена обратная взаимосвязь наиболее значимых параметров функции внешнего дыхания с избыточной массой тела: ЖЕЛ ($r_{xy} = -0,45$, p = 0,002), ФЖЕЛ ($r_{xy} = -0,52$, p = 0,001), ОФВ₁ ($r_{xy} = -0,78$, p = 0,001).

Выводы. Тяжесть и контролируемость БА у больных с различными фенотипами зависит как от наличия МС, так и от уровня витамина D₃, дефицит витамина D₃, соответственно, может выступать одним из факторов риска развития БА и МС, а также влиять на тяжесть течения БА и МС. Дефицит витамина D₃ и наличие МС существенно влияют на показатели ОФВ₁, ФЖЕЛ, ПСВ, снижая показатели внешнего дыхания у детей, приводят к более выраженным обструктивным изменениям.

Ключевые слова:
бронхиальная астма, метаболический синдром, дети, витамин D₃.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 68–72

Bronchial asthma (BA) is currently the most prevalent chronic disease in pediatric patients. For more than a century, clinicians have attempted to subdivide asthma into different phenotypes based on triggers that cause asthma attacks, the course of the disease, or the prognosis. Asthma is a heterogenous disorder that can be classified into several different phenotypes. The first phenotypes that were described included allergic asthma, nonallergic asthma or infectious asthma, and aspirin-exacerbated asthma. Asthma phenotypes were initially focused on combinations of clinical characteristics [1].

Allergic asthma is the most common asthma phenotype. Allergen-induced (allergic asthma): this is the asthma phenotype, which often commences in childhood and is associated with a past and/or family history of allergic disease such as eczema, allergic rhinitis, or food or drug allergy. The average age of onset of allergic asthma is younger than that of nonallergic asthma. Although the spectrum of allergic asthma may vary from mild to severe, studies have reported that allergic versus nonallergic asthma is less severe. Total IgE levels usually are higher in allergic versus nonallergic asthma, but levels substantially overlap between the 2 groups. Virus-induced (non-allergic) asthma: this is the asthma phenotype which

is not associated with allergy. Virus-induced asthma is a phenotype which is characterized by a sudden onset and sometimes a severe clinical course. Each viral infection may alter the course of preexisting asthma, or can affect the immune system and subsequently modify the susceptibility to allergen sensitization and asthma in childhood.

Recent cluster analyses have identified an "obese-asthma" phenotype which is characterized by late onset and lack of atopy. In addition, obesity among early-onset asthmatics clearly exists and heightens the clinical presentation. Observational studies have demonstrated that asthma among the obese has a clinical presentation that is more severe, harder to control, and is not as responsive to standard controller therapies [2].

Along with such classic risk factors for BA development as sex, age, family allergic anamnesis, atopy manifestations, eosinophilia, increased body mass index (BMI), there are several factors which can influence the severity of BA, vitamin D₃ deficiency being one of them. The study of potential effect of vitamin D₃ deficiency on BA course is of great significance because of its ability to influence the cellular and humoral immunity, thus decreasing the inflammatory process [3], as well as due to the predisposition to frequent respiratory diseases in

case of its deficiency. This mechanism is caused by gene expression and cytokine synthesis. A great number of scientific studies demonstrate the relationship between vitamin D₃ level and frequency and severity of viral, bacterial and fungal infection course. Besides, negative correlation was found between infectious process activity, the number of complications and vitamin D₃ level. The major mechanism of vitamin D₃ anti-infectious action is its ability to induce the formation of β -defensin-2 and cathelicidin in macrophages, neutrophils, natural killers (NK-cells) and epithelial cells, destroying microorganisms and being active to bacteria, viruses and fungi. Sufficient level of 25(OH)D₃ supply is associated with increased number of circulating Th1-cells which induce the secretion of anti-inflammatory cytokines (γ -interferon, IL-2, IL-12, TNF- α), while decreased serum 25(OH)D₃ level is followed by activation of Th2-immune response, i.e. by the increase in IL-4, IL-5, IL-13 populations, promoting atopic reactivity of the body. Besides, overweight and obesity were recently found to be caused by low vitamin D₃ level [4], in part, due to high similarity of calcitriol and vitamin D₃ receptor. Vitamin D₃ receptors and vitamin D metabolic enzymes were found in many cells: T- and B-lymphocytes, macrophages, including lung alveolocytes and bronchial smooth muscles [5]. Asthma-related morbidity is higher among children with vitamin D₃ deficiency and obesity, morbidities that frequently co-exist among minority children. However, the effect of co-existent obesity and vitamin D₃ deficiency on pulmonary function is poorly understood [6].

Though many reports on the problem discussed have already been published, the molecular mechanisms of non-classic action of vitamin D₃ are still unstudied. This can be explained by insufficient number of randomized studies to assess the impact of vitamin D₃ on metabolic processes and BA course.

Objective

To establish specific features of BA course in children with various phenotypes on the background of metabolic syndrome, depending on serum vitamin D₃ level.

Materials and methods

106 children with BA (age – 15.8 \pm 1.8 years, BMI = 10.2 \pm 0.57 kg/m²) participated in the study. By the phenotype 61 (57,5%) of patients had allergen-induced (allergic) asthma and 45 (42,5 %) – virus-induced (non-allergic) BA. 42 patients had BA associated with metabolic syndrome (MS), and 64 had BA with no MS. The control group consisted of 44 children (the patients with MS and those without MS and BA), average age 15.5 \pm 1.3 years. BA severity, the phenotype, the level of BA control were evaluated by GINA 2011 criteria and “Protocol of diagnosis and treatment of bronchial asthma in children”, approved by the Order of the Ministry of Health of Ukraine of October 8, 2013”.

All the patients underwent a unified complex of diagnostic investigations: general physical examination, measurement of waist circumference and body mass index (BMI), clinical blood test, spirometry, lipid profile. Weight categories (normal weight, excess weight and obesity)

were determined by percentiles (P) of BMI variation series with regard to age, as indicated in WHO recommendations (“Classification of BMI in children and adolescents”). In accordance with this classification, the children with BMI corresponding to P5 of variation series, were referred to under-normal weight category; those with BMI corresponding to P5-P84 – to normal weight group; P85-P94 – to excess weight group, and over P94 – to obesity group. Serum 25(OH)D₃ levels were determined by enzyme immunoassay. Blood sampling was done in winter period. In accordance with the recommendations of the US Institute of Medicine, vitamin D₃ level \geq 20 ng/ml was considered sufficient, 11–20 ng/ml – insufficient, \leq 10 ng/ml – deficient. General and specific serum IgE levels were determined by enzyme immunoassay. All the analysis were done from 9 to 11 a.m.

Statistical data processing was done with Statistical package for Windows v. 8.0 (№ AXXR910A374605FA) using parametric methods. The normal distribution was evaluated according to Shapiro–Wilk test. Digital information of all clinical investigations was processed by variance statistical method calculating the mean value (M) and its error (m). The comparison of quality indicators was performed using the χ^2 criterion. The conjugacy coefficient (ϕ) was determined to estimate the strength of the relationship between the features. Odds ratios (OR) and the corresponding 95 % confidence intervals (CI) were used to compare the quantitative indices of the two characteristics. The significance of difference between two means was calculated by Student’s t-test (t). Correlation analysis with calculation of Pearson’s correlation (r_{xy}) was used to establish the relationship between the studied indices. Differences were considered significant if significance value was 95 % (P < 0.05).

Results and discussion

Intermittent, mild, moderate and severe BA were diagnosed in 13 %, 39 %, 39 % and 9 % of patients, respectively, by physical and instrumental examination. By etiology 39 % of patients had allergic, 26 % – mixed and 35 % – non-allergic BA. In 50 % of patients BA was controlled and in 50 % – uncontrolled. All the patients were divided into three weight categories by BMI: those with normal weight (NW) – 34.1 %, overweight (OW) – 34.6 % and obesity – 31.3 % of children.

Having grouped all the children according to their weight and age, we found an increased number of children with obesity in pubertal age (OR = 3.6; 95 % CI: 1.14–11.35; P = 0.003; OR = 9.0; 95 % CI: 1.56–51.87; P = 0.008 and OR = 3.71; 95 % CI: 1.06–12.98; P = 0.04, respectively). And the number of obese children decreased together with the increase of age (OR = 0.28; 95 % CI: 0.09–0.88; P = 0.003; OR = 0.11; 95 % CI: 0.02–0.63; P = 0.008; OR = 0.27; 95 % CI: 0.08–0.94; P = 0.04, respectively). No relationship between obesity and sex in BA children were found, but a tendency to increased obesity in males as compared to females (P = 0.059) was observed. Besides, the relationship between body weight and clinical manifestations of allergy was found. Among the children suffering from atopic BA, 37.4 % had excess weight, 34.3 % – obesity, 28.3 % – normal weight, while

among those with mixed BA overweight was found in 25 %, obesity – in 20.8 %, and normal weight – in 54.2 % of patients. More than a half of the patients with non-atopic BA (58.7 %) had normal body weight. The children with atopic BA were found to have overweight (OR = 2.86; 95 % CI: 1.31–6.25; $P = 0.005$) and obesity (OR = 3.15; 95 % CI: 1.38–7.20 $P = 0.007$) significantly more often as compared to the patients with non-atopic BA.

In the group of patients with BA associated with MS as well as those with BA with no MS there were 32 % of children with vitamin D₃ deficiency, 42 % – with vitamin D₃ insufficiency, and 26 % – with sufficient level of Vitamin D₃. In the control group there were 33 % of patients with vitamin D₃ deficiency, 9 % – with vitamin D₃ insufficiency, and 58 % – with sufficient vitamin D₃ level. Vitamin D₃ level was largely influenced by the severity of BA. It was 19.8 ± 5.0 ng/ml in intermittent, 17.3 ± 5.9 ng/ml – in mild; 14.9 ± 4.2 ng/ml – in moderate; 12.8 ± 4.6 ng/ml – in severe BA; $P < 0.05$.

The level of BA control and comorbidity were influenced by the level of vitamin D₃ as well. In the group of patients with BA associated with MS as well as in those with BA and no MS vitamin D₃ level was significantly lower in the children with uncontrolled BA ($P = 0.005$). It was 18.9 ± 4.9 ng/ml in the group of patients with controlled BA and 12.6 ± 2.7 ng/ml – in those with uncontrolled BA ($t = 3.2$, $P = 0.005$).

The patients with vitamin D₃ deficiency were found to have uncontrolled BA four times as often as the children with normal levels of vitamin D₃. In the group of patients with vitamin D₃ level below 20 ng/ml, 19.5 % had controlled BA and 41.3 % – uncontrolled BA, while among the children with vitamin D₃ level over 20 ng/ml, 30.4 % had controlled BA and 8.6 % – uncontrolled BA ($\chi^2 = 9.12$, $P < 0.05$). Mean value of vitamin D₃ concentration in the control group was significantly higher than in the patients with BA associated with MS and BA without MS ($P < 0.05$). BMI in the patients with vitamin D₃ level below 20 ng/ml was found to be significantly higher than among the children with vitamin D₃ level over 20 ng/ml. Mean value of BMI in the patients with vitamin D₃ level below 20 ng/ml was 32.8 ± 3.4 while among the children with vitamin D₃ level over 20 ng/ml it was 29.01 ± 5.1 ($t = 2.49$, $P = 0.01$), respectively. E. Forno, J. C. Celedón [7] found it was obesity increases the risk of asthma – and worsens asthma severity or control – via multiple mechanisms. “Obese asthma” is a complex, multifactorial phenotype in children.

Significant increase in triglycerides and cholesterol levels was revealed in the patients with BA together with the decrease of vitamin D₃ level ($P < 0.05$). There was negative correlation between the level of low density lipoproteins and vitamin D₃ level ($r_{xy} = -0.58$, $P = 0.008$), while the level of high density lipoproteins increased together with the increase of vitamin D₃ level ($P = 0.06$). No statistically significant differences between the levels of vitamin D₃ and total IgE were found ($P > 0.05$). Having analyzed immunologic indices, high level of total IgE was revealed practically in all the children with allergic and mixed BA, ranging from 300 to 600 IU/ml, and reaching 1500–2000 IU/ml in some patients. Statistical analysis showed obese children to have higher total IgE level (2.7; 95 % CI: 2.64–2.84) as compared to those with

OW (2.46; 95 % CI: 2.40–2.60) and NW (2.37; 95 % CI: 2.30–2.50). Study of the relationship between IgE level and body weight demonstrated that the children with OW not always had high total IgE level (OR = 1.86; 95 % CI: 0.70–5.09, $P = 0.21$) as compared to the children with NW, while obese children appeared to have higher total IgE level (OR = 4.20; 95 % CI: 1.13–15.60, $P = 0.02$) than those with normal weight. With high probability ($P = 0.02$) of correlation ($\chi^2 = 4.56$) between body weight and total IgE level, strong degree of this association ($\phi = 0.59$) was found as well. The relationship between OW, obesity and atopy was confirmed by high serum level of sIgE antibodies in those weight categories. High sIgE levels to allergens from the pollen of meadow grass, weeds and trees, animal epithelium, household dust mite, food and fungal allergens were determined much more frequently in the children with OW and obesity than in those with NW. The proportion of patients with NW, OW and obesity having sIgE to meadow grass pollen was 51.7 %, 60.2 % and 84.9 % respectively; to weeds – 50.3 %, 78.6 %, 85.7 %, respectively; to trees – 25.8 %, 43.7 %, 70.8 %, respectively; to epidermal allergens – 56.5 %, 72.8 %, 82.3 %, respectively; and to food allergens – 50.6 %, 55.7 %, 59.8 %, respectively. Besides, obesity in BA children was associated with sensitization to considerably greater number of allergens, namely: to allergens from the pollen of meadow grass (OR = 6.10; 95 % CI: 1.78–3.57; $P = 0.0001$), weeds (OR = 5.0; 95 % CI: 1.43–8.53; $P = 0.006$), trees (OR = 4.56; 95 % CI: 1.72–10.0; $P = 0.004$), animal epithelium allergens (OR = 4.58; 95 % CI: 1.34–7.25; $P = 0.003$), food (OR = 4.00; 95 % CI: 1.02–6.86; $P = 0.004$), household dust mite allergens (OR = 3.68; 95 % CI: 1.18–7.08; $P = 0.001$) and fungus (OR = 2.15; 95 % CI: 1.39–5.39; $P = 0.002$).

Significant decrease of forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) and forced vital lung capacity (FVLC), peak expiratory flow rate (PEF) were detected in BA patients as compared to normal values ($P = 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). FEV₁ decrease by 0.49 % (95 % CI: 0.69–0.15), FVLC – by 0.38 % (95 % CI: 0.56–0.14), and PEF – by 0.42 % (95 % CI: 0.42–0.17) with every unit of BMI increase were revealed in the patients with BA associated with MS. Besides, significant decrease of FEV₁ values was demonstrated to be influenced by vitamin D₃ level. In the patients with BA associated with MS and vitamin D₃ level below 20 ng/ml, FEV₁ and FVLC values appeared to be significantly lower as compared to those with vitamin D₃ level over 20 ng/ml ($P = 0.002$). Mean value of vitamin D₃ concentration in the control group was significantly higher than in the patients with BA associated with MS and BA without MS ($P = 0.003$). Inverse relationship between the most important parameters of external respiration function and BMI was established: VLC ($r_{xy} = -0.45$, $P = 0.002$), FVLC ($r_{xy} = -0.52$, $P = 0.001$), FEV₁ ($r_{xy} = -0.78$, $P = 0.001$), respectively.

L. A. Lautenbacher et al. [6] found that vitamin D₃ deficiency was associated with pulmonary function deficits among obese children, but not among normal-weight children with asthma, an association that was independent of Th1 and Th2 serum inflammatory measures. Vitamin D₃ deficiency may be one potential mechanism underlying the obese-asthma phenotype.

Conclusions

1. The severity of BA as well as the degree of its control in the patients with different phenotypes was found to be influenced by both the presence of MS and vitamin D₃ level. Therefore, vitamin D₃ deficiency can be one of the risk factors of BA and MS development, and can affect the severity of both BA and MS course.

2. Vitamin D₃ deficiency and the presence of MS greatly influence FEV₁, FVLC, PEF values, decreasing the indices of external respiration in children and leading to more severe obstruction.

The perspectives of further scientific research in this direction are to study the best ways of pharmacological therapy and rehabilitation in patients with BA.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Information about authors:

Protsiuk T. L., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Pediatrics № 1, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Herasymova O. V., MD, PhD, Assistant of the Department of Pediatrics №1, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Protsiuk L. O., MD, PhD, Assistant of the Department of Hygiene and Ecology, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Surkova N. M., Allergist, Vinnytsia Regional Children's Clinical Hospital, Ukraine.

Відомості про авторів:

Процюк Т. Л., д-р мед. наук, доцент каф. педіатрії № 1, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Герасимова О. В., канд. мед. наук, асистент каф. педіатрії № 1, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Процюк Л. О., канд. мед. наук, асистент каф. загальної гігієни та екології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

Суркова Н. М., лікар-алерголог, Вінницька обласна дитяча клінічна лікарня, Україна.

Сведения об авторах:

Процюк Т. Л., д-р мед. наук, доцент каф. педиатрии № 1, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Герасимова Е. В., канд. мед. наук, ассистент каф. педиатрии № 1, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Процюк Л. А., канд. мед. наук, ассистент каф. общей гигиены и экологии, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина.

Суркова Н. М., врач-аллерголог, Винницкая областная детская клиническая больница, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 14.12.2017

Після доопрацювання / Revised: 20.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 26.02.2018

References

- [1] Schatz, M., & Rosenwasser, L. (2014) The allergic asthma phenotype. *Allergy Clin Immunol Pract.*, 2(6), 645–8. doi: 10.1016/j.jaip.2014.09.004.
- [2] Farzan, S. (2013) The asthma phenotype in the obese: distinct or otherwise. *J. Allergy (Cairo)*, 2013, 602–908. doi: 10.1155/2013/602908.

- [3] Neyestani, T. R., Nikooyeh, B., Alavi-Majid, H., Shariatzadeh, N., Kalayi, A., Tayebinejad, N., et al. (2012) Improvement of vitamin D status via daily intake of fortified yogurt drink either with or without extra calcium ameliorates systemic inflammatory biomarkers, including adipokines, in the subjects with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97(6), 2005–2011. doi: 10.1210/jc.2011-3465.
- [4] Haines, S. T., & Park, S. K. (2012) Vitamin D supplementation: what's known, what to do, and what's needed. *Pharmacotherapy*, 32, 354–382. doi: 10.1002/phar.1037.
- [5] Guillot, X., Semerano, L., & Saldenber-Kermanac, N. (2010) Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine.*, 77, 552–557.
- [6] Lautenbacher, L. A., Jariwala, S. P., Markowitz, M. E., & Rastogi, D. (2016) Vitamin D and Pulmonary Function in Obese Asthmatic Children. *Pediatr Pulmonol*, 51(12), 1276–1283. doi: 10.1002/ppul.23485.
- [7] Forno, E., & Celedón, J. C. (2017) The effect of obesity, weight gain, and weight loss on asthma inception and control. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 17(2), 123–130. doi: 10.1097/ACI.0000000000000339.

Особливості структури та перебігу сучасної бойової травми у військовослужбовців Збройних Сил України

І. М. Гайда¹, М. І. Бадюк², Ю. І. Сушко¹

¹Військово-медичний клінічний центр Західного регіону, м. Львів, Україна, ²Українська військово-медична академія, м. Київ, Україна

Мета роботи – дослідити рівень і структуру бойових ушкоджень у військовослужбовців Збройних Сил України в умовах бойових дій.

Матеріали та методи. Наведені результати аналізу структури та характеру сучасної бойової травми у 954 військовослужбовців, учасників антитерористичної операції, які перебували на лікуванні у Військово-медичному клінічному центрі Західного регіону (ВМКЦ ЗР).

Результати. У більшості поранених – 583 (61 %) – стан на момент надходження на лікування у ВМКЦ ЗР оцінений як легкий. У тяжкому стані на лікування надійшли 94 (10 %) поранені. У 277 (29 %) поранених стан на момент надходження на лікування оцінили як середнього ступеня тяжкості. Найбільш тривалий термін лікування визначили в пацієнтів із важкими пораненнями – в середньому 36,6 доби. Тривалість лікування в пацієнтів із пораненням середнього ступеня тяжкості становила 21,8 доби. При пораненні легкого ступеня тривалість лікування дорівнювала 24,2 доби. Найбільшу частку серед поранень становлять поранення кінцівок – 52 % (496 поранених). Із загальної кількості пролікованих пацієнтів (954 особи) 6 (0,6%) осіб померли. Летальні наслідки зумовлені тяжкими пораненнями: мінно-вибухове поранення тяжкого ступеня (2 пацієнти), поєднане вогнепальне поранення (3 пацієнти), вогнепальне поранення голови (1 пацієнт). До військової служби після лікування повернулись 604 (63,3 %) пацієнти без зміни категорії придатності; 344 (36,1 %) пацієнти за станом здоров'я визнані непридатними до військової служби.

Висновки. У структурі поранень найбільшу питому вагу становлять поранення кінцівок – 52,0 %: верхніх – 41,2 %, нижніх – 58,8 %. Сучасна бойова травма потребує тривалого періоду лікування та реабілітації, який при тяжких пораненнях становить в середньому 36,6 доби. Лікування сучасної бойової травми не може бути відокремленим від реабілітаційних заходів. Тому лікування та реабілітація військовослужбовців є актуальним питанням, що постає нині не тільки перед військовою, але й цивільною медициною, службами соціального захисту.

Ключові слова: поранення, бойова травма, оцінювання важкості травми, реабілітація.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 73–76

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129329

E-mail: vmkczru@ukr.net

Особенности структуры и течения современной боевой травмы у военнослужащих Вооруженных Сил Украины

И. М. Гайда, М. И. Бадюк, Ю. И. Сушко

Цель работы – изучить уровень и структуру боевых повреждений у военнослужащих Вооруженных Сил Украины в условиях боевых действий.

Материалы и методы. Приведены результаты анализа структуры и характера современной боевой травмы у 954 военнослужащих, участников антитеррористической операции, находившихся на лечении в Военно-медицинском клиническом центре Западного региона (ВМКЦ ЗР).

Результаты. У большинства раненых – 583 (61 %) – состояние на момент поступления на лечение в ВМКЦ ЗР оценено как легкое. В тяжелом состоянии на лечение поступило 94 (10 %) раненых. У 277 (29 %) раненых состояние на момент поступления на лечение оценено как средней степени тяжести. Наиболее длительный срок лечения отмечен у пациентов с тяжелыми ранениями – в среднем 36,6 суток. Продолжительность лечения у пациентов с ранением средней степени тяжести составляла 21,8 суток. При ранении легкой степени продолжительность лечения составляла 24,2 суток. Установлено, что наибольшую долю среди ранений составляют ранения конечностей – 52 % (496 раненых). Из общего количества пациентов (954 человека) 6 (0,6%) умерли. Летальные исходы обусловлены тяжелыми ранениями: мінно-взрывное ранение тяжелой степени (2 пациента), сочетанное огнестрельное ранение (3 пациента), огнестрельное ранение головы (1 пациент). К военной службе после лечения возвращены 604 (63,3 %) пациента без изменения категории годности; 344 (36,1 %) пациента по состоянию здоровья признаны не годными к военной службе.

Выводы. В структуре ранений наибольший удельный вес составили ранения конечностей – 52,0 %: верхних – 41,2 %, нижних – 58,8 %. Современная боевая травма требует длительного периода лечения и реабилитации, который при тяжелых ранениях составляет в среднем 36,6 суток. Лечение современной боевой травмы не может быть отделено от реабилитационных мероприятий. Поэтому лечение и реабилитация военнослужащих является актуальным вопросом, который стоит сегодня не только перед военной, но и гражданской медициной и службами социальной защиты.

Ключевые слова: ранение, боевая травма, оценка тяжести травмы, реабилитация.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 73–76

Peculiarities of structure and current of modern combat trauma among servicemen of the Armed Forces of Ukraine

I. M. Gaida, M. I. Badyuk, Yu. I. Sushko

The aim. To investigate the level and structure of combat trauma among servicemen of the Armed Forces of Ukraine in conditions of military operations.

Key words: wounds, war-related injuries, injury severity score, rehabilitation.

Pathologia
2018; 15 (1), 73–76

Materials and methods. The results of the analysis of the structure and character of the modern combat trauma in 954 soldiers – participants of the anti-terrorist operation, who were treated in the Military Medical Clinical Center of the Western Region (MMCC of the WR), are presented.

Results. It was found that the largest proportion among the injuries is injury of extremities – 52 % (496 wounded). In most of the wounded – 583 (61 %) – the state at the time of admission to the MMCC of the WR was rated as of mild severity. 94 wounded (10 %) received treatment in severe condition. In 277 wounded (29 %) state at the time of admission was assessed as of average severity. The longest treatment period was observed in patients with severe injuries – it was 36.6 days on the average. Duration of treatment in patients with injury of moderate severity was 21.8 days. In case of mild injury the duration of treatment for patients was 24.2 days. 6 (0.6 %) patients of the total number of treated patients (954 persons) died. These lethal consequences were caused by serious injuries: a mine-explosive injury of a severe degree (2 patients), a combined gunshot wound (3 patients), a gunshot wound of the head (1 patient). 604 patients (63.3 %) returned to military service without treatment without changing the category of suitability; 344 (36.1 %) patients are considered unsuitable for military service.

Conclusions. Summarizing the results obtained, we can say that in the structure of wounds the greatest part was wound of extremities – 52 %. Among these the upper extremities were injured in 41.12 %, wounds of the lower extremities were 58.8 %. Modern combat trauma requires a long period of treatment and rehabilitation, which in the case of serious injuries is 36.6 days on the average. Treatment of modern combat trauma cannot be separated from rehabilitation measures. Therefore, treatment and rehabilitation of servicemen is a topical issue that today faces not only military but also civilian medicine and social protection services.

Сучасні бойові дії вирізняються низкою факторів, що зумовлюють характер санітарних втрат. До них належать висока динамічність бойових дій, відсутність чіткої лінії фронту, застосування сучасного озброєння та бойової техніки, тяжкість травми, хронічна стресова ситуація. Їхня взаємодія спричиняє поєднаність, комбінованість, поліорганистність патологічних змін, що мають місце під час поранення.

За свідченнями авторів [1,3,5], у структурі сучасної бойової травми питому вагу становлять тяжкі поєднані й множинні поранення. Порівняно з даними про збройні конфлікти останніх років щодо тяжкості поранень, кількість множинних і поєднаних поранень зростає, що пов'язано з удосконаленням зброї та зміною тактики ведення бойових дій [2,4,6].

Мета роботи

Дослідити рівень і структуру бойових ушкоджень у військовослужбовців Збройних сил України в умовах бойових дій.

Матеріали і методи дослідження

Виконали проспективний і ретроспективний аналіз структури та характеру бойової патології, а також результатів лікування поранених військовослужбовців, які надійшли до Військово-медичного клінічного центру Західного регіону в період з лютого 2014 року до серпня 2017 року. Проаналізували 954 клінічні випадки.

Результати та їх обговорення

Усі пацієнти, які перебували під спостереженням, отримали поранення в зоні проведення антитерористичної операції. Вік пацієнтів – від 19 до 61 року, середній вік – $31,4 \pm 1,3$ року. Характеристика поранених за віком наведена в таблиці 1.

Поділ поранень за локалізацією наведений в таблиці 2. Найбільшу частку серед поранень становлять поранення кінцівок – 52,0 % (496 поранених). Переважали поранення нижніх кінцівок – 30,6 % (292

пацієнти); поранення верхніх кінцівок становили 21,4 % (204 пацієнти).

Чималу частку у структурі поранень становлять поранення в голову – 16,8 % (160 пацієнтів) і вогнепальні поранення м'яких тканин множинних ділянок тіла – 14,8 % (141 пацієнт).

За локалізацією вогнепальні поранення інших ділянок структуровані так: грудна клітка – 4,4 % (42 пацієнти); живіт – 2,2 % (21 пацієнт); акубаротраума – 2,2 % (21 пацієнт); таз – 1,9 % (18 пацієнтів); око і орбіта – 1,8 % (17 пацієнтів); вогнепальні переломи численних ділянок – 1,4 % (13 пацієнтів); поранення шиї – 1,1 % (11 пацієнтів); термічна травма – 0,9 % (9 пацієнтів); рани при доліковуванні – 0,5 % (5 пацієнтів).

Дані щодо локалізації поранень відповідають відомостям наукової літератури й зумовлені механізмом отримання поранення, удосконаленням засобів індивідуального та колективного захисту [2,3].

Поділ поранених за ступенем тяжкості стану на момент надходження на лікування у ВМКЦ ЗР (за супровідними документами) наведений у таблиці 3.

У більшості поранених – 583 (61 %) – стан на момент надходження у ВМКЦ ЗР оцінений як легкий. У тяжкому стані на лікування надійшли 94 (10 %) поранені. У 277 (29 %) поранених стан на момент надходження оцінили як середнього ступеня тяжкості. Графічне зображення поділу поранених за тяжкістю стану наведено на рис. 1.

Як відомо, тяжкість стану пораненого залежить не тільки від тяжкості самого поранення, але й від часу до надходження до лікувального закладу. Після переоцінки стану тяжкості пацієнтів під час додаткових обстежень у 820 (86 %) із них діагностували легке поранення. У 123 (13 %) поранених визначили поранення середнього ступеня тяжкості; в 11 (1 %) поранених встановили тяжке поранення. Графічний аналіз поділу пацієнтів за тяжкістю поранення наведений на рис. 2.

Привертає увагу тривалий термін відновлення здоров'я військовослужбовців. Тривалість лікування незалежно від ступеня тяжкості поранення в усіх випадках перевищувала 3 тижні. Найтриваліший термін лікування визначили в пацієнтів із тяжкими поранен-

Таблиця 1. Демографічна характеристика поранених військовослужбовців

Вік поранених (роки)	Кількість поранених n (%)
Молодші ніж 20	16 (1,7 %)
20–30	482 (50,5 %)
31–40	319 (33,4 %)
41–50	122 (12,8 %)
51–60	14 (1,5 %)
Старші за 60	1 (0,1 %)
Загалом	954 (100 %)

Таблиця 2. Поділ пацієнтів за локалізацією поранення

Локалізація поранення	Кількість пацієнтів, n (%)
Верхні кінцівки	204 (21,4 %)
Нижні кінцівки	292 (30,6 %)
Грудна клітка	42 (4,4 %)
Живіт	21 (2,2 %)
Таз	18 (1,9 %)
Голова	160 (16,8 %)
Шия	11 (1,1 %)
Око і орбіта	17 (1,8 %)
Акубаротравма	21 (2,2 %)
Термічна травма	9 (0,9 %)
Вогнепальні переломи численних ділянок	13 (1,4 %)
Рани при долікуванні	5 (0,5 %)
Відкриті рани численних ділянок	141 (14,8 %)
Усього	954 (100 %)

Таблиця 3. Характеристика тяжкості стану поранених

Тяжкість стану поранених	Кількість поранених, n (%)
Легкий стан	583 (61 %)
Середнього ступеня тяжкості	277 (29 %)
Тяжкий стан	94 (10 %)
Усього	954 (100 %)

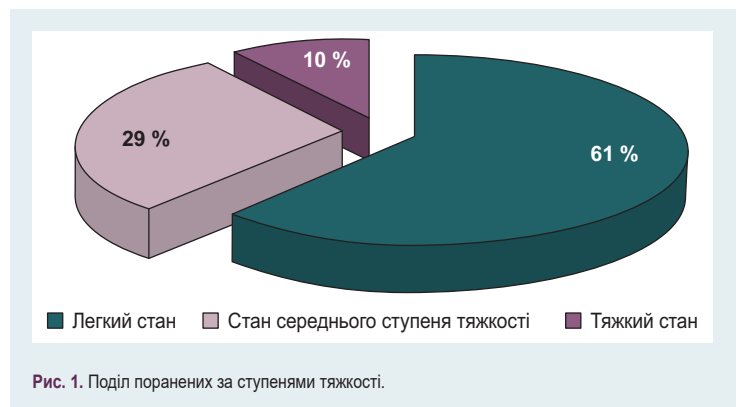
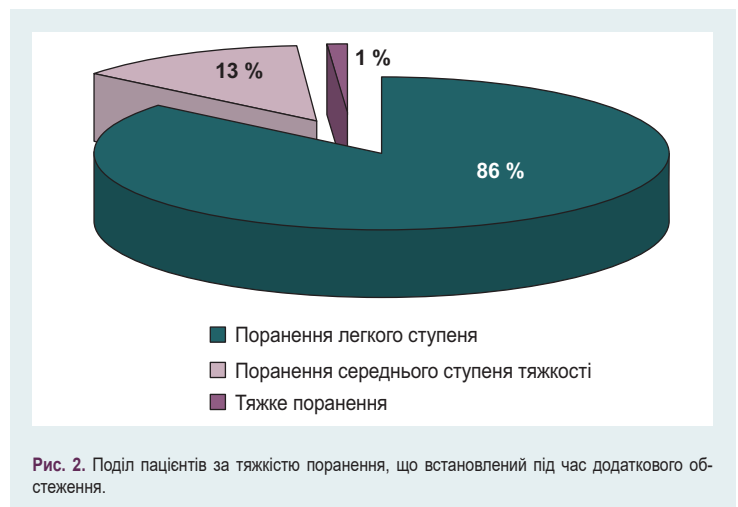
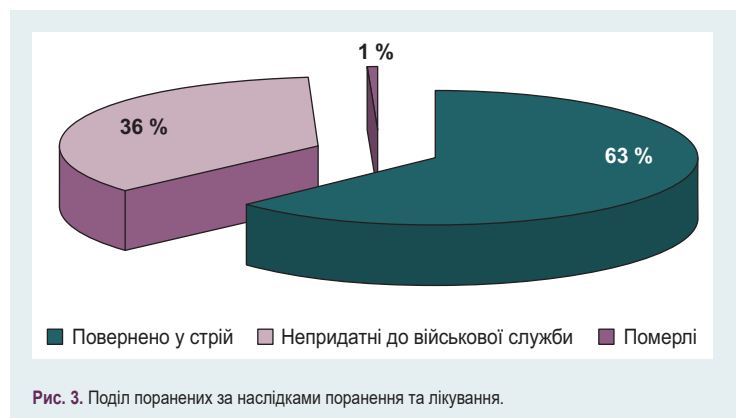
Таблиця 4. Тривалість лікування залежно від ступеня тяжкості поранення

Ступінь тяжкості поранення	Середня тривалість лікування
Тяжке поранення	36,6 доби
Поранення середнього ступеня тяжкості	21,8 доби
Легке поранення	24,2 доби

нями – в середньому 36,6 доби. Тривалість лікування пацієнтів із пораненням середнього ступеня тяжкості становила 21,8 доби. При пораненні легкого ступеня тривалість лікування дорівнювала 24,2 доби (табл. 4).

Коротший термін лікування пацієнтів із пораненнями середнього ступеня тяжкості порівняно з тривалістю лікування пацієнтів із легкими пораненнями зумовлений тим, що пацієнти з пораненнями середнього ступеня тяжкості перебували на лікуванні у профільному хірургічному відділенні до стабілізації стану, а потім отримували курс реабілітаційного лікування у відділенні відновлювального лікування.

Варто відзначити, що одночасно (паралельно) з хірургічним лікуванням бойової травми (поранення) на ранніх стадіях перебування пацієнтів розпочинались реабілітаційні заходи. Починаючи з моменту надхо-

**Рис. 1.** Поділ поранених за ступенями тяжкості.**Рис. 2.** Поділ пацієнтів за тяжкістю поранення, що встановлений під час додаткового обстеження.**Рис. 3.** Поділ поранених за наслідками поранення та лікування.

дження пораненого до ВМКЦ ЗР, вживали комплекс заходів, що поєднував медичну, психологічну, соціальну реабілітацію. Отже, лікувально-відновлювальний процес складався з двох основних частин: лікування та реабілітаційних заходів. Аналіз результатів наслідків поранення та лікування показав, що із загальної кількості поранених (954 особи) 6 (0,6%) пацієнтів померли. Летальні наслідки зумовлені тяжкими пораненнями: мінно-вибухове поранення тяжкого ступеня (2 пацієнти), поєднане вогнепальне поранення (3 пацієнти), вогнепальне поранення голови (1 пацієнт).

До військової служби після лікування повернулися 604 (63,3%) пацієнти без зміни категорії придатності; 344 (36,1%) пацієнти за станом здоров'я визнані не-

придатними до військової служби. Графічний аналіз наведений на *рис. 3*.

Висновки

1. Узагальнюючи результати, відзначимо, що суттєві зміни видів зброї та боеприпасів, котрі застосовуються під час локальних війн і збройних конфліктів, спричинили зміну структури бойової травми. У структурі поранень найбільшу питому вагу становлять поранення кінцівок – 52,0 %: поранення верхніх кінцівок – 41,2 %, поранення нижніх кінцівок – 58,8 %.

2. Сучасна бойова травма потребує тривалого періоду лікування та реабілітації, що при тяжких пораненнях становить в середньому 36,6 доби.

3. Лікування сучасної бойової травми не може бути відокремленим від реабілітаційних заходів. Тому лікування та реабілітація військовослужбовців є актуальним питанням, яке постає сьогодні не тільки перед військовою, але й цивільною медициною, службами соціального захисту.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні обсягу та характеру реабілітаційних заходів відповідно до характеру бойової патології.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Гайда І. М., начальник Військово-медичного клінічного центру Західного регіону, м. Львів, Україна.

Бадюк М. І., д-р мед. наук, професор, начальник каф. організації медичного забезпечення збройних сил Української військово-медичної академії, м. Київ, Україна.

Сушко Ю. І., канд. мед. наук, помічник начальника Військово-медичного клінічного центру Західного регіону, м. Львів, Україна.

Сведения об авторах:

Гайда И. М., начальник Военно-медицинского клинического центра Западного региона, г. Львов, Украина.

Бадюк М. И., д-р мед. наук, профессор, начальник каф. организации медицинского обеспечения вооруженных сил Украинской военно-медицинской академии, г. Киев, Украина.

Сушко Ю. И., канд. мед. наук, помощник начальника Военно-медицинского клинического центра Западного региона, г. Львов, Украина.

Information about authors:

Gaida I. M., Head of the Military Medical Clinical Center of the Western Region, Lviv.

Badyuk M. I., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Medical Support Organization of the Armed Forces of Ukrainian Military Medical Academy, Lviv.

Sushko Yu. I., MD, PhD, Assistant Chief of the Military Medical Clinical Center of the Western Region, Lviv.

Надійшла до редакції / Received: 25.01.2018

Після доопрацювання / Revised: 07.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 13.02.2018

Список літератури

[1] Оптимізація медичної допомоги і військових підрозділах і частинах тактичного рівня Збройних Сил України у сучасних умовах / М.І. Бадюк, І.К. Середя, О.О. Микита, Д.В. Ковида, Б.Б. Жупан // *Здоров'я нації*. – 2016. – №4/1(41). – С. 13–18.

[2] Білий В.Я. Еволюція поглядів та розвиток системи лікувально-евакуаційного забезпечення військ – уроки для Збройних Сил України / В.Я. Білий, А.В. Верба, В.О. Жаховський // *Медичне забезпечення антитерористичної операції: науково-організаційні та медико-соціальні аспекти: збірник наукових праць*. – К.: Пріоритети, 2016. – С. 60–76.

[3] Аналіз медико-санітарних наслідків військових дій під час проведення сучасних контртерористичних операцій / С.О. Гур'єв, П.В. Танасієнко, Н.В. Гуселетова, О.О. Мостипан // *Екстрена медицина від науки до практики*. – 2014. – №4. – С. 3–8.

[4] Король С.О. Організаційні, діагностичні та лікувальні аспекти надання допомоги при вогнепальних пораненнях стопи / С.О. Король // *Травма*. – 2015. – Т. 16. – №5. – С. 11–14.

[5] Майданюк В.П. Аналіз ефективності функціонування мобільних лікарсько-сестринських бригад ВМКЦ Південного регіону в АТО / В.П. Майданюк // *Матеріали науково-практичної конференції «Проблемні питання надання хірургічної допомоги пораненим в АТО»* (м. Київ, квітень 2015 р.). – К.: ГВКГ, 2015. – С. 10.

[6] Incidence of primary blast injury in US military overseas contingency operations: a retrospective study / A.E. Ritenour, L.H. Blackbourne, J.F. Kelly, et al. // *Ann Surg.* – 2010. – №251. – С. 1140–1144.

References

[1] Badiuk, M. I., Sereda, I. K., Mykyta, O. O., Kovyda, D. V., & Zhupan, B. B. (2016). *Optimizatsiia medychnoi dopomohy i viiskovykh pidrozdilakh i chastynakh taktynohnoho rinvnia Zbroinykh Syl Ukrainy u sushasnykh umovakh* [Optimization of medical care in military units and tactical level units of the Armed Forces of Ukraine in modern conditions]. *Ukraina. Zdorovia natsii*, 4/1(41), 13–18. [in Ukrainian].

[2] Bilyi, V. Ya., Verba, A. V., & Zhakhovskiy, V. O. (2016). *Evolutsiia pohliadiv ta rozvytok systemy likuvalno-evakuatsiynoho zabezpechennia viisk – uroky dlia Zbroinykh Syl Ukrainy* [Evolution of views and development of the system of medical and evacuation support for troops – lessons for the Armed Forces of Ukraine]. *Medychnе zabezpechennia antyterrorystychnoi operatsii: naukovо-orhanizatsiini ta medyko-sotsialni aspekty*. (P. 60–76). Kyiv: Prioryty [in Ukrainian].

[3] Guriev, S., Tanasienko, P., Guseletova, N., & Mostipan, O. (2014). *Analiz medyko-sanitarnykh naslidkiv viiskovykh dii pid chas provedennia suchasnykh kontrterorystychnykh operatsii* [Analysis of the health consequences of military action during the current counter-terrorism operations]. *Ekstrena medytsyna vid nauky do praktyky*, 4, 3–8. [in Ukrainian].

[4] Korol, S. O. (2015). *Orhanizatsiini, diahnostychni ta likuvalni aspekty nadannia dopomohy pry vohnepalnykh poranenniakh stopy* [Organizational, diagnostic and therapeutic aspects of providing care in gunshot wounds of the foot]. *Travma*, 16(5), 11–14. [in Ukrainian].

[5] Maydanyuk V.P. (2015) *Analiz efektyvnosti funktsionuvannia mobilnykh likarsko-sestrynskykh bryhad VMKTS Pivdennoho rehionu v ATO* [Analysis of the effectiveness of the functioning of the mobile medical nursing brigades of the Southern AUCC of the Southern Region in the ATO]. *Problemnii pytannia nadannia khirurhichnoi dopomohy poranenyim v ATO*. Proceedings of the Scientific and Practical Conference. Kyiv: HVKH. [in Ukrainian].

[6] Ritenour, A. E., Blackbourne, L. H., Kelly, J. F., McLaughlin, D. F., Pearse, L. A., Holcomb, J. B., & Wade, C. E. (2010) Incidence of primary blast injury in US military overseas contingency operations: a retrospective study. *Ann Surg.*, 215, 1140–1144. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181e01270.

Diagnosis of respiratory epithelial clearance abnormality in patients suffering from chemo-resistant pulmonary tuberculosis with comorbidity of bronchial mucosa

O. M. Raznatovska, V. M. Khlystun

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

Respiratory epithelial clearance timely and early disorder diagnosis in patients suffering from chemo-resistant pulmonary tuberculosis (CRPTB) concomitant pathology of the bronchial mucosa is an actual problem of modern phthiology, the solution of which will allow the timely application of rational correction, which will increase the effectiveness of this category treatment among patients.

Objective is to investigate the nature and features of respiratory epithelial clearance disorders among patients suffering from CRPTB with comorbidity of the bronchi mucous membrane by using the developed method of these disorders diagnosis.

Materials and methods. The respiratory epithelial clearance state diagnosis was carried out among 133 patients with CRPTB at the beginning of the intensive phase of antimycobacterial therapy during fibrobronchoscopy, provided there is a concomitant specific pathology of the mucous membrane (including its combination with non-specific endobronchitis). Average age of patients was 36.5 ± 1.1 years old. There were 89 (66.9 %) men and 44 (33.1 %) women. The tracheobronchial tree diagnostic fibrobronchoscopy with further study of the respiratory epithelial clearance condition among patients suffering from CRPTB was carried out by V. M. Khlystun at Phthiology and Pulmonology Department of Zaporizhzhia State Medical University in CI Zaporizhzhia Regional Antituberculous Clinical Dispensary. Criteria of patients including into the research: existence of resistance of tuberculosis mycobacteria to anti-mycobacterial drugs in patients with new and repeated cases of tuberculosis, existence of pathology of the mucosa of bronchi confirmed during fiberoptic bronchoscopy. Serious associated diseases (HIV infection/AIDS, diabetes mellitus, etc.) were criteria of exception. The condition of bronchial mucosa was studied under narcotic anaesthesia by fiberoptic bronchoscopes of Olympus (Japan). Pathology of a bronchial tree was described according to classification by M. V. Shesterina, A. N. Kalyuk (1975). Results of the research are processed by modern methods of the analysis using the personal computer with the statistical package Statistica® for Windows 6.0 license program (StatSoft Inc., No. AXXR712 D833214FAN5).

Results. There were respiratory epithelial clearance disturbances in 94.7 %, which predominate with the 1st and 2nd stages of mucociliary inefficiency (51.1 % and 37.6 %). There was mucociliary inefficiency dependence on the bronchi mucous membrane pathology nature: the incidence of respiratory epithelial clearance in patients with concomitant bronchial tuberculosis in combination with the nonspecific purulent endobronchitis is 2.4 times higher than in those with concomitant bronchial tuberculosis only (70.7 % vs 29.3 %). The association of nonspecific purulent endobronchitis with concomitant bronchial tuberculosis leads to an increase in the mucociliary inefficiency degree of severity, due to its diffuse localization, where it is diagnosed more often than in the limited one, thus, mucociliary inefficiency of the 2nd stage of severity (64.9 % vs 24.6 %, is 2.6 times more (64.9 % vs 24.6 %) and 4.6 times more in the 3rd stage (16.2 % vs 3.5 %).

Conclusions. The proposed method for the diagnosis of mucociliary inefficiency disorders among patients suffering from CRPTB with bronchial mucosa concomitant pathology allows to diagnose mucociliary inefficiency and mucociliary inefficiency dependence on the bronchi mucous membrane pathology nature.

Key words:

bronchoscopy, trachea bronchial tree mucosa, chemoresistance tuberculosis, mucociliary transport system.

Pathologia

2018; 15 (1), 77–80

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.128632

E-mail:

raxnatovskaya@gmail.com

Діагностика порушень мукоциліарного транспорту у хворих на хіміорезистентний туберкульоз легень із супутньою патологією слизової оболонки бронхів

O. M. Разнатовська, В. М. Хлестун

Своєчасна та рання діагностика порушень мукоциліарного транспорту у хворих на хіміорезистентний туберкульоз (ХРТБ) легень із супутньою патологією слизової оболонки бронхів – актуальна проблема сучасної фтизіатрії, вирішення якої дасть змогу своєчасно застосувати раціональну корекцію, що підвищить ефективність лікування таких хворих.

Мета роботи – вивчити характер та особливості порушень мукоциліарного транспорту у хворих на ХРТБ легень із супутньою патологією слизової оболонки бронхів шляхом застосування розробленого способу діагностики цих порушень.

Матеріали та методи. Діагностику стану мукоциліарного транспорту виконали у 133 хворих на ХРТБ легень на початку інтенсивної фази антимікобактеріальної терапії під час фіброbronхоскопії за умови наявності супутньої специфічної патології слизової оболонки (у тому числі її поєднання з неспецифічним ендобронхітом). Середній вік хворих становив $36,5 \pm 1,1$ року. Чоловіків було 89 (66,9 %), жінок – 44 (33,1 %). Діагностичну фіброbronхоскопію трахеобронхіального дерева з наступним вивченням стану мукоциліарного транспорту у хворих на ХРТБ легень виконали на клінічній базі кафедри фтизіатрії і пульмонології ЗДМУ в КУ «Запорізький обласний протитуберкульозний диспансер» власноруч В. М. Хлестуном. Критерії залучення пацієнтів у дослідження: наявність резистентності мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів, наявність патології слизової оболонки бронхів, що підтверджена під час фіброbronхоскопії. Критерії виключення: тяжкі супутні захворювання (ВІЛ-інфекція/СНІД, цукровий діабет тощо). Стан слизової

Ключові слова:

bronхоскопія, трахеобронхіальне дерево, слизова оболонка, хіміорезистентний туберкульоз, мукоциліарна транспортна система.

Патологія. – 2018. –

Т. 15, № 1(42). – С. 77–80

оболонки бронхів вивчали під наркозною анестезією фібробронхоскопом фірми «Olympus» (Японія). Патологію бронхіального дерева описували за класифікацією М. В. Шестериной, А. Н. Калюк (1975). Результати дослідження опрацювали сучасними методами аналізу на персональному комп'ютері з використанням статистичного пакета ліцензійної програми Statistica® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., № AXXR712 D833214FAN5).

Результати. Запропонований спосіб діагностики порушень мукоциліарного транспорту у хворих на ХРТБ легень із супутньою патологією слизової оболонки бронхів шляхом простого та швидкого у використанні методу, без суттєвих матеріальних і часових витрат, залучення додаткового спеціально навченого персоналу, безпечного для здоров'я пацієнта, безпосереднього ендобронхіального введення у бронхи гепаринізованої крові обстежуваного хворого під час фібробронхоскопії, без побічних реакцій та із запобіганням інфікуванню персоналу хіміорезистентними штамми мікобактерій туберкульозу дав змогу виявити порушення мукоциліарного транспорту в 94,7 %, які були переважно з I та II ступенями мукоциліарної недостатності (51,1 % і 37,6 % відповідно). Встановили залежність мукоциліарної недостатності від характеру патології слизової оболонки бронхів: частота порушення мукоциліарної недостатності у хворих із супутнім туберкульозом бронхів у поєднанні з неспецифічним гнійним ендобронхітом вища у 2,4 раза, ніж в осіб із супутнім лише туберкульозом бронха (70,7 % проти 29,3 %). Приєднання неспецифічного гнійного ендобронхіту до супутнього туберкульозу бронха призводить до збільшення ступеня тяжкості мукоциліарної недостатності шляхом дифузної його локалізації, де у 2,6 раза частіше діагностують, ніж при обмеженому, мукоциліарну недостатність II ступеня тяжкості (64,9 % проти 24,6 %), у 4,6 раза – III ступеня (16,2 % проти 3,5 %).

Висновки. Запропонований спосіб діагностики порушень мукоциліарного транспорту у хворих на ХРТБ легень із супутньою патологією слизової оболонки бронхів дає змогу діагностувати порушення мукоциліарного транспорту та визначити залежність мукоциліарної недостатності від характеру патології слизової оболонки бронхів.

Ключевые слова:

бронхоскопия, трахеобронхиальное дерево, слизистая оболочка, химиорезистентный туберкулез, мукоцилиарная транспортная система.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 77–80

Диагностика нарушений мукоцилиарного транспорта у больных химиорезистентным туберкулезом легких с сопутствующей патологией слизистой оболочки бронхов

Е. Н. Разнатовская, В. Н. Хлыстун

Своевременная и ранняя диагностика нарушений мукоцилиарного транспорта у больных химиорезистентным туберкулезом (ХРТБ) легких с сопутствующей патологией слизистой оболочки бронхов является актуальной проблемой современной фтизиатрии, решение которой позволит своевременно применить рациональную коррекцию, что повысит эффективность лечения данной категории больных.

Цель работы – изучить характер и особенности нарушений мукоцилиарного транспорта у больных ХРТБ легких с сопутствующей патологией слизистой оболочки бронхов путем применения разработанного способа диагностики этих нарушений.

Материалы и методы. Диагностику состояния мукоцилиарного транспорта провели у 133 больных ХРТБ легких в начале интенсивной фазы антимикобактериальной терапии во время фибробронхоскопии при наличии сопутствующей специфической патологии слизистой оболочки (в том числе ее сочетания с неспецифическим эндобронхитом). Средний возраст больных составил $36,5 \pm 1,1$ года. Мужчин было 89 (66,9 %), женщин – 44 (33,1 %). Диагностическая фибробронхоскопия трахеобронхиального дерева с последующим изучением состояния мукоцилиарного транспорта у больных ХРТБ легких проведена на клинической базе кафедры фтизиатрии и пульмонологии ЗГМУ в КУ «Запорожский областной противотуберкулезный диспансер» собственноручно В. Н. Хлыстуном. Критерии включения пациентов в исследование: наличие резистентности микобактерий туберкулеза к антимикобактериальным препаратам, наличие патологии слизистой оболочки бронхов, подтвержденной при фибробронхоскопии. Критерии исключения: тяжелые сопутствующие заболевания (ВИЧ-инфекция/СПИД, сахарный диабет и др.). Состояние слизистой оболочки бронхов изучали под наркозной анестезией фибробронхоскопом фирмы «Olympus» (Япония). Патологию бронхиального дерева описывали по классификации М. В. Шестериной, А. Н. Калюк (1975). Результаты исследования обработаны современными методами анализа на персональном компьютере с использованием статистического пакета лицензионной программы Statistica® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., № AXXR712 D833214FAN5).

Результаты. Предложенный способ диагностики нарушений мукоцилиарного транспорта у больных ХРТБ легких с сопутствующей патологией слизистой оболочки бронхов путем простого и быстрого в использовании метода, без существенных материальных и временных затрат, привлечения дополнительного специально обученного персонала, безопасного для здоровья пациента, непосредственного ендобронхиального введения в бронхи гепаринизированной крови обследуемого больного во время проведения фибробронхоскопии, без побочных реакций и с предупреждением инфицирования персонала химиорезистентными штаммами микобактерий туберкулеза позволило диагностировать нарушение мукоцилиарного транспорта в 94,7 %, преимущественно с I и II степенями мукоцилиарной недостаточности (51,1 % и 37,6 % соответственно). Установлена зависимость мукоцилиарной недостаточности от характера патологии слизистой оболочки бронхов: частота нарушения мукоцилиарного транспорта у больных с сопутствующим туберкулезом бронхов в сочетании с неспецифическим гнойным эндобронхитом выше в 2,4 раза, чем у лиц с сопутствующим только туберкулезом бронха (70,7 % против 29,3 %). Присоединение неспецифического гнойного эндобронхита к сопутствующему туберкулезу бронха приводит к нарастанию степени тяжести мукоцилиарной недостаточности за счет диффузной его локализации, где в 2,6 раза чаще диагностируют, чем при ограниченном, мукоцилиарную недостаточность II степени тяжести (64,9 % против 24,6 %), в 4,6 раза – III степени (16,2 % против 3,5 %).

Выводы. Предложенный способ диагностики нарушений мукоцилиарного транспорта у больных ХРТБ легких с сопутствующей патологией слизистой оболочки бронхов позволяет диагностировать нарушения мукоцилиарного транспорта и установить зависимость мукоцилиарной недостаточности от характера патологии слизистой оболочки бронхов.

One of the important parts of the local respiratory protection system is the mucociliary system [1,2]. It provides purification of the tracheobronchial system from damaging factors and infectious agents, the action of which is the direct cause of disturbance of the bronchi drainage function – respiratory epithelial clearance (REC) [3]. As far as it is known, one of the pathogenetic mechanisms of bronchopulmonary diseases, including pulmonary tuberculosis, is precisely the violation of the bronchi drainage function [4,7].

As of today, there are sufficient methods for diagnosis of REC disorders [5,6], but there are no data on the diagnosis of REC disorders in patients suffering from chemo-resistant pulmonary tuberculosis (CRPTB) with concomitant pathology of the bronchial mucosa, which led to the search for an adequate method that would be simple and fast in use, minimally safe for a patient, and which would not cause significant material costs or specially trained personnel.

Thus, REC timely and early disorder diagnosis in patients suffering from CRPTB concomitant pathology of the bronchial mucosa is an actual problem of modern phthisiology, the solution of which will allow the timely application of rational correction, which will increase the effectiveness of this category treatment among patients.

The purpose of the research

To investigate the nature and features of REC disorders among patients suffering from CRPTB with comorbidity of the bronchi mucous membrane by using the diagnosis developed method of these disorders.

Materials and methods of research

The REC diagnosis was carried out among 133 patients with CRPTB at the beginning of the intensive phase of antimycobacterial therapy during fibrobronchoscopy (FBS), provided there is a concomitant specific pathology of the mucous membrane (including its combination with non-specific endobronchitis). Average age of patients was 36.5 ± 1.1 years old. There were 89 (66.9 %) men and 44 (33.1 %) women.

The tracheobronchial tree diagnostic FBS with further study of the REC condition among patients suffering from CRPTB was carried out by V. M. Khlystun at Phthisiology and Pulmonology Department of Zaporizhzhia State Medical University in CI “Zaporizhzhia Regional Antituberculous Clinical Dispensary”.

The criteria for the patient inclusion in the research: presence of resistance of mycobacterium tuberculosis to antimycobacterial drugs, the presence of pathology of the bronchi mucous membrane, confirmed in the FBS. The exclusion criteria were severe concomitant diseases (HIV/AIDS, diabetes, etc.).

The condition of the bronchi mucous membrane was studied under the anesthetic anesthesia with the use of fibrotic bronchoscope, produced by Olympus Firm (Japan). The bronchial tree pathology was described under the classification of M. V. Shesterina, A. N. Kalyuk (1975).

The diagnosis of REC disorders in patients suffering from CRPTB with comorbidity of the bronchi mucous

membrane was carried out as follows. Withdraw 0.5 ml of heparin solution in 5000 units into a syringe, whereupon 4 ml of a patient's venous blood is withdrawn into the same syringe. At the end of FBS, the patient is given 3.5–4.0 ml of this heparinized blood in each bronchus. After 10–15 minutes after the FBS, the patient begins to collect sputum into the Falcon container for every 6 hours. The presence of hemoglobin (Hb) is determined in each portion of the sputum with the help of “Azopiroma Sample-600/6” as follows. The patient's sputum from the container is poured into a 5 × 5 cm gauze wipe, after which 4 drops of the reagent are applied to the sample to be examined. When a violet-lilac color appears in 1 minute, the test is considered to be positive, and in the absence of color, the test is considered to be negative, which indicates the absence of residual hidden blood. The research is completed after a qualitative response to the presence of Hb is not determined in the 3 subsequent sputum portions. At times of withdrawal, a conclusion is made on the state of REC. That is, the time for indicator full withdrawal in the normal time is 18 hours. The time for the indicator to be withdrawn is 36–48 hours in the 1st stage of mucociliary inefficiency (MCI), 54–66 hours in the 2nd stage of MCI, and 72–126 hours in the 3rd stage.

The research results were processed by modern methods of analysis on a personal computer using statistical software package Statistica® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., AXXR712 D833214FAN5). The distribution of quantitative characteristics normality was analyzed using the Shapiro–Wilk test. The parameters were normally distributed. The comparison of the indicators in the groups was carried out by the Student's t-criterion.

Results and discussion

The condition study in patients suffering from CRPTB with comorbidity of the bronchi mucous membrane allowed to establish that the normal REC state at the beginning of the intensive phase of antimycobacterial therapy was determined in a small number of patients, namely 7 (5.3 %). The majority number of patients were diagnosed with REC with different degrees of severity – 126 (94.7 %): 68 patients (51.1 %) were diagnosed with MCI in the 1st stage, 50 (37.6 %) persons in the 2nd stage of MCI took the second place. The 3rd stage of MCI was diagnosed only in 8 persons (6 %).

133 patients suffering from CRPTB were diagnosed with bronchial tuberculosis, 94 patients (70.7 %) of which had it in combination with nonspecific purulent endobronchitis.

Table 1 shows the dependence of MCI on the nature of the pathology of the bronchi mucous membrane. It was found that the incidence of REC among patients with concomitant bronchial tuberculosis, combined with nonspecific purulent endobronchitis, was 2.4 times higher than in bronchial tuberculosis – related patients: 94 (70.7 %) versus 39 (29.3 %) ($P < 0,05$). Furthermore, patients with only bronchial tuberculosis MCI had the 1st and 2nd stage (53.8 % and 30.8 %, respectively), and the 3rd stage of severity (8.5 %) was diagnosed with concomitant bronchial tuberculosis, combined with nonspecific purulent

Table 1. MCI dependence on the nature of the bronchi mucous membrane pathology in patients with CRPTB at the beginning of intensive phase of antimycobacterial therapy

Indicator	Total	MCI stage							
		Norm		1 st stage		2 nd stage		3 rd stage	
		abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Bronchial tuberculosis	39	6	15.4	21	53.8	12	30.8	0	0
Bronchial tuberculosis combined with nonspecific purulent endobronchitis	94	1	1.3	47	50.0*	38	40.2*	8	8.5
- limited	57	1	1.7	40	70.2**	14	24.6	2	3.5
- diffuse	37	0	0	7	18.9	24	64.9**	6	16.2

*: indicator reliable difference within the same group ($P < 0.05$); #: indicator significant difference within the group ($P < 0.05$).

endobronchitis, with the prevalence of MCI of the 1st stage of severity (50.0 %) and the 2nd stage (40.2%).

Analyzing nonspecific purulent endobronchitis by localization, the obtained data indicated that the 1st stage MCI prevailed in the limited process, in comparison with the 2nd and 3rd stage (70.2 % versus 24.6 % and 3.5 %, respectively; $P < 0.05$) and by 3.7 times than in the 1st stage, the diffusion process (70.2 % vs 18.9 %, $P < 0.05$). And the 2nd stage MCI prevailed over the 1st and 3rd stages (64.9 % vs 18.9 % and 16.2 %; $P < 0.05$) and by 2.6 times than in the limited process (64.9 % vs 24.6 %, $P < 0.05$). Furthermore, the 3rd stage MCI (16.2 % vs 3.5 %) was diagnosed 4.6 times more often in the diffuse endobronchitis, although not accurately.

Thus, a reliable dependence of MCI on the nature of the pathology of the bronchial mucosa among patients suffering from CRPTB at the beginning of intensive phase of antimycobacterial therapy, which manifested itself in the fact that the connection to the nonspecific purulent endobronchitis of concomitant bronchial tuberculosis leads to an increase of MCI stage severity due to its diffuse localization.

Conclusions

1. Respiratory epithelial clearance disturbances in 94.7 %, which were predominate with the 1st and 2nd stages of mucociliary inefficiency (51.1 % and 37.6 %).

2. Mucociliary inefficiency depends on the bronchi mucous membrane pathology nature: the incidence of respiratory epithelial clearance in patients with concomitant bronchial tuberculosis in combination with the nonspecific purulent endobronchitis is 2.4 times higher than in those with bronchial tuberculosis – related concomitantly (70.7 % vs 29.3 %).

3. The association of nonspecific purulent endobronchitis with concomitant bronchial tuberculosis leads to an increase in the mucociliary inefficiency degree of severity, due to its diffuse localization, where it is diagnosed more often than in a limited one, thus, mucociliary inefficiency of the 2nd stage of severity is 2.6 times bigger (64.9 % vs 24.6 %) and 4.6 times bigger in the 3rd stage (16.2 % vs 3.5 %).

Prospects for further researches. With the help of the proposed method of diagnosis of REC disorders among patients suffering from CRPTB with concomitant bronchi mucosa pathology, an appropriate correction will be made, which will facilitate the full implementation of therapeutic measures for these patients and the treatment effectiveness increase.

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

Information about authors:

Raznatovska O. M., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Phthysiology and Pulmonology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Khlystun V. M., Assistant of the Department of Phthysiology and Pulmonology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Відомості про авторів:

Разнатовська О. М., д-р мед. наук, доцент, професор каф. фізіатрії і пульмонології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Хлыстун В. М., асистент каф. фізіатрії і пульмонології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Разнатовська Е. Н., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. физиотриии и пульмонологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Хлыстун В. Н., ассистент каф. физиотриии и пульмонологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 11.09.2017

Після доопрацювання / Revised: 12.10.2017

Прийнято до друку / Accepted: 19.10.2017

References

- Zakharova, G. P., Yanov, Yu. K., & Shabalin, V. V. (2010). *Mukocilyarnaya sistema verkhnykh dykhatel'nykh putej [Mucociliary system of the upper respiratory tract]*. Saint Petersburg: Dialog. [in Russian].
- Kobylyanskiy, V. I. (2008). *Mukocilyarnaya sistema. Fundamental'nye i prikladnye aspekty [Mucociliary system. Fundamental and applied aspects]*. Moscow: BINOM. [in Russian].
- Zavaliy, M. A. (2014). Morfogenez mercatel'nogo e'piteliya [Morphogenesis of ciliated epithelium]. *Rynolohiia*, 1, 38–49. [in Russian].
- Novikov, Yu. K. (2007). Mukociliarnyj transport, kak osnovnoj mekhanizm zashhity legkih [Mucociliary transport, as the main mechanism of lung protection]. *Russkij medicinskij zhurnal*, 5, 357. [in Russian].
- Chuchalin, A. G., Solopov, V. N., & Kolganova, N. A. (1988). Diagnosticheskaya programma issledovaniya mukocilyarnogo transporta u bol'nykh khronicheskimi nespecificheskimi zabolevaniyami legkikh [Diagnostic program for the study of mucociliary transport in patients with chronic nonspecific lung diseases]. *Problemy tuberkuleza*, 8, 13–16. [in Russian].
- Pertseva, T. A., Kireyeva, T. V., & Gurzhiy, E. V. (2005). Novye podkhody v issledovanii mukocilyarnogo klirensa u pacientov s bronkholegocnoy patologiej [New approaches in evaluation of mucociliary clearance in patients with bronchopulmonary diseases]. *Ukrainskyi pulmonologichnyi zhurnal*, 4, 69–70. [in Ukrainian].
- Mall, M. A. (2008). Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 1, 13–24. doi: 10.1089/jamp.2007.0659.

Морфофункціональний стан привушних слинних залоз тримісячних щурів при експериментально модельованій внутрішньоутробній макросомії

О. В. Гармаш, Г. І. Губіна-Вакулик

Харківський національний медичний університет, Україна

Стаття присвячена вивченню особливостей постнатального морфогенезу ацинарної тканини привушної слинної залози тримісячних щурів, які народилися з експериментально модельованою макросомією в різних варіаціях.

Мета роботи – вивчення в експерименті особливостей постнатального морфогенезу слинних залоз тримісячних щурів, які народилися макросомами.

Матеріали та методи. Аналізували соматометричні показники тварин на момент народження та при виведенні з експерименту, в якому моделювали макросомію плода 4 способами (висококалорійна дієта молодих вагітних самок, висококалорійна дієта вагітних самок зрілого віку, висококалорійна дієта та гіпокінезія молодих вагітних самок, посилене плацентарно-плодове кровопостачання на тлі звичайних умов існування молодих вагітних самок). Для морфологічного аналізу використовували тканини привушних слинних залоз тримісячних щурів-нащадків. Оцінювали абсолютні та відносні значення маси слинних залоз. Крім гістологічного аналізу для виявлення ДНК і РНК використали забарвлення галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном, для виявлення глікопротеїдів поставили PAS-реакцію. Використовуючи комп'ютерні зображення, виміряли площу ядер сероцитів, оцінили вміст ДНК в ядрі, РНК у цитоплазмі, глікопротеїдів у слині протоків і просвітів ацинусів.

Результати. При досягненні щурами-нащадками тримісячного віку в макросомів зі стимульованим внутрішньоутробним ростом (група Акс) середня маса тіла має тенденцію до збільшення, а в макросомів-нащадків батьків молодого віку, вагітність матерів яких відбувалась в умовах «м'якої» гіпокінезії та надмірної калорійності харчування (група М+Гк+cal), – до зменшення. У макросомів-нащадків молодих батьків, які під час вагітності споживали їжу підвищеної калорійності (група М+cal), та в макросомів-нащадків батьків зрілого віку, котрі під час вагітності одержували гіперкалорійну дієту (група З+cal), соматометричні показники були аналогічні контролю. Відносна маса привушних слинних залоз у тримісячних щурів, які народилися із макросомією, виявилася збільшеною в усіх варіантах моделювання, але максимально у групах М+cal та М+Гк+cal. У макросомів групи Акс у тримісячному віці формуються слинні залози з гіпоплазією сероцитів, що морфофункціонально активніші, з ознаками гіперпродукції білків і гіпопродукції глікопротеїдів. У макросомів групи М+cal у тримісячному віці кінцеві відділи слинної залози сформовані аналогічно контролю за кількістю сероцитів, але сероцити морфофункціонально активніші, з ознаками гіперпродукції глікопротеїдів. У макросомів групи З+cal у тримісячному віці спостерігається гіперплазія сероцитів, морфофункціональний стан яких не відрізняється від такого в контрольних тварин. У макросомів групи М+Гк+cal спостерігають ознаки збільшення морфофункціональної активності сероцитів із гіперпродукцією глікопротеїдів.

Висновки. В особин, які народилися із макросомією, у тримісячному віці спостерігається зміна морфофункціонального стану паренхіми привушних слинних залоз і складу слини у протоках, просвітах ацинусів.

Ключові слова: макросомія плода, експериментальні тварини, привушні залози, слинні залози.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 81–87

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129324

E-mail: o.v.garmash@gmail.com

Морфофункціональное состояние околоушных слюнных желез трехмесячных крыс при экспериментально моделированной внутриутробной макросомии

О. В. Гармаш, Г. И. Губина-Вакулик

Статья посвящена изучению особенностей постнатального морфогенеза ацинарной ткани околоушной слюнной железы трехмесячных крыс, родившихся с экспериментально моделированной макросомией в различных вариациях.

Цель работы – изучение в эксперименте особенностей постнатального морфогенеза слюнных желез трехмесячных крыс, родившихся макросомами.

Материалы и методы. Анализировали соматометрические показатели животных на момент рождения и при выведении из эксперимента, в котором моделировали макросомию плода 4 способами (висококалорійна дієта молодих вагітних самок, висококалорійна дієта вагітних самок зрілого віку, висококалорійна дієта та гіпокінезія молодих вагітних самок, посилене плацентарно-плодове кровоснабження на фоні звичайних умов існування молодих вагітних самок). Для морфологічного аналізу використовували тканини околоушних слюнных желез трехмесячных крыс-потомков. Оценивали абсолютные и относительные значения массы слюнных желез. Кроме гистологического анализа для выявления ДНК и РНК использована окраска галоцианин-хромовыми квасцами по Ейнарсону, для обнаружения гликопротеидов поставлена PAS-реакция. С использованием компьютерных изображений выполнено измерение площади ядер сероцитов, оценено содержание ДНК в ядре, РНК в цитоплазме, гликопротеидов в слюне в протоках и просветах железы.

Результаты. При достижении крысами-потомками трехмесячного возраста у макросомов со стимулированным внутриутробным ростом (группа Акс) средняя масса тела имеет тенденцию к увеличению, а у макросомов-потомков родителей молодого возраста, беременность матерей которых проходила в условиях «мягкой» гипокинезии и чрезмерной кало-

Ключевые слова: макросомия плода, экспериментальные животные, околоушные железы, слюнные железы.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 81–87

рийности питания (группа М+Гк+са), – к уменьшению. У макросомов-потомков молодых родителей, которые во время беременности употребляли пищу повышенной калорийности (группа М+са), и у макросомов-потомков родителей зрелого возраста, которые во время беременности получали гиперкалорийную диету (группа З+са), соматометрические показатели были аналогичны контролю. Относительная масса околоушных слюнных желез у трехмесячных крыс, родившихся с макросомией, оказалась увеличенной во всех вариантах моделирования, но максимально в группах М+са и М+Гк+са. У макросомов группы Акс в трехмесячном возрасте формируются слюнные железы с гипоплазией сероцитов, которые морфофункционально более активны, с признаками гиперпродукции белков и гипопроодукции гликопротеидов. У макросомов группы М+са в трехмесячном возрасте конечные отделы слюнной железы сформированы аналогично контролю по количеству сероцитов, однако сероциты морфофункционально более активны, с признаками гиперпродукции гликопротеидов. У макросомов группы З+са в трехмесячном возрасте наблюдается гиперплазия сероцитов, морфофункциональное состояние которых не отличается от такового у контрольных животных. У макросомов группы М+Гк+са отмечены признаки увеличения морфофункциональной активности сероцитов с гиперпродукцией гликопротеидов.

Выводы. Установлено, что у особей, которые родились с макросомией, в трехмесячном возрасте наблюдается изменение морфофункционального состояния паренхимы околоушных слюнных желез и состава слюны в протоках и просветах ацинусов.

Key words:

fetal macrosomia, animal experiments, glands, parotid salivary glands.

Pathologia

2018; 15 (1), 81–87

Morphofunctional status of parotid salivary glands in three-month-old rats with experimentally induced fetal macrosomia

O. V. Garmash, G. I. Gubina-Vakulyk

The paper aims at studying the features of postnatal morphogenesis of parotid salivary glands acinar tissue in three-month-old rats which were born with experimentally induced fetal macrosomia.

The aim of the study is to examine experimentally the features of postnatal morphogenesis of salivary glands in three-month-old rats born with macrosomia.

Materials and methods. Somatometric data of the animals were examined at birth and after the experiment, which induced macrosomia of rat fetus with four different ways (high-calorie diet for young pregnant female specimens, high-calorie diet for mature pregnant female specimens, high-calorie diet and hypokinesia condition for young pregnant female specimens, increased placental-fetal blood supply on the background of normal living conditions for young pregnant female specimens). To make the morphological analysis we used the tissues of parotid glands of three-month-old rats. We examined absolute and relative values of salivary gland mass. Beside the histological tests we used Gallocianin-chrome alum technique to detect DNA and RNA, and PAS-reaction to detect glycoproteins. Using computer images we measured the squares of serocytes, evaluated the content of DNA in the cell nucleus, the content of RNA in cytoplasm and glycoproteins in saliva in ducts and gaps of acini.

Results. When rats reached the age of three months macrosomia-induced specimens with stimulated intrauterine growth (group Aks) had a tendency to increase their average body weight while macrosomia-induced descendants of rats in the group 3 (high-calorie diet and “soft” hypokinesia (group Y+Hk+са) had a tendency to decrease their body mass. And macrosomia-induced descendants of rats in the group 1 (high-calorie diet during pregnancy, Y+са group) and descendants in group 2 (high-calorie diet for mature rats during pregnancy, M+са group) had somatometric data similar to the control-group. The relative mass of parotid glands of three-month-old rats which were born with macrosomia appeared to be increased in all the groups, but top values were observed in groups Y+са and Y+Hk+са. Rats with macrosomia from the group Aks by the age of three months had salivary glands with hypoplasia of serocytes which were morphofunctionally more active and had signs of proteins and glycoproteins hypoproduction. Rats with macrosomia in the Y+са group by the age of three months had the amount of serocytes commensurate to the data of the control group but serocytes were more morphofunctionally active and had signs of glycoproteins hyperproduction. Rats in the M+са group at the age of three months had serocytes hyperplasia, but their morphofunctional condition was similar to the control group. And macrosomia-induced rats in the Y+Hk+са group had signs of the increase of morphofunctional activity of serocytes and hyperproduction of glycoproteins.

Conclusion. It has been found that specimens which were born with macrosomia at the age of three months showed changes in morphofunctional state of parotid salivary glands parenchyma and, therefore, changes in the salivary composition in ducts and gaps of acini.

У зв'язку зі значною поширеністю стоматологічних захворювань, чимала кількість наукових досліджень присвячена пошуку можливих причин виникнення порушень пародонтального комплексу та твердих тканин зубів.

Зв'язок між антенатальним періодом, що має патологічний перебіг, та ймовірністю виникнення порушень у ротовій порожнині нині є беззаперечним фактом [1,2]. Формування передумов для виникнення стоматологічних порушень при дефіциті маси тіла (синдром затримки внутрішньоутробного розвитку) чи надмірній масі тіла (макросомія) при народженні підтверджено в попередніх роботах [3,4].

Відомо, що такий патологічний стан новонародженого, як макросомія супроводжується внутрішньоутробним формуванням різноманітних відхилень від нормального розвитку органів і систем, як-от імунної, гормональної [5,6,7]. Усі відомі стоматологічні порушення є станами мультифакторними. Істотно впливає на виникнення порушень ротової порожнини наявність супутньої патології, шкідливих звичок, характер харчування, стан слинних залоз, біохімічний склад слини та багато інших факторів. Дослідження впливу стану слинних залоз і біохімічних показників ротової рідини на ймовірність виникнення стоматологічних порушень мають понад ніж сторічну історію.

Найявний прямий зв'язок між функціонуванням слинних залоз і рівнем стоматологічного здоров'я [8]. Але визначити, що саме викликало ті чи інші процеси у слинних залозах та, як наслідок, погіршення стоматологічного здоров'я пацієнтів у підлітковому та дорослому віці, дуже важко або неможливо. Тому дослідження стану слинних залоз у тримісячних експериментальних тварин, чії масо-ростові параметри при народженні були вищими за 90-центильний рівень, може дати важливу інформацію про морфофункціональні зміни у тканині привушних слинних залоз.

Мета роботи

Вивчення в експерименті особливостей постнатального морфогенезу слинних залоз тримісячних щурів, які народилися макросомами, для обґрунтування можливого ризик-факторного значення макросомії під час розвитку стоматологічних порушень.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на лінійних щурах Wistar Albino Glaxo. На першому етапі дослідження сформували 5 груп самок по 8–10 особин у групі. Макросомію при народженні моделювали, використовуючи 4 різні моделі.

Перша група складалась із молодих тварин віком 3–5 місяців із середніми масо-ростовими параметрами (МРП), які перед спарюванням і під час вагітності перебували на стандартному раціоні віварію (4 kcal/g, 5 % жирів) [9]. Особини із їхнього потомства із внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів, маса яких при народженні була вищою за 90-центильний рівень ($m \geq 6,3 \times 10^{-3}$ кг), віднесені до групи акселерати (Акс, $n = 6$). У цій групі 10 % щурів-нащадків народилися з макросомією.

Друга група складалась із молодих тварин віком 3–5 місяців, які перед спарюванням і під час вагітності перебували на висококалорійній дієті (5 kcal/g) із вмістом жирів (45 %), вуглеводів (35 %) і білків (20 %). Інформація про вміст поживних речовин і калорійність дієти, а також перевірка її результативності за глюкозотолерантним та інсулінолітерантним тестами також є в роботі [9]. Особини з потомства, маса яких при народженні була вищою за 90-центильний рівень ($m \geq 6,3 \times 10^{-3}$ кг), віднесені до групи з умовною назвою молодий вік (M+cal, $n = 6$). У 12 % новонароджених щурів у цій групі зафіксовано макросомію.

Третя група складалась із тварин зрілого віку (8–9 місяців), які перед спарюванням і під час вагітності перебували на висококалорійній дієті. Особини із їхнього потомства, маса яких при народженні була вищою за 90-центильний рівень ($m \geq 6,3 \times 10^{-3}$ кг), віднесені до групи тварин, котру умовно назвали групою зрілого віку (3+cal, $n = 6$). У цій групі макросомія зафіксована у 17 % новонароджених щурів.

Четверта група складалась із молодих тварин віком 3–5 місяців, які перед спарюванням і під час вагітності перебували на висококалорійній дієті (з вмістом жирів (45 %), вуглеводів (35 %) і білків (20 %) (hypercaloric, high fat diet: 5 kcal/g, 45 % of energy as fat; D12451; Research Diets, New Brunswick, N.J., USA) [9] і перебували в гіпокінетичних умовах.

Утримання експериментальних тварин у гіпокінетичних умовах використовується в експериментальних моделях стресу. Тому в моделі, що використали, гіпокінетичні умови були «м'якими»: для обмеження рухової активності тварину поміщали у клітку розміром $20 \times 20 \times 25$ см, яка приблизно втричі перевищує розмір тварини.

Особини із потомства щурів, маса яких при народженні була вищою за 90-центильний рівень ($m \geq 6,3 \times 10^{-3}$ кг), віднесені до групи тварин, яку умовно назвали групою гіпокінетії (M+Гк+cal, $n = 6$). В умовах моделювання макросомії при народженні цим способом 30 % щурів-нащадків народилися з макросомією.

Для діагностики макросомії при народженні застосували стандартний клінічний критерій – маса тіла більше 90-центильного рівня у великому масиві новонароджених щурят ($n = 500$). За цими даними обчислили медіанну масу тіла щурів при народженні (50-центильний рівень), що дорівнювала $5,28 \times 10^{-3}$ кг. Щурів з масою тіла при народженні, котра була більшою або дорівнювала $6,3 \times 10^{-3}$ кг, вважали макросомами.

До групи контролю (К, $n = 6$) віднесені новонароджені тварини з середніми масо-ростовими параметрами (маса тіла яких була в межах одного стандартного відхилення від медіанної маси тіла), вагітність матерів котрих перебігала у звичайних умовах і на стандартному харчовому раціоні.

Для формування всіх груп відібрані новонароджені щури з різних послідів. Усі групи репрезентативні за наявністю щурят чоловічої та жіночої статі.

Потомство щурів виводили з експерименту на 90–92 добу після народження (3 місяці). Утримання та маніпуляції з експериментальними тваринами відповідали національним «Спільним етичним принципам досліджень на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Тварин виводили з експерименту шляхом передозування тіопенталу натрію з наступною декапітацією.

Зважування експериментальних тварин, вимірювання довжини тіла виконували двічі: при народженні та виведенні з експерименту. Результати соматометричного обстеження в кожній із груп наведені в таблиці 1.

Для морфологічного аналізу використовували тканини привушних слинних залоз. Матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні й заливали парафіном за загальноприйнятою методикою. Зрізи завтовшки 5–6 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсомом на сумарні нуклеїнові кислоти [10, 11], поставили PAS-реакцію на глікопротеїди [12]. Мікропрепарати вивчали на мікроскопі Axiostar-plus (Zeiss, ФРН) з використанням фотокамери і з проведенням морфометрії: визначили площу ядер гландулоцитів (гландулоцити слинних залоз мають назву сероцити), оцінили вміст ДНК в ядрі, РНК у цитоплазмі (фарбування за Ейнарсомом), глікопротеїдів у слині, яка була виявлена у протоках і просвітах ацинусів (PAS-реакція), на комп'ютерних

Таблиця 1. Оцінки математичного очікування маси та довжини тіла, а також масо-ростового показника експериментальних тварин у різних групах при народженні та виведенні з експерименту

Група дослідження	Маса тіла <i>m</i> (у кг × 10 ⁻³)	Довжина тіла <i>l</i> (у м × 10 ⁻²)	Значення масо-ростового показника <i>m/l³</i>
Первинне соматометричне обстеження шурів при народженні (1 доба)			
Акс	7,47*	6,17*	0,197*
M+cal	6,35*	4,83	0,273
Z+cal	6,80*	4,93	0,286
M+Гк+cal	7,44*	5,37*	0,259
K	5,45 ± 0,29	4,78	0,242
Вторинне соматометричне обстеження тримісячних шурів (90 діб)			
Акс ₉₀	159,8	17,37*	0,533
M+cal ₉₀	131,7	15,75	0,531
Z+cal ₉₀	120,3	16,57	0,436*
M+Гк+cal ₉₀	84,7*	14,12	0,415*
K ₉₀	130,0	15,53	0,532

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки $p \leq 0,05$.

Таблиця 2. Оцінки математичного очікування маси привушних слинних залоз, відношення маси слинних залоз до маси тіла, а також кількості гландулоцитів на площі зрізу 750 мкм² у тримісячних експериментальних тварин

Група дослідження	Осереднені значення маси слинних залоз (у кг × 10 ⁻⁵)	Осереднені значення відношення маси слинних залоз/маси тіла (%)	Середня кількість гландулоцитів на площі зрізу 750 мкм ² (екземпляри)
Акс ₉₀	2,57 ± 0,29*	0,0160	113*
M+cal ₉₀	2,64 ± 0,53*	0,0194*	163
Z+cal ₉₀	1,78 ± 0,05	0,0152	199*
M+Гк+cal ₉₀	2,23 ± 0,18*	0,0291*	129
K ₉₀	1,76 ± 0,25	0,0136	158

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки $p \leq 0,05$.

зображеннях за допомогою комп'ютерного забезпечення «БіоТест» (РФ).

Оцінювання середніх значень параметрів, що вивчили, виконали із застосуванням програми MS Excel 2016. Перевірку гіпотез про відмінність середніх у малих групах здійснили методами непараметричної статистики (за критеріями Вальда–Вольфовіца, Колмогорова–Смірнова та Манна–Уїтні) з використанням пакета Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення

Використання масо-ростового показника *m/l³* (табл. 1) показало: на момент народження більшість шурів-макросомів, особливо у групах M+cal, M+Гк+cal і Z+cal, мали тенденцію до збільшення його значення, що трактується як наявність внутрішньоутробного ожиріння. У групі Акс виявили вірогідне зменшення цього показника порівняно з групою контролю, що пов'язано з непропорційно надмірною стимуляцією ростових процесів.

У віці 3 місяці постнатального онтогенезу шури-нащадки у групі Акс виявилися більшими, ніж у групі K, а у групі M+Гк+cal – меншими. Шури груп M+cal і Z+cal за масою тіла не відрізнялися від групи контролю.

Абсолютна маса привушних слинних залоз у групах Акс, M+Гк+cal і M+cal (табл. 2) у середньому

виявилась вірогідно більшою, ніж у групі контролю, а у групі Z+cal перебувала в межах статистичної похибки щодо показників контрольної групи. Загальновідомо, що більш цінним органометричним показником є відносна маса органа. В нашому випадку, це відношення маси привушної слинної залози до маси тіла експериментальної тварини.

Виявляється, що в середньому відносна маса привушних слинних залоз у всіх основних групах перевищує показники групи контролю (табл. 2), але має різний ступінь: мінімальний (у межах статистичної похибки) – у тварин груп Акс і Z+cal, максимальний – у тварин груп M+cal та M+Гк+cal (табл. 1).

Мікроскопіювання привушних слинних залоз тварин групи контролю показало: тканина представлена множинними залозами екзокринного типу, що виспані одним шаром серозних гландулоцитів. У зв'язку з фізіологічним апоптозом епітеліальний покрив залоз є у стані постійного оновлення. Для оцінювання вираженості паренхіматозного компонента у слинних залозах використали показник «середня кількість гландулоцитів на фіксованій площі зрізу». Зокрема, на фіксованій площі 750 мкм² мікропрепаратів групи контролю в середньому зафіксовано 158 екземплярів гландулоцитів (табл. 2).

Ядра сероцитів знаходяться в різних стадіях (камб'яльній, активного функціонування, апоптотичній). Розміри ядер різні, форма більшості ядер округла, хоча трапляються ядра довгастої форми, що мають великі розміри. Середнє значення площі ядер гландулоцитів дорівнювало 16,18 мкм². У просвітах ацинусів візуалізується слина, що має пінистий вигляд.

На препаратах, забарвлених галоціаніном, візуалізується плямистість: групи ацинусів із темними ядрами перемежуються з групами ацинусів з ядрами світлішими. Можна припустити, що така картина є ознакою функціонального стану – перші менше, а другі більше активні в синтезі білків. Середня оптична густина ядер гландулоцитів дорівнювала 0,601 ум. од. оптичної густини, а концентрація нуклеїнових кислот у цитоплазмі – 0,318 ум. од. оптичної густини.

Під час PAS-реакції у тварин контрольної групи цитоплазма гландулоцитів фуксинофільна, неоднорідна, гранулярно-комкувата. Просвіт у переважній більшості ацинусів заповнений аналогічними масами. Визначаючи оптичну густину рідини у просвітах ацинусів на мікропрепаратах із постановкою цієї реакції (табл. 3), виявили: у середньому цей показник дорівнював 0,0761 ум. од. оптичної густини.

У шурів групи Акс, які у віці 3 місяці зберегли здатність до прискореного росту (табл. 1), абсолютна маса привушних слинних залоз вірогідно більша, ніж у групі контролю; визначили також певне збільшення відносної маси слинних залоз (табл. 2).

Підрахувуючи кількість гландулоцитів на площі 750 мкм² мікропрепаратів, виявили: у тварин групи Акс у середньому відбувається вірогідне зниження значення цього показника порівняно з контролем із великим розбігом (максимальне значення – 169, мінімальне – 86 екземплярів).

У слинних залозах шурів цієї групи епітелій низький, площа ядер гландулоцитів різко збільшена

Таблиця 3. Осереднені значення розмірів ядер, оптичної густини цитоплазми, ядер гландулоцитів і рідини у просвітах привушних слинних залоз тримісячних експериментальних тварин

Група дослідження	Осереднені значення площі ядер гландулоцитів, мкм ²	Оптична густина ядер гландулоцитів (забарвлення за Ейнарсоном (ум. од. опт. густини))	Оптична густина цитоплазми гландулоцитів (забарвлення за Ейнарсоном (ум. од. опт. густини))	Оптична густина рідини у просвіті кінцевих відділів (PAS-реакція, (ум. од. опт. густини))
Акс ₉₀	27,4*	0,544*	0,363*	0,046*
М+сал ₉₀	21,9*	0,464*	0,270*	0,121*
З+сал ₉₀	17,7	0,565	0,350*	0,096
М+Гк+сал ₉₀	25,4*	0,429*	0,288	0,124*
К ₉₀	16,2	0,601	0,318	0,0761

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки $p \leq 0,05$.

(табл. 3). Привертає увагу наявність клітин із дуже великими ядрами, котрі можна вважати поліплоїдними; їх поява свідчить про підвищене морфофункціональне «навантаження» сероцитів.

Оптична густина ядер сероцитів (табл. 3) вірогідно більша, ніж у групі контролю. Такий самий зсув (у бік збільшення) спостерігали, визначаючи оптичну густину цитоплазми сероцитів, що підтверджує висновок про морфофункціональну активність окремого сероцита.

Під час PAS-реакції в щурів групи Акс фуксинофілія виявляє «пінистість» вмісту просвітів ацинусів. Оптична густина вмісту просвітів ацинусів під час PAS-реакції виявилась вірогідно меншою, ніж у контролі. Отже, можна припустити рідшу консистенцію слини через менший вміст глікопротеїдів.

У щурів групи М+сал у віці 3 місяці спостерігають аналогічні контролю значення маси тіла, довжини тіла та МРП (табл. 1), тобто соматометрична різниця, яка була при народженні, нівелювалась. Однак відносна маса слинних залоз вірогідно збільшена порівняно з контролем (табл. 2).

Порівнюючи мікроскопічну картину слинних залоз щурів групи М+сал із такою в інтактних щурів групи контролю, виявили: перші відрізняються тим, що просвіти ацинусів заповнені більш щільним вмістом, картина «пінистості» відсутня, часто кінцеві відділи ацинусів не мають просвітів – «змикаються». Візуалізуються ділянки розміром з ацинус, в яких епітелій загинув, а фрагменти його розкладу спостерігають у просвіті цих ділянок. Середня кількість сероцитів на площі 750 мкм² мікропрепаратів – на рівні групи контролю (табл. 2).

Окремі сероцити мають дуже великі ядра, що, очевидно, демонструє поліплоїдію. В середньому ядра сероцитів слинних залоз щурів групи М+сал вірогідно більші за ядра щурів групи контролю (табл. 3).

Виявлено, що оптична густина цитоплазми сероцитів вірогідно зменшена у порівнянні з контролем, тобто містить РНК зменшеної щільності розміщення (табл. 3). Оптична густина ядер сероцитів у середньому виявилась також достовірно зменшеною, тобто ядра менше гетерохромні.

Під час PAS-реакції зафіксували інтенсивну фуксинофілію як навколо ядер гландулоцитів, так і в апікальній частині кінцевих відділів. Кінцеві відділи здебільшого заповнені дрібнозернистим вмістом на гомогенному фуксинофільному тлі. Оптична густина рідини у просвітах ацинусів під час цієї реакції також

вірогідно збільшена (майже в 1,6 раза) порівняно з групою контролю (табл. 3), що свідчить про збільшений вміст глікопротеїдів у слині.

Зіставляючи зміни ступеня гетерохромності ядер і вмісту РНК у цитоплазмі сероцитів із вмістом глікопротеїдів у просвітах ацинусів можна припустити, що у тварин групи М+сал відбувається збільшення продукції глікопротеїдів, а не білків.

У щурів групи З+сал виявили вірогідно збільшене значення середньої маси тіла при народженні, а у тримісячних тварин цієї групи зафіксовано зниження МРП на тлі тенденції до зниження маси й довжини тіла (табл. 1). Вірогідних відмінностей між середньою абсолютною та середньою відносною масою привушних слинних залоз щурів групи З+сал порівняно з групою контролю не виявили (табл. 2).

У щурів цієї групи кінцеві відділи дуже малих розмірів, більша частина ацинусів не сформована, визначили велику кількість клітин, що лежать шарами, ацинусів немає. У середньому кількість сероцитів на площі 750 мкм² мікропрепаратів у щурів цієї групи була вірогідно більшою, ніж у контролі, та найбільшою серед усіх основних груп (табл. 2).

Ядра невеликого розміру (табл. 3) порівняно з контролем вірогідної різниці не зафіксували. Інтенсивність забарвлення ядер галоціанін-хромовими галунами порівняно з групою контролю також знаходиться в межах статистичної похибки (табл. 3). Оптична густина цитоплазми під час цієї гістохімічної реакції виявилась суттєво більшою, ніж у групі контролю, що свідчить про вищий вміст РНК. Вищі сероцити з дещо більшим вмістом РНК можна трактувати як гістологічну ознаку продукції слини з більшим вмістом білків.

Під час PAS-реакції в щурів групи З+сал оптична густина матеріалу в центрі кінцевих відділів вірогідно не відрізняється від групи контролю (табл. 3).

У щурів групи М+Гк+сал на момент народження при відносно невеликій довжині тіла була найбільша маса тіла з формуванням недостовірно збільшеного МРП. У 3-місячних щурів цієї групи зафіксовано уповільнене зростання та уповільнений набір маси тіла зі зменшенням МРП (табл. 1).

Абсолютна маса привушних слинних залоз у тварин групи М+Гк+сал вірогідно збільшена, а оцінка їх середньої відносної маси порівняно з масою слинних залоз тварин групи контролю виявляється вірогідно (у понад 2 рази) збільшеною (табл. 2).

Кількість гландулоцитів на площі 750 мкм² мікропрепаратів щодо контролю була в межах статистичної похибки (табл. 2).

У препаратах групи М+Гк+саI епітелій нижчий, слина піниста, але більш дрібнопухирчаста. У деяких тварин ацинуси мають дуже малий розмір. Площа ядер сероцитів вірогідно більша, ніж у контролі (табл. 3). Оптична густина ядер при забарвленні на нуклеїнові кислоти вірогідно зменшена порівняно з контролем. Малооб'ємна цитоплазма має оптичну густину на рівні групи контролю.

У просвітах кінцевих відділів накопичується слина, ступінь фуксинофілії якої вірогідно вищий, ніж у групі контролю (табл. 3). Це свідчить про більшу густину слини в зв'язку зі збільшеною концентрацією глікопротеїдів.

Експериментальне моделювання макросомії новонароджених особин показало, що тільки у випадках внутрішньоутробної стимуляції ростових процесів прискорене зростання зберігається і в постнатальному онтогенезі, а саме у тримісячному віці (група Акс). До цього віку соматометричні показники у макросомів з іншим механізмом формування можуть нівелюватися щодо групи К (групи М+саI та 3+саI) або навіть зменшитися (група М+Гк+саI).

Вивчили привушну слинну залозу у 3-місячних експериментальних тварин, які народилися макросомами, вона виявилася гіпертрофованою у групах М+саI і М+Гк+саI. Цікавим є результат підрахунку кількості сероцитів на фіксованій площі зрізу. У групі 3+саI на тлі відсутності гіпертрофії привушної слинної залози відбувається гіперплазія сероцитів, морфофункціональний стан яких на рівні контролю.

У групі М+саI гіпертрофована привушна слинна залоза не має ознак гіперплазії сероцитів, але вони морфофункціонально активніші, ніж у групі контролю, та з ознаками посиленої продукції глікопротеїдів і послабленої продукції білків.

Відносна маса слинної залози в макросомів-акселератів (група Акс) у віці 3 місяців збільшена невірогідно, водночас виявлена гіпоплазія сероцитів. Окремі сероцити компенсаторно морфофункціонально стимульовані порівняно з групою контролю, з ознаками збільшення продукції білків і зменшення продукції глікопротеїдів.

Гіпертрофована привушна слинна залоза у 3-місячних щурів групи М+Гк+саI мала тенденцію до гіпоплазії сероцитів порівняно з групою контролю. Сероцити морфофункціонально активніші, особливо щодо продукції та вмісту у слині глікопротеїдів.

Роботи з вивчення морфологічних особливостей слинних залоз в особин, які народилися з макросомією, відсутні як у вітчизняній, так і закордонній фаховій літературі. Останнім часом здійснюють багато досліджень, які підтверджують високу інтенсивність і поширеність каріозного процесу в дітей і підлітків, які народилися з макросомією [1,2]. Беручи до уваги тісний зв'язок між станом слинних залоз і формуванням стоматологічних порушень, поставили експеримент із формуванням макросомії та вперше вирішили дослідити морфофункціональні особливості постнатального морфогенезу привушних слинних залоз в особин, які народилися з великою масою тіла.

Висновки

1. Під час моделювання макросомії в усіх 4 варіантах (висококалорійна дієта молодих вагітних самоць, висококалорійна дієта вагітних самоць «зрілого» віку, висококалорійна дієта та гіпокінезія молодих вагітних самоць, посилене плацентарно-плодове кровопостачання на тлі звичайних умов існування молодих вагітних самоць) спостерігали народження щурят із вірогідно збільшеною масою тіла.

2. При досягненні щурами-нащадками тримісячного віку виявилось, що у групі тварин із внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів середня маса тіла має тенденцію до збільшення, а у групі нащадків щурів, які були на висококалорійній дієті та в умовах гіпокінезії, – до зменшення. У групах із висококалорійною дієтою молодих вагітних самоць і висококалорійною дієтою вагітних самоць «зрілого» віку соматометричні показники нащадків тримісячного віку були аналогічні таким у групі контролю.

3. Відносна маса привушних слинних залоз у 3-місячних щурів, які народилися із макросомією, виявилася збільшеною в усіх варіантах моделювання.

4. У всіх макросомів при народженні на момент досягнення ними віку статевої зрілості спостерігали морфофункціональні зміни привушних слинних залоз. Ці зміни були неоднорідними. Так, у макросомів зі стимульованим внутрішньоутробним ростом у віці 3 місяців постнатального онтогенезу формуються слинні залози із гіпоплазією сероцитів, які морфофункціонально активніші, з ознаками гіперпродукції білків і гіпопродукції глікопротеїдів. У щурів-макросомів, які народилися з ознаками внутрішньоутробного ожиріння, виявили збільшення морфофункціональної активності сероцитів із гіперпродукцією глікопротеїдів у слині протоків і просвітів ацинусів залоз. Зрілий вік (8–9 місяців) вагітної самоці-матері на тлі висококалорійної дієти зумовлює формування у статевозрілих нащадків гіперплазії сероцитів, морфофункціональний стан яких не відрізняється від такого у контрольних тварин.

Перспективи подальших досліджень полягають у збільшенні фактичного матеріалу для доповнення відомостей про особливості морфогенезу привушних слинних залоз у старшому віці тварин за умови експериментального моделювання макросомії плода, а також вивчення якостей слини в пацієнтів, які народилися макросомами.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Гармаш О. В., канд. мед. наук, доцент каф. терапевтичної стоматології, Харківський національний медичний університет, Україна.

Губіна-Вакулик Г. І., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Гармаш О. В., канд. мед. наук, доцент, каф. терапевтической стоматологии, Харьковский национальный медицинский университет, Украина.

Губина-Вакулик Г. И., д-р мед. наук, профессор
каф. патологической анатомии, Харьковский национальный
медицинский университет, Украина.

Information about authors:

Garmash O. V., MD, PhD, Associate Professor, Therapeutic
Dentistry Department, Kharkiv National Medical University,
Ukraine.

Gubina-Vakulyk G. I., MD, PhD, DSc, Professor, Pathological
Anatomy Department, Kharkiv National Medical University,
Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 14.08.2017

Після доопрацювання / Revised: 20.12.2017

Прийнято до друку / Accepted: 09.01.2018

Список літератури

- [1] Macrosomic neonates carry increased risk of dental caries in early childhood: findings from a cohort study, the Okinawa child health study, Japan / H. Yokomichi, T. Tanaka, K. Suzuki, et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – №7. – e0133872.
- [2] High birth weight is a risk factor of dental caries increment during adolescence in Sweden / A. Julihn, U. Molund, E. Drevsäter, T. Modéer // *Dent. J.* – 2014. – Vol. 2. – №3. – P. 118–133.
- [3] Гармаш О.В. Стоматологические аспекты синдрома задержки внутриутробного развития в анамнезе у детей дошкольного возраста / О.В. Гармаш, Р.С. Назарян, Е.Н. Будрейко // *Світ медицини та біології*. – 2013. – №3. – С. 89–92.
- [4] Garmash O. An eruption pattern of deciduous teeth in children born with fetal macrosomia during the first year of life / O. Garmash // *Georgian medical news*. – 2017. – №2(263). – С. 14–23.
- [5] Сорокина А.В. Крупный плод: мифы и реальность / А.В. Сорокина // *Российский вестник акушера-гинеколога*. – 2013. – Т. 13. – №4. – С. 86–88.
- [6] Хурасева А.Б. Репродуктивное здоровье женщин, родившихся с полярными значениями массы тела / А.Б. Хурасева // *Міжнародний ендокринологічний журнал*. – 2010. – №8. – С. 106–115.
- [7] Godfrey K.M. The long-term effects of prenatal development on growth and metabolism / K.M. Godfrey, H.M. Inskip, M.A. Hanson // *Semin. Reprod. Med.* – 2011. – Vol. 29. – №3. – P. 257–265.
- [8] Хоменко Л.О. Стоматологічне здоров'я дітей України, реальність, перспектива / Л.О. Хоменко // *Науковий вісник національного медичного університету ім. О.О. Богомольця : матеріали конференції «Стоматологічне здоров'я – дітям України» (28–29 вересня 2007 р.)*. – К., 2007. – С. 11–14.
- [9] Neonatal macrosomia is an independent risk factor for adult metabolic syndrome / G.M. Hermann, L.M. Dallas, S.E. Haskell, R.D. Roghair // *Neonatology*. – 2010. – Vol. 98. – №3. – P. 238–244.
- [10] Pearse A.G.E. *Histochemistry: Theoretical and Applied* / A.G.E. Pearse. – 2nd edition. – London: J & A Churchill, 1960. – 998 p.
- [11] Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, 1969. – 425 с.
- [12] Саркисов Д.С. Микроскопическая техника: руководство / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

References

- [1] Yokomichi, H., Tanaka, T., Suzuki, K., Akiyama, T., & Yamagata, Z. (2015). Macrosomic Neonates Carry Increased Risk of Dental Caries in Early Childhood: Findings from a Cohort Study, the Okinawa Child Health Study, Japan. *PLoS ONE*, 10(7), e0133872. doi: 10.1371/journal.pone.0133872.
- [2] Julihn, A., Molund, U., Drevsäter, E., & Modéer, T. (2014) High birth weight is a risk factor of dental caries increment during adolescence in Sweden. *Dentistry Journal*, 2(3), 118–33. doi: 10.3390/dj2040118.
- [3] Garmash, O. V., Nazaryan, R. S., & Budreiko, E. A. (2013). Stomatologicheskie aspekty sindroma zaderzhki vnutritrobnogo razvitiya v anamneze u detej doshkol'nogo vozrasta [Dental aspects of the syndrom of intrauterine growth retardation in past history in preschool children]. *Svit medytsyny ta biologii*, 3, 89–92. [in Russian].
- [4] Garmash, O. V. (2017). An eruption pattern of deciduous teeth in children born with fetal macrosomia during the first year of life. *Georgian medical news*, 2(263), 14–23.
- [5] Sorokina, A. V. (2013) Krupnyy plod: mify i real'nost' [A large fetus: myths and realities]. *Rossiiskiy vestnik akushera-ginekologa*, 13(4), 86–88. [in Russian].
- [6] Khuraseva, A. B. (2010). Reproduktivnoe zdorov'e zhenshin, rodivshisya s polyarnymi znacheniyami massy tela [Reproductive health of women born with polar body weight]. *Mizhnarodnyi endokrynologichnyi zhurnal*, 8, 106–115. [in Russian].

- [7] Godfrey, K. M., Inskip, H. M., & Hanson, M. A. (2011). The long term effects of prenatal development on growth and metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*, 29(3), 257–265. doi: 10.1055/s-0031-1275518.
- [8] Khomenko, L. O. (2007) Stomatologichne zdorovia ditei Ukrainy, realnist, perspektyva [Dental health of children of Ukraine, reality, prospect]. *Naukovyi visnyk natsionalnoho medychnoho universytetu im. O.O. Bohomoltsia. Proceedings of the Conference «Stomatologichne zdorovia – ditiam Ukrainy»*, (P. 11–14). Kyiv. [in Ukrainian].
- [9] Hermann, G. M., Dallas, L. M., Haskell, S. E., & Roghair, R. D. (2010). Neonatal macrosomia is an independent risk factor for adult metabolic syndrome. *Neonatology*, 98(3) 238–244. doi: 10.1159/000285629.
- [10] Pearse, A. G. E. (1960). *Histochemistry: Theoretical and Applied*. London.
- [11] Merkulov, G. A. (1969). *Kurs patogistologicheskoy tekhniki [Course of patogistologi techniques]*. Moscow. [in Russian].
- [12] Sarkisov, D. S., & Perov, Yu. L. (1996). *Mikroskopicheskaya tekhnika (rukovodstvo dlya vrachej i laborantov) [Microscopic technique (manual for physicians and laboratory technicians)]*. Moscow: Zdorov'e. [In Russian].

Development of multivariate models for the verification of short-term vital and functional prognosis in patients with hemorrhagic hemispheric stroke in the onset of the disease

A. A. Kuznietsov

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

Key words:

cerebral hemorrhage, X-Ray tomography, inflammation, mortality, prognosis.

Pathologia

2018; 15 (1), 88–94

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.128488

E-mail:

titus3.05@gmail.com

The main purpose of the study was to develop multivariate models for the verification of short-term vital and functional prognosis in patients with hemorrhagic hemispheric stroke in the onset of the disease.

Materials and methods. A prospective, cohort, comparative study was conducted in 203 patients with spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage (SSICH) (121 men and 82 women, mean age 65.1 ± 0.8 years), who were hospitalized within the first 12 hours since the onset of the disease and received conservative therapy. National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score, Glasgow Coma Scale score, Full Outline of UnResponsiveness Scale score, intracerebral hemorrhage volume, displacement of the septum pellucidum and pineal gland, white blood cell count (WBCC), neutrophil count, lymphocyte count, monocyte count, neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) were detected upon admission to the hospital. The functional outcome (FO) of the acute period of the disease was assessed on the 21st day in accordance with the modified Rankin Scale (mRS), whereas >3 points on this scale were considered as an unfavourable FO, ≤ 3 points were considered as a favourable FO. Binary logistic regression method and ROC-analysis were used for the elaboration of prediction criteria.

Results of research. Lethal outcome (12.3 %), unfavourable FO (37.5 %) and favourable FO (51.2 %) were registered in the structure of acute period outcomes of the disease. In accordance with the data of multivariate regression analysis it was determined that admission NIHSS score >16 (Se = 68.0 %, Sp = 93.3 %), septum pellucidum displacement >3 mm (Se = 84.0 %, Sp = 74.2 %) and admission WBCC >8 600 cells/ μ L (Se = 84.0 %, Sp = 62.4 %) are independently associated with an increased risk of the lethal outcome of the acute period of SSICH by 12.8 (12.8–26.8) ($P < 0.0001$), 10.7 (3.8–29.8) ($P < 0.0001$) and 6.9 (2.4–19.3) ($P = 0.0003$) times respectively. Admission NIHSS score >9 (Se = 90.5 %, Sp = 66.3 %), septum pellucidum displacement ≥ 1 mm (Se = 71.6 %, Sp = 71.2 %) and ANLR >2.92 (Se = 86.5 %, Sp = 36.5 %) were independently associated with an increased risk of the unfavourable FO of the acute period of SSICH by 4.9 (2.9–8.3) ($P < 0.0001$), 2.9 (2.6–3.3) ($P < 0.0001$) and 2.4 (2.1–2.7) ($P < 0.0001$) times respectively.

Conclusions. Multivariate models for lethal outcome prognosis (AUC = 0.94 (0.89–0.97), $P < 0.01$) and unfavourable functional outcome of SSICH prediction (AUC = 0.88 (0.83–0.93), $P < 0.01$) were elaborated, which take into consideration the combination of clinical, neuroimaging data and the severity of inflammatory activation in the onset of the disease. Informativeness of elaborated multivariate models, which integrated independent predictors, statistically exceeds informativeness of separate predictors usage in verification of the vital and functional prognosis of SSICH acute period outcome.

Ключові слова:

внутрішньо-мозковий крововилив, комп'ютерна томографія, запалення, смертність, прогноз.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 88–94

Розробка мультиваріантних моделей для визначення короткострокового прогнозу в пацієнтів із геморагічним півкульовим інсультом у дебюті захворювання

A. A. Кузнєцов

Мета роботи – розробити мультиваріантні моделі для визначення короткострокового прогнозу в пацієнтів із геморагічним півкульовим інсультом у дебюті захворювання.

Матеріали та методи. Виконали проспективне, когортне, порівняльне дослідження 203 пацієнтів із ССВМК (121 чоловік і 82 жінки, середній вік – $65,1 \pm 0,8$ року), які були госпіталізовані в перші 12 годин від дебюту захворювання та отримували консервативну терапію. Під час госпіталізації виконали тестування за клінічними шкалами оцінювання вираженості неврологічного дефіциту (National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS), Glasgow Coma Scale, Full Outline of Unresponsiveness), визначили об'єм осередку ураження, зсув прозорої перетинки й епіфіза, абсолютний вміст лейкоцитів (АВЛ), нейтрофілів, лімфоцитів, моноцитів у периферичній крові та нейтрофіл-лімфоцитарне співвідношення (НЛС). Функціональний вихід (ФВ) оцінювали на 21 день захворювання за модифікованою шкалою Ренкіна (мШР), при цьому значення >3 балів розглядали як несприятливий, ≤ 3 – як сприятливий ФВ. Для розроблення критеріїв прогнозування використали метод бінарної логістичної регресії.

Результати. У структурі наслідків гострого періоду захворювання зареєстрували летальний вихід (12,3 %), несприятливий (37,5 %) та сприятливий (51,2 %) ФВ. У результаті мультиваріантного регресійного аналізу встановили, що значення сумарного бала за NIHSS >16 (Se = 68,0 %, Sp = 93,3 %), зміщення прозорої перегородки >3 мм (Se = 84,0 %, Sp = 74,2 %) та АВЛ >8 600 кл/мкл (Se = 84,0 %, Sp = 62,4 %) в дебюті ССВМК незалежно асоційовані з підвищеним ризиком летального наслідку гострого періоду захворювання в 12,8 (12,8–26,8) ($p < 0,0001$), 10,7 (3,8–29,8) ($p < 0,0001$) та 6,9 (2,4–19,3) ($p = 0,0003$) рази відповідно. Значення сумарного бала за NIHSS >9 (Se = 90,5 %, Sp = 66,3 %), зміщення прозорої перегородки ≥ 1 мм (Se = 71,6 %, Sp = 71,2 %) та НЛС $>2,92$ (Se = 86,5 %, Sp = 36,5 %) у дебюті ССВМК незалежно асоційовані з підвищеним ризиком несприятливого функціонального виходу гострого періоду захворювання в 4,9 (2,9–8,3) ($p < 0,0001$), 2,9 (2,6–3,3) ($p < 0,0001$) та 2,4 (2,1–2,7) ($p < 0,0001$) рази відповідно.

Висновки. Розробили мультиваріантні математичні моделі для прогнозування летального (AUC = 0,94 (0,89–0,97), $p < 0,01$; точність прогнозування = 91,7 %) та функціонального виходу гострого періоду ССВМК (AUC = 0,88 (0,83–0,93),

$p < 0,01$), які враховують сукупність результатів клініко-нейровізуалізаційного дослідження та вираженість запальної активації в дебюті захворювання, при цьому інтеграція незалежних предикторів у структурі мультиваріантних моделей дає можливість підвищити точність визначення вітального та функціонального прогнозу.

Разработка мультивариантных моделей для определения краткосрочного витального и функционального прогноза у пациентов с геморрагическим полушарным инсультом в дебюте заболевания

А.А. Кузнецов

Цель работы – разработать мультивариантные модели для определения краткосрочного витального и функционального прогноза у пациентов с геморрагическим полушарным инсультом в дебюте заболевания.

Материалы и методы. Проведено проспективное, когортное, сравнительное исследование 203 пациентов с ССВМК (121 мужчина и 82 женщины, средний возраст – $65,1 \pm 0,8$ года), которые были госпитализированы в первые 12 часов от дебюта заболевания и получали консервативную терапию. При поступлении проводили тестирование по клиническим шкалам оценки выраженности неврологического дефицита (National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS), Glasgow Coma Scale, Full Outline of Unresponsiveness), определяли объем очага поражения, смещение прозрачной перегородки и эпифиза, абсолютное содержание лейкоцитов (АСЛ), нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов в периферической крови и нейтрофил-лимфоцитарное соотношение (НЛС). Функциональный исход (ФИ) оценивали на 21 сутки заболевания по модифицированной шкале Рэнкина (мШР), при этом значения >3 балла рассматривали в качестве неблагоприятного ФИ, ≤ 3 – благоприятного. Для разработки критериев прогнозирования использовали метод бинарной логистической регрессии.

Результаты. В структуре исходов острого периода заболевания зарегистрированы летальный исход (12,3 %), неблагоприятный (37,5 %) и благоприятный (51,2 %) ФИ. В результате мультивариантного регрессионного анализа установлено, что значение суммарного балла по NIHSS >16 (Se = 68,0 %, Sp = 93,3 %), смещение прозрачной перегородки >3 мм (Se = 84,0 %, Sp = 74,2 %) и АСЛ >8 600 кл/мкл (Se = 84,0 %, Sp = 62,4 %) в дебюте ССВМК независимо ассоциированы с повышенным риском летального исхода острого периода заболевания в 12,8 (12,8–26,8) ($p < 0,0001$), 10,7 (3,8–29,8) ($p < 0,0001$) и 6,9 (2,4–19,3) ($p = 0,0003$) раза соответственно. Значение суммарного балла по NIHSS >9 (Se = 90,5 %, Sp = 66,3 %), смещение прозрачной перегородки ≥ 1 мм (Se = 71,6 %, Sp = 71,2 %) и НЛС $>2,92$ (Se = 86,5 %, Sp = 36,5 %) в дебюте ССВМК независимо ассоциированы с повышенным риском неблагоприятного функционального исхода острого периода заболевания в 4,9 (2,9–8,3) ($p < 0,0001$), 2,9 (2,6–3,3) ($p < 0,0001$) и 2,4 (2,1–2,7) ($p < 0,0001$) раза соответственно.

Выводы. Разработаны мультивариантные математические модели для прогнозирования летального (AUC = 0,94 (0,89–0,97), $p < 0,01$; точность прогнозирования = 91,7 %) и функционального исхода острого периода ССВМК (AUC = 0,88 (0,83–0,93), $p < 0,01$), которые учитывают совокупность результатов клинико-нейровізуалізаційного дослідження і вираженість запальної активації в дебюті захворювання, при цьому інтеграція незалежних предикторів в структурі мультиваріантних моделей дозволяє підвищити точність визначення вітального і функціонального прогнозу.

Ключевые слова: внутримозговое кровоизлияние, компьютерная томография, воспаление, смертность, прогноз.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 88–94

Spontaneous hypertensive intracerebral hemorrhage (ICH) is a global problem of modern medicine. A high social significance of the disease is due to high rates of adults' mortality and disability in most countries of the world [9].

One of the ways to increase the effectiveness of treatment for patients with spontaneous supratentorial cerebral hemorrhage (SSICH) is the earliest verification of the individual vital and functional prognosis of the acute period outcome of the disease, which would serve as the basis for a differentiated choice of the optimal treatment strategy [20]. All of the above justifies the advisability of research, which is aimed at finding parameters associated with the course and outcome of the acute period of the disease.

A significant amount of data has been currently accumulated. The data confirm the predictive value of clinical-neuroimaging criteria for the assessment of the severity in patients with SSICH (severity of neurological deficit, lesion volume, etc.) [14,16].

However, SSICH is a multi-pathogenetic process. Not only primary (in the form of direct mechanical destructive effects produced by hematoma) but also secondary

(thrombin-induced) mechanisms of brain damage act a part in its progress [7]. Among the latter, the leading role belongs to inflammatory activation. The response to ICH occurs in four distinct phases: (1) initial tissue damage and localization of inflammatory factors, (2) inflammation-driven breakdown of the blood-brain barrier, (3) recruitment of circulating inflammatory cells and subsequent secondary immunopathology, and (4) engagement of the tissue repair replies that promote tissue repair and restoration of neurologic function [3]. On the basis of experimental studies, it is convincingly shown that inflammatory macrophages and neutrophils infiltrate the central nervous system after ICH, with blood-derived macrophages, the dominant phagocyte population in the ipsilateral hemisphere from 12 hours to 7 days posthemorrhage [6–8,12]. Blood-derived macrophages and neutrophils become highly activated upon recruitment to the perihematomal region after ICH in response to cytokines such as tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta, as well as the inflammation-associated factors thrombin, heme, and HMGB1. These inflammatory signals bind to the cell surface receptors on myeloid cells, resulting in NF- κ B activation and production of inflammatory cytokines,

reactive oxygen species, and nitric oxide that contribute to tissue damage [9,13].

A number of clinical studies revealed the relationship between some hematological markers of inflammatory activation in the onset of ICH (increasing of leukocyte count, neutrophil count, monocyte count, neutrophil-to-lymphocyte ratio) and the severity of cerebral syndrome, the lesion size, the presence of intraventricular hemorrhage, the early neurologic deterioration due to hematoma expansion [2,10,15,16].

All of the above mentioned suggests that the assessment of the severity of inflammatory activation with the use of hematological markers in combination with clinical and neuroimaging data will make possible the integration of their prognostic value and will contribute to the development of informative integral criteria for the verification of the vital and functional prognosis of SSICH acute period outcome in the very onset of the disease.

The purpose of this study

To develop multivariate models for the verification of short-term vital and functional prognosis in patients with hemorrhagic hemispheric stroke in the onset of the disease.

Materials and methods

A prospective, cohort, comparative study was conducted in 203 patients with SSICH (121 men and 82 women, mean age 65.1 ± 0.8 years). They were hospitalized within the first 12 hours since the onset of the disease and received conservative therapy at Brain circulation disorders Department of the Municipal Institution "City Clinical Hospital No.6". The diagnosis was established on the basis of clinical and neuroimaging criteria. Clinical and neurological study included an assessment in accordance with the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS), Glasgow Coma Scale (GCS), Full Outline of UnResponsiveness Scale (FOUR) upon admission to the hospital (NIHSS0, GCS0 and FOUR0) and in the course of the disease. Neuroimaging study was carried out with the help of Computed Tomography Scan "Siemens Somatom Spirit" (Germany). The severity of the dislocation syndrome was estimated in accordance with the displacement of the septum pellucidum and pineal gland. The lesion size (ICH volume) was calculated with the help of the following formula: $ICH \text{ volume (mL)} = (A * B * C) / 2$, where A, B, C correspond to linear lesion size (cm). Upon admission to the hospital, laboratory samples of whole blood from the ulnar veins were taken into a test tube containing EDTA. White blood cell counts were analyzed in the hematology laboratory of Municipal Institution "City Clinical Hospital No.6" as standard of care. Admission white blood cell count (AWBCC), admission neutrophil count (ANC), admission lymphocyte count (ALC), admission monocyte count (AMC), admission neutrophil percent (ANP), admission lymphocyte percent (ALP), admission monocyte percent (AMP) and admission neutrophil-to-lymphocyte ratio (ANLR) were detected.

The study excluded patients who have acute disorders of cerebral circulation (transient ischemic attacks or/and strokes) in the anamnesis, indications for neurosur-

gical intervention, oncological and / or decompensated somatic pathology, clinical criteria of infectious and inflammatory diseases in the onset of SSICH. The cases of extracerebral cause of death (acute myocardial infarction, pulmonary embolism, etc.) in accordance with the autopsy results were also excluded.

The functional outcome of the acute period of the disease was assessed on the 21st day in accordance with the modified Rankin Scale (mRS), whereas >3 points on this scale were considered as an unfavourable functional outcome, ≤ 3 points were considered as a favourable functional outcome.

Statistical analysis of the results was carried out with the help of Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA, series number AXXR712D833214FAN5) and MedCalc (version 16.4). The distribution normality of studied traits was estimated on the basis of Shapiro–Wilk criterion. Descriptive statistics were presented in the form of mean and standard error of mean ($M \pm m$) for values with normal distribution and in the form of median (Me) and interquartile range (Q_{25} – Q_{75}) for parameters with the distribution that differs from normal. To determine intergroup differences, the Mann-Whitney test was used. Binary logistic regression method was used for the elaboration of prediction criteria. To determine independent predictors, factors that had significant predictive value throughout univariate analysis were included step by step into the multivariate model. The determination of prediction criteria in the form of values of obtained binary logistic regression equations with the optimum sensitivity (Se) and specificity (Sp) was carried out on the basis of the ROC analysis. Comparison of prognostic criteria informativeness was made on the ground of ROC-analysis. For evaluation of the links between quantitative signs Fisher's exact test and Chi-square test were used. Odds ratio (OR) and relative risk (RR) were calculated. Statistically significant were the results with level $P < 0.05$.

Results of research

The values of studied indexes in patients upon admission to the hospital are presented in *Table 1*.

Secondary intraventricular hemorrhage (IVH) was verified in 127 (62.6 %) cases. Lethal outcome (12.3 %), unfavourable functional outcome in the form of >3 points according to the modified Rankin scale on the 21st day of SSICH (37.5 %) and favourable functional outcome in the form of ≤ 3 points (51.2 %) were registered in the structure of acute period outcomes of the disease. Lethal outcome was linked with hematoma progression which was confirmed by clinical neurological investigation (steady reduction of GCS score and FOUR score during first 3–5 days from the disease onset) and autopsy.

It was determined that patients with a lethal outcome in the acute period of SSICH had higher NIHSS score, ICH volume, septum pellucidum displacement, pineal gland displacement, AWCBC, ANC and AMC in the onset of the disease, while GCS score, FOUR score and ALP in this cohort of patients were statistically significantly lower (*Table 2*).

The frequency of the secondary intraventricular hemorrhage (IVH) was higher in patients with lethal outcome

(88.0 % versus 59.0 %, Fisher's exact test $P < 0.0001$). On the basis of univariate logistic regression analysis, the following indicators were associated with the risk of a lethal outcome of SSICH acute period: admission NIHSS score, admission GCS score, admission FOUR score, ICH volume, septum pellucidum displacement (SPD), pineal gland displacement, presence of the secondary IVH, AWBCC, ANC and AMC (Table 3).

In accordance with the data of multivariate regression analysis it was determined that independent predictors of the lethal outcome of SSICH acute period are: admission NIHSS score (OR (95 % CI) = 1.20 (1.07–1.34), $P = 0.0016$), septum pellucidum displacement (OR (95 % CI) = 1.30 (1.16–1.53), $P = 0.0009$) and AWBCC (OR (95 % CI) = 1.22 (1.03–1.44), $P = 0.0234$).

The optimal cut-off values of the admission NIHSS score >16 (Se = 68.0 %, Sp = 93.3 %), septum pellucidum displacement >3 mm (Se = 84.0 %, Sp = 74.2 %) and AWBCC >8 600 cells/ μ L (Se = 84.0 %, Sp = 62.4 %) were determined as for the lethal outcome prognosis of SSICH acute period.

The frequency distribution of lethal outcome of the SSICH acute period in terms of NIHSS score, septum pellucidum displacement and AWBCC is shown in Table 4.

As a result, the admission NIHSS score >16 , septum pellucidum displacement >3 mm and AWBCC >8 600 cells/ μ L are associated with an increased risk of the lethal outcome of the acute period of SSICH by 12.8 (12.8–26.8) ($P < 0.0001$), 10.7 (3.8–29.8) ($P < 0.0001$) and 6.9 (2.4–19.3) ($P = 0.0003$) times respectively.

For the purpose of acute period of SSICH lethal outcome predictors prognostic value integration a multivariate mathematical model was elaborated in the form of a binary logistic regression equation, as follows: $\beta_1 = 0.181$ [admission NIHSS score] + 0.266 [septum pellucidum displacement (mm)] + 0.000196 [AWBCC (cells/ μ L)] – 7.75.

The approximation accuracy of the interrelation between predictors and dependent variable constituted 91.7% (Chi-square = 74.6, $P < 0.0001$; Hosmer & Lemeshow test $P = 0.72$).

It was detected that informativeness of multivariate mathematic model statistically exceeds informativeness of separate predictors usage in prognosis of SSICH lethal outcome ($AUC_{\beta_1} = 0.94$ (0.89–0.97) vs $AUC_{NIHSS0} = 0.85$ (0.80–0.90), $P = 0.0442$; $AUC_{\beta_1} = 0.94$ (0.89–0.97) vs $AUC_{SPD} = 0.84$ (0.78–0.88), $P = 0.0253$; $AUC_{\beta_1} = 0.94$ (0.89–0.97) vs $AUC_{AWBCC} = 0.79$ (0.73–0.85), $P = 0.0008$).

On the basis of the ROC-analysis it was determined that the value $\beta_1 > -1.27$ is the predictor of the lethal outcome of SSICH acute period with sensitivity levels 84.0 % and specificity levels 94.9 %.

It was determined that patients with an unfavourable functional outcome in SSICH acute period were statistically distinguished by the following criteria in the onset of the disease: age, admission NIHSS score, admission GCS score, admission FOUR score, ANC, ALC, ANP, ALP, ANLR. No intergroup differences were found in relation to AWBCC level (Table 5).

The frequency of secondary intra-cerebral hemorrhage was higher in patients with unfavourable functional outcome (71.2 % versus 51.0 %, Chi-square test $P = 0.0109$).

Table 1. Values of studied indexes in patients upon admission to the hospital (M \pm m)

Index, Unit	Value
Admission NIHSS score	11.20 \pm 0.44
Admission GCS score	13.10 \pm 0.20
Admission FOUR score	14.50 \pm 0.18
ICH volume, mL	20.00 \pm 1.66
Septum pellucidum displacement, mm	2.80 \pm 0.26
Pineal gland displacement, mm	2.30 \pm 0.22
AWBCC, cells/ μ L	8 500 \pm 210
ANC, cells/ μ L	6 700 \pm 200
ALC, cells/ μ L	1 400 \pm 40
AMC, cells/ μ L	400 \pm 20
ANP, %	76.50 \pm 0.64
ALP, %	17.70 \pm 0.55
AMP, %	5.00 \pm 0.20
ANLR	6.20 \pm 0.39

Table 2. Analysis of intergroup differences between indexes in patients in the onset of SSICH versus the acute period outcome of the disease, Me (Q_{25} – Q_{75})

Indexes	Lethal outcome (n = 25)	Non-lethal outcome (n = 178)	P
Age, years	61.0 (52.0–75.0)	66.0 (58.0–75.0)	0.2004
Admission NIHSS score	20.0 (15.0–28.0)	9.0 (6.0–14.0)	<0.0001
Admission GCS score	10.0 (5.0–13.0)	15.0 (14.0–15.0)	<0.0001
Admission FOUR score	13.0 (7.0–14.0)	16.0 (15.0–16.0)	<0.0001
ICH volume, mL	55.4 (27.1–78.0)	9.6 (4.4–20.7)	<0.0001
Septum pellucidum displacement, mm	10.0 (4.0–12.0)	0.0 (0.0–4.0)	<0.0001
Pineal gland displacement, mm	5.0 (3.0–10.0)	0.0 (0.0–3.0)	<0.0001
AWBCC, cells/ μ L	10 400 (8 800–13 800)	7 700 (6 300–9 600)	<0.0001
ANC, cells/ μ L	9 000 (6 300–10 800)	5 800 (4 400–7 800)	<0.0001
ALC, cells/ μ L	1 400 (1 100–2 000)	1 300 (1 000–1 700)	0.2682
AMC, cells/ μ L	500 (300–900)	300 (200–500)	0.0008
ANP, %	82.0 (72.0–87.0)	76.0 (70.0–82.0)	0.0645
ALP, %	12.0 (9.0–18.0)	18.0 (12.0–24.0)	0.0214
AMP, %	5.0 (4.0–7.0)	4.0 (3.0–6.0)	0.2443
ANLR	7.00 (3.83–9.89)	4.19 (2.92–6.54)	0.0268

Table 3. Dependent and independent predictors of lethal outcome of SSICH acute period (univariate and multivariate logistic regression models)

Indexes	Univariate logistic regression model		Multivariate logistic regression model	
	OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Admission NIHSS score	1.33 (1.21–1.45)	<0.0001	1.20 (1.07–1.34)	0.0016
Admission GCS score	0.66 (0.58–0.76)	<0.0001		
Admission FOUR score	0.65 (0.55–0.76)	<0.0001		
ICH volume, mL	1.06 (1.04–1.08)	<0.0001		
Septum pellucidum displacement, mm	1.49 (1.31–1.70)	<0.0001	1.30 (1.16–1.53)	0.0009
Pineal gland displacement, mm	1.51 (1.30–1.75)	<0.0001		
Presence of the secondary IVH	3.56 (1.17–10.82)	0.0124		
AWBCC, cells/ μ L	1.35 (1.18–1.54)	<0.0001	1.22 (1.03–1.44)	0.0234
ANC, cells/ μ L	1.32 (1.16–1.51)	<0.0001		
AMC, cells/ μ L	8.15 (2.45–26.80)	0.0005		

Table 4. Frequency distribution of lethal outcome of the acute CHSS period in terms of NIHSS score, septum pellucidum displacement and AWBCC

Parameters	Value	Number of patients	Lethal outcome of the SSICH acute period (%)
Admission NIHSS score	>16	29	58.6
	≤16	174	4.6
Septum pellucidum displacement, mm	>3	67	32.3
	≤3	136	2.9
AWBCC, cells/μL	>8 600	88	23.9
	≤8 600	115	3.5

Table 5. Analysis of intergroup differences of studied indexes in patients in the onset of SSICH in comparison with the functional outcome of the acute period of the disease, Me (Q₂₅–Q₇₅).

Indexes	mRS score ≤3 on the 21 st day of SSICH (n = 104)	mRS score >3 on the 21 st day of SSICH (n = 74)	P
Age, years	63.0 (57.0–73.0)	71.0 (60.3–77.0)	0.0016
Admission NIHSS score	7.0 (5.0–9.3)	14.0 (10.3–16.0)	<0.0001
Admission GCS score	15.0 (14.0–15.0)	14.0 (12.0–15.0)	<0.0001
Admission FOUR score	16.0 (15.0–16.0)	15.0 (14.0–16.0)	<0.0001
ICH volume, mL	6.5 (2.5–14.1)	13.5 (6.2–29.7)	0.0001
Septum pellucidum displacement, mm	0.0 (0.0–1.3)	3.0 (0.0–5.0)	<0.0001
Pineal gland displacement, mm	0.0 (0.0–2.0)	2.0 (0.0–4.0)	<0.0001
AWBCC, cells/μL	7 400 (6 100–9 200)	8 000 (6 800–9 800)	0.0808
ANC, cells/μL	5 500 (4 200–7 400)	6 300 (4 800–8 300)	0.0291
ALC, cells/μL	1 400 (1 100–1 800)	1 100 (900–1 500)	0.0015
AMC, cells/μL	300 (200–500)	300 (200–500)	0.8065
ANP, %	75.0 (67.8–79.3)	79.0 (73.0–86.8)	0.0009
ALP, %	19.0 (14.0–25.0)	15.5 (10.0–21.0)	0.0006
AMP, %	5.0 (3.0–7.0)	4.0 (3.0–6.0)	0.2879
ANLR	3.92 (2.74–5.61)	5.28 (3.39–8.70)	0.0006

Table 6. Dependent and independent predictors of the unfavourable functional outcome of SSICH acute period in the form of mRS score t3 on the 21st day of the disease (univariate and multivariate logistic regression models)

Indexes	Univariate logistic regression model		Multivariate logistic regression model	
	OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Age, years	1.04 (1.01–1.07)	0.0044		
Admission NIHSS score	1.42 (1.28–1.57)	<0.0001	1.34 (1.20–1.50)	<0.0001
Admission GCS score	0.80 (0.69–0.93)	0.004		
Admission FOUR score	0.81 (0.66–0.99)	0.0405		
ICH volume, mL	1.04 (1.02–1.07)	0.0005		
Septum pellucidum displacement, mm	1.42 (1.23–1.64)	<0.0001	1.20 (1.02–1.41)	0.0309
Pineal gland displacement, mm	1.46 (1.24–1.72)	<0.0001		
Presence of the secondary IVH	4.22 (2.15–8.30)	<0.0001		
ANC, cells/μL	1.16 (1.03–1.31)	0.0135		
ALC, cells/μL	0.35 (0.18–0.66)	0.0013		
ANP, %	1.06 (1.03–1.10)	0.001		
ALP, %	0.92 (0.88–0.96)	0.0002		
ANLR	1.18 (1.08–1.29)	0.0004	1.10 (1.00–1.21)	0.0472

On the basis of univariate logistic regression analysis, it was determined that the following indexes are associated with the risk of unfavourable functional outcome of SSICH acute period: age, admission NIHSS score, admission GCS score, admission FOUR score, ICH volume, septum pellucidum displacement, pineal gland displacement, presence of the secondary IVH, ANC, ALC, ANP, ALP and ANLR (Table 6).

In accordance with the data of multivariate regression analysis it was determined that independent predictors of the unfavourable functional outcome of SSICH acute period are: admission NIHSS score (OR (95 % CI) = 1.34 (1.20–1.50), P < 0.0001), septum pellucidum displacement (OR (95 % CI) = 1.20 (1.02–1.41), P = 0.0309) and ANLR (OR (95 % CI) = 1.10 (1.00–1.21), P = 0.0472).

The optimal cut-off values of the admission NIHSS score >9 (Se = 90.5 %, Sp = 66.3 %), septum pellucidum displacement ≥1 mm (Se = 71.6 %, Sp = 71.2 %) and ANLR > 2.92 (Se = 86.5 %, Sp = 36.5 %) were determined as for the unfavourable functional outcome prognosis of SSICH acute period.

The frequency distribution of unfavourable functional outcome of the SSICH acute period in terms of NIHSS score, septum pellucidum displacement and ANLR is shown in Table 7.

As a result, the admission NIHSS score >9, septum pellucidum displacement ≥1 mm and ANLR >2.92 are associated with an increased risk of the unfavourable functional outcome of the acute period of SSICH by 4.9 (2.9–8.3) (P < 0.0001), 2.9 (2.6–3.3) (P < 0.0001) and 2.4 (2.1–2.7) (P < 0.0001) times respectively.

For integration of the prognostic values of predictors of SSICH acute period unfavourable functional outcome multivariate mathematical model was elaborated in the form of a binary logistic regression equation, as follows: $\beta_2 = 0.294 \cdot [\text{admission NIHSS score}] + 0.179 \cdot [\text{septum pellucidum displacement}] + 0.096 \cdot [\text{ANLR}] - 4.27$.

The approximate accuracy of the interrelationship between predictors and dependent variable constituted 80.9 % (Chi-square = 81.46, P < 0.0001; Hosmer & Lemeshow test P = 0.24; AUC = 0.88 (0.83–0.93), P < 0.01).

It was revealed that elaborated mathematic model is statistically informatively higher than single application of separate predictors for prognosis of SSICH acute period FO (AUC_{β2} = 0.88 (0.83–0.93) vs AUC_{NIHSS0} = 0.80 (0.73–0.86), P = 0.0265; AUC_{β2} = 0.88 (0.83–0.93) vs AUC_{SPD} = 0.73 (0.66–0.80), P = 0.0008; AUC_{β1} = 0.88 (0.83–0.93) vs AUC_{ANLR} = 0.65 (0.58–0.72), P < 0.0001).

On the basis of the ROC-analysis it was determined that the value $\beta_2 > -1.51$ is the predictor of the favourable functional outcome of SSICH acute period with the sensibility levels 94.7 % and specificity levels 70.2 %.

Discussion

Thus, our study revealed higher values of admission NIHSS score, ICH volume, septum pellucidum displacement and pineal gland displacement and lower values of admission GCS score, admission FOUR score in patients with increased risks of a lethal outcome and unfavourable functional outcome of SSICH acute period. It accords with the results of other studies which prove

a high predictive value of clinical and neuroimaging parameters, reflecting the severity of primary damage of the brain tissue due to direct destructive influence of hematoma [14,16]. Among neuroimaging parameters, an independent association with a risk of death and functional disability was detected in septum pellucidum displacement, which confirms the leading role of the dislocation syndrome in the realization of unfavourable variants of SSICH acute period outcome. However, according to the results of our research the independent association between ICH volume as compared to septum pellucidum displacement and pineal gland displacement was not determined. To our opinion absence of ICH volume in the specter of independent lethal and unfavourable functional outcome predictors according to multivariate analysis testify to the limitation of the prognostic value of this parameter without taking into account the degree of perihematomal edema. The frequency of the secondary IVH was significantly higher in patients with unfavourable vital prognosis and functional prognosis of SSICH acute period outcome. However presence of the secondary IVH was not independently associated with SSICH acute period outcome.

Patients with an increased risk of lethal outcome revealed higher values of admission white blood cell count. The obtained data accord with the results of other studies. Thus, in accordance with W. Sun [et al.] (2012), leucocytosis was predictive of early neurological deterioration within the first 72 hours after ICH [16]. In a study by R. Behrouz [et al.] (2015), an inverse relationship between leukocyte count and GCS score in admission was shown. However, there was no correlation between admission leukocytosis and poor outcome at discharge, as it was not in our study [4].

On the basis of the results of our study, the up AWBCC level in patients with an increased lethal risk of SSICH acute period outcome is due to the combined ANC and AMC elevation, which accords with the results of other studies which proved the role of blood-derived neutrophils and macrophages in the course of ICH acute period. In a study by S. Lattanci [et al.] (2017), it was determined that white blood cell count, neutrophil count and neutrophil-to-lymphocyte ratio on the 1st day from ICH onset were independently associated with neurological deterioration [10]. In a study by O. Adeoye [et al.] (2014), it was determined that the higher initial white blood cell count and neutrophil count were associated with higher ICH volume, whereas AMC was not. Baseline AMC was associated with greater odds of 30-day case fatality [1]. A study by A. Morotti et al. (2016) revealed that monocyte count is associated with higher risk of hematoma expansion [11]. In a study by M.D. Hammond et al. (2014) it was discovered that after ICH, the blood-derived CCR2 + Ly6C (hi) inflammatory monocytes were trafficked into the brain, outnumbered by other leukocytes, and produced tumor necrosis factor. These findings suggest that blood-derived inflammatory monocytes and neutrophils contribute to neurological disability and secondary injury after ICH (hematoma expansion and / or cerebral edema) [6].

The results that we obtained demonstrated the interrelation between ANLR increase in patients with an

Table 7. Frequency distribution of unfavourable functional outcome of the SSICH acute period in terms of NIHSS score, septum pellucidum displacement and ANLR

Parameters	Value	Number of patients	Unfavourable functional outcome of the SSICH acute period (%)
Admission NIHSS score	>9	87	70.1
	≤9	91	14.3
Septum pellucidum displacement, mm	≥1	83	63.9
	0	95	22.1
ANLR	>2.92	130	49.2
	≤2.92	48	20.8

increased risk of lethal outcome and an unfavourable functional outcome, which accords with the results of other studies. Thus, in a study by F. Wang [et al.] (2016), NLR on the next morning the following admission was significantly higher in the patients who died (12.53 ± 9.33) than in those who survived (5.53 ± 4.68) ($P < 0.001$) [17]. A study conducted by C. Tao [et al.] (2017) revealed that higher AWBCC, ANC and NLR were independently associated with mortality and worse functional outcome. These hematological markers of inflammatory activation were correlated with admission Glasgow Coma Scale score and ICH volume [16]. At the same time, in accordance with the results of our multivariate logistic regression analysis, ANLR significance as an independent predictor was demonstrated to only verify the functional prognosis of SSICH acute period outcome. The obtained data accord with the results of a meta-analysis conducted by J. Zhang [et al.] (2017), which revealed that higher NLR was associated with a poorer functional outcome at 3 months, while higher NLR was not associated with higher risk of death at 3 months [19]. A study by A. Giede-Jeppe et al. (2017) also revealed that patients with an ANLR under the 25th percentile – compared to patients with an ANLR above the 25th percentile presented with a better clinical status, lower hematoma volumes on admission and showed a better functional outcome [5]. In our study, on the basis of the ROC analysis, it was discovered that the value of ANLR >2.92 is characterized by an optimal sensitivity and specificity ratio for the identification of patients with a favourable functional outcome of the acute period of the disease ($RR = 2.4 (2.1-2.7)$, $P < 0.0001$).

Thus, the study made it possible to confirm and clarify the diagnostic significance of some hematological markers of inflammatory activation in the onset of SSICH (increasing of AWBCC (due to the combined ANC and AMC elevation) and ANLR) for the determination of vital and functional prognosis of the acute period outcome. The most informative parameter that reflects the severity of inflammatory activation in the onset of SSICH is AWBCC for the determination of the vital prognosis of the acute period outcome of the disease, whereas ANLR is a more informative parameter for the determination of the functional outcome. Based on the research, informative multivariate mathematical models were also developed. They make it possible to identify with accuracy patients with an increased risk of a lethal outcome and an unfavourable functional outcome of the acute period of the disease in the first 24 hours from the SSICH onset. It is possible to be done on the basis of a comprehensive assessment of clin-

ical neuroimaging data and hematological markers of inflammatory activation. At the same time, mathematic models that were elaborated exceed the separate predictors on informativeness and integrate the prognostic value of them, which justifies the advisability of their use in routine clinical practice as a one of the methods of choosing the optimal treatment strategy.

Conclusions

1. Admission NIHSS score >16 (Se = 68.0 %, Sp = 93.3 %), septum pellucidum displacement >3 mm (Se = 84.0 %, Sp = 74.2 %) and AWBCC >8 600 cells/ μ L (Se = 84.0 %, Sp = 62.4 %) are independently associated with an increased risk of the lethal outcome of the acute period of SSICH by 12.8 (12.8–26.8) ($P < 0.0001$), 10.7 (3.8–29.8) ($P < 0.0001$) and 6.9 (2.4–19.3) ($P = 0.0003$) times respectively.

2. Admission NIHSS score >9 (Se = 90.5 %, Sp = 66.3 %), septum pellucidum displacement ≥ 1 mm (Se = 71.6 %, Sp = 71.2 %) and ANLR >2.92 (Se = 86.5 %, Sp = 36.5 %) were independently associated with an increased risk of the unfavourable functional outcome of the acute period of SSICH by 4.9 (2.9–8.3) ($P < 0.0001$), 2.9 (2.6–3.3) ($P < 0.0001$) and 2.4 (2.1–2.7) ($P < 0.0001$) times respectively.

3. Multivariate model for SSICH acute period lethal outcome prediction was elaborated, which takes into account admission NIHSS score, septum pellucidum displacement, AWBCC (AUC = 0.94 (0.89–0.97), $P < 0.01$; predictive accuracy = 91.6 %) and exceeds informativeness of the predictors in case of their single use.

4. Multivariate model for SSICH acute period functional outcome prediction was elaborated, which takes into account admission NIHSS score, septum pellucidum displacement, ANLR (AUC = 0.88 (0.83–0.93), $P < 0.01$; predictive accuracy = 81.5 %) and exceeds informativeness of the predictors in case of their single use.

The perspective for the further scientific research is the elaboration of criteria for the prediction of the course of SSICH acute period on the basis of the evaluation of the dynamics of inflammatory activation markers.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Information about author:

Kuznietsov A. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Nervous Diseases, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Відомості про автора:

Кузнєцов А. А., канд. мед. наук, доцент каф. нервових хвороб, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторе:

Кузнєцов А. А., канд. мед. наук, доцент каф. нервных болезней, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 19.02.2018

Після доопрацювання / Revised: 26.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 02.03.2018

References

- [1] Adeoye, O., Walsh, K., Woo, J. G., Haverbusch, M., Moomaw, C. J., Broderick, J. P., et al. (2014). Peripheral monocyte count is associated with case fatality after intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 23(2), e107–e111. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.09.006.
- [2] Agnihotri, S., Czap, A., Staff, I., Fortunato, G., & McCullough, L. D. (2011). Peripheral leukocyte counts and outcomes after intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation*, 8, 160. doi: 10.1186/1742-2094-8-160.
- [3] Askenase, M. H., & Sansing, L. H. (2016). Stages of the Inflammatory Response in Pathology and Tissue Repair after Intracerebral Hemorrhage. *Seminars in neurology*, 36(3), 288–297. doi: 10.1055/s-0036-1582132.
- [4] Behrouz, R., Hafeez, S., & Miller, C. M. (2015). Admission Leukocytosis in Intracerebral Hemorrhage: Associated Factors and Prognostic Implications. *Neurocrit Care*, 23(3), 370–373. doi: 10.1007/s12028-015-0128-7.
- [5] Giede-Jeppe, A., Bobinger, T., Gerner, S. T., Sembill, J. A., Sprngel, M. I., Beuscher, V. D., et al. (2017). Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Is an Independent Predictor for In-Hospital Mortality in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*, 44(1–2), 26–34. doi: 10.1159/000468996.
- [6] Hammond, M. D., Taylor, R. A., Mullen, M. T., Ai, Y., Aguila, H. L., Mack, M., Kasner, S. E., et al. (2014). CCR2+ Ly6C(hi) inflammatory monocyte recruitment exacerbates acute disability following intracerebral hemorrhage. *J Neurosci*, 34(11), 3901–3909. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4070-13.2014.
- [7] Hammond, M. D., Ai, Y., & Sansing, L. H. (2012). Gr1+ Macrophages and Dendritic Cells Dominate the Inflammatory Infiltrate 12 Hours After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Transl Stroke Res*, 3(1), 125–131. doi: 10.1007/s12975-012-0174-9.
- [8] Hammond, M. D., Ambler, W. G., Ai, Y., & Sansing, L. H. (2014). $\alpha 4$ integrin is a regulator of leukocyte recruitment after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 45(8), 2485–2487. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005551.
- [9] Keep, R. F., Hua, Y., & Xi, G. (2012). Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol.*, 11(8), 720–731. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70104-7.
- [10] Lattanzi, S., Cagnetti, C., Provinciali, L., & Silvestrini, M. (2017). Neutrophil-to-lymphocyte ratio and neurological deterioration following acute cerebral hemorrhage. *Oncotarget*, 8(34), 57489–57494. doi: 10.18632/oncotarget.15423.
- [11] Morotti, A., Phuah, C. L., Anderson, C. D., Jessel, M. J., Schwab, K., Ayres, A. M., et al. (2016). Leukocyte Count and Intracerebral Hemorrhage Expansion. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 47(6), 1473–1478. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.013176.
- [12] Mracsko, E., Javidi, E., Na, S. Y., Kahn, A., Liesz, A., & Veltkamp, R. (2014). Leukocyte invasion of the brain after experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*, 45(7), 2107–2114. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005801.
- [13] Mracsko, E., & Veltkamp, R. (2014). Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage. *Front Cell Neurosci*, 8, 388. doi: 10.3389/fncel.2014.00388.
- [14] Spina, S., Marzorati, C., Vargiolu, A., Magni, F., Riva, M., Rota, M., et al. (2017). Intracerebral hemorrhage in intensive care unit: early prognostication fallacies. A single center retrospective study. *Minerva Anestesiol.* doi: 10.23736/S0375-9393.17.12225-X.
- [15] Sun, W., Peacock, A., Becker, J., Phillips-Bute, B., Laskowitz, D. T., & James, M. L. (2012). Correlation of leukocytosis with early neurological deterioration following supratentorial intracerebral hemorrhage. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 19(8), 1096–1100. doi: 10.1016/j.jocn.2011.11.020.
- [16] Tao, C., Hu, X., Wang, J., Ma, J., Li, H., & You, C. (2017). Admission neutrophil count and neutrophil-to-lymphocyte ratio predict 90-day outcome in intracerebral hemorrhage. *Biomark Med*, 11(1), 33–42. doi: 10.2217/bmm-2016-0187.
- [17] Walsh, K. B., Sekar, P., Langefeld, C. D., Moomaw, C. J., Elkind, M. S., Boehme, A. K., et al. (2015). Monocyte Count and 30-Day Case Fatality in Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 46(8), 2302–2304. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009880.
- [18] Wang, F., Hu, S., Ding, Y., Ju, X., Wang, L., Lu, Q., & Wu, X. (2016). Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and 30-Day Mortality in Patients with Acute Intracerebral Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 25(1), 182–187. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.09.013.
- [19] Zhang, J., Cai, L., Song, Y., Shan, B., He, M., Ren, Q., et al. (2017). Prognostic role of neutrophil lymphocyte ratio in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Oncotarget*, 8(44), 77752–77760. doi: 10.18632/oncotarget.20776.
- [20] Mattishent, K., Kwok, C. S., Ashkir, L., Pelpola, K., Myint, P. K., Loke, Y. K. (2015). Prognostic Tools for Early Mortality in Hemorrhagic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Neuro*, 11(4), 339–348. doi: 10.3988/jcn.2015.11.4.339.

Предикторы подовження терміну стаціонарного перебування хворих на холецистолітаз після лапароскопічних оперативних втручань на жовчному міхурі

В. М. Клименко, Д. В. Сиволап

Запорізький державний медичний університет, Україна

Мета роботи – визначити предиктори, що асоціюються з подовженням терміну стаціонарного перебування понад 48 годин хворих на холецистолітаз після лапароскопічних оперативних втручань на жовчному міхурі (лапароскопічної холецистектомії та холецистолітотомії).

Матеріали та методи. В одноцентрове відкрите проспективне дослідження залучили 136 хворих на холецистолітаз. Середній вік становив $48,9 \pm 12,6$ року (від 22 до 78 років), 79,41 % – жінки. Лапароскопічні холецистектомії виконали 103 хворим, із них 53 – чотирипортову (4-port laparoscopic cholecystectomy – 4PLC) і 50 – однопортову (single-incision laparoscopic cholecystectomy – SILC). Лапароскопічну холецистолітотомію (Laparoscopic Cholecystolithotomy – LCLT) виконали 33 хворим. Групи пацієнтів зівставні за віком. Оцінювали вихідні показники лабораторних загальноклінічних, біохімічних аналізів крові, ультразвукового сканування гепатобіліарної системи, тривалість оперативного втручання та терміни перебування у стаціонарі. Предиктори визначали за допомогою бінарної логістичної регресії.

Результати. Середня тривалість лапароскопічної холецистолітотомії становила $61,06 \pm 13,27$ хвилини, що було вірогідно більше тривалості лапароскопічної чотирипортової холецистектомії ($42,83 \pm 16,97$ хвилини, $p = 0,001$) та однопортової холецистектомії ($36,60 \pm 14,37$ хвилини, $p = 0,001$). Середня тривалість SILC ($36,60 \pm 14,37$ хвилини) була достовірно меншою за середню тривалість 4PLC ($42,83 \pm 16,97$ хвилини), ($p = 0,039$). Середній час перебування у стаціонарі після операцій (4PLC, SILC і LCLT) не перевищував 4,2 доби, а найкоротший термін післяопераційного госпітального перебування – у хворих групи LCLT, хоча різниця не досягла межі статистичної вірогідності. Більшість показників, у тому числі антропометричних (вага, зріст, індекс маси тіла, вік, стать), не мала вірогідного впливу на термін перебування хворих у стаціонарі після операції. Перевищення до операції вихідного рівня фібриногену в сироватці крові понад 2,2 г/л у хворих на холецистолітаз збільшує ризик затримки у стаціонарі понад 48 годин після втручання у 20 разів (95 % ДІ 2,97–136,61; $p = 0,002$). Зменшення в передопераційному періоді рівня гемоглобіну <135 г/л асоціювалося зі зростанням у 2,48 рази (95 % ДІ 1,16–5,29) відношення шансів подовження терміну перебування хворих у стаціонарі понад 72 години, а відсутність підвищення температури тіла в першу добу після операції на жовчному міхурі зменшувала відношення шансів затримки у стаціонарі на 66 % (ВШ = 0,34; 95 % ДІ 0,1661–0,6885; $p = 0,0028$).

Висновки. Не встановлено впливу виду лапароскопічного втручання (SILC, 4PLC, LCLT) на тривалість післяопераційного перебування хворих на холецистолітаз. Предиктором перебування у стаціонарі понад 48 годин після операції хворих на холецистолітаз виявився передопераційний рівень фібриногену понад 2,2 г/л. Рівень гемоглобіну до оперативного втручання на жовчному міхурі менший за 135 г/л збільшує у 2,48 рази ризик подовження післяопераційного перебування хворих понад 72 год, а відсутність у першу добу після операції підвищення температури тіла знижує на 66 % ризик затримки у стаціонарі понад 3 доби.

Ключові слова: холецистолітаз, лапароскопічна холецистектомія, лапароскопічна холецистолітотомія, предиктори подовження терміну післяопераційного перебування у стаціонарі.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 95–100

DOI:
10.14739/2310-1237.
2018.1.129440

E-mail:
syvolap89@gmail.com

Предикторы увеличения срока стационарного пребывания больных холецистолитиазом после лапароскопических оперативных вмешательств на желчном пузыре

В. Н. Клименко, Д. В. Сиволап

Цель работы – определить предикторы, которые ассоциируются с продлением срока стационарного пребывания свыше 48 часов больных холецистолитиазом после лапароскопических оперативных вмешательств на желчном пузыре (лапароскопической холецистэктомии и холецистолитотомии).

Материалы и методы. В одноцентровое открытое проспективное исследование включены 136 больных холецистолитиазом. Средний возраст больных составил $48,9 \pm 12,6$ года (от 22 до 78 лет), 79,41 % женщин. Лапароскопические холецистэктомии выполнены 103 больным, из них 53 – четырехпортовая (4-port laparoscopic cholecystectomy – 4PLC), 50 – однопортовая (single-incision laparoscopic cholecystectomy – SILC). Лапароскопическую холецистолитотомію (Laparoscopic Cholecystolithotomy – LCLT) выполнили 33 больным. Группы пациентов сопоставимы по возрасту. Оценивали исходные показатели лабораторных общеклинических и биохимических анализов крови, ультразвукового сканирования гепатобилиарной системы, продолжительность оперативного вмешательства и сроки пребывания в стационаре. Предикторы определяли с помощью бинарной логистической регрессии.

Результаты. Средняя продолжительность лапароскопической холецистолитотомии составляла $61,06 \pm 13,27$ минуты, что было достоверно больше продолжительности лапароскопической четырехпортовой холецистэктомии ($42,83 \pm 16,97$ минуты, $p = 0,001$) и однопортовой холецистэктомии ($36,60 \pm 14,37$ минуты, $p = 0,001$). Средняя продолжительность SILC ($36,60 \pm 14,37$ минуты) была достоверно меньше средней продолжительности 4PLC ($42,83 \pm 16,97$ минуты), ($p = 0,039$). Среднее время пребывания в стационаре после операции (4PLC, SILC и LCLT) не превышало 4,2 суток,

Ключевые слова: холецистолитиаз, лапароскопическая холецистэктомия, лапароскопическая холецистолитотомия, предикторы продления срока послеоперационного пребывания в стационаре.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 95–100

а самый короткий срок послеоперационного госпитального пребывания был у больных группы LCLT, хотя разница не достигла предела статистической достоверности. Большинство исследуемых показателей, в том числе антропометрических (вес, рост, индекс массы тела, возраст, пол), не имело достоверного влияния на срок пребывания больных в стационаре после операции. Превышение до операции исходного уровня фибриногена в сыворотке крови более чем 2,2 г/л у больных холецистолитиазом увеличивает риск задержки в стационаре более 48 часов после вмешательства в 20 раз (95 % ДИ 2,97–136,61; $p = 0,002$). Уменьшение в предоперационном периоде уровня гемоглобина <135 г/л ассоциировалось с увеличением в 2,48 раза (95% ДИ 1,16–5,29) отношения шансов продления срока пребывания больных в стационаре более 72 часов, а отсутствие повышения температуры тела в первые сутки после операции на желчном пузыре уменьшало отношение шансов задержки в стационаре на 66 % (ОШ = 0,34; 95 % ДИ 0,1661–0,6885; $p = 0,0028$).

Выводы. Не установлено влияние вида лапароскопического вмешательства (SILC, 4PLC, LCLT) на продолжительность послеоперационного пребывания больных холецистолитиазом. Предиктором пребывания в стационаре более 48 часов после операции больных холецистолитиазом оказался предоперационный уровень фибриногена более 2,2 г/л. Уровень гемоглобина до операции на желчном пузыре меньше 135 г/л увеличивает в 2,48 раза риск продления послеоперационного пребывания больных более чем 72 часа, а отсутствие в первые сутки после операции повышения температуры тела снижает на 66 % риск задержки в стационаре более 3 суток.

Key words:

cholecystolithiasis, laparoscopic cholecystectomy, laparoscopic cholecystolithotomy, prognosis.

Pathologia

2018; 15 (1), 95–100

Predictors of prolongation of the hospital stay in patients with cholecystolithiasis after laparoscopic surgical interventions on the gallbladder

V. M. Klimenko, D. V. Syvolap

The purpose of the study is to identify predictors associated with prolongation of the period of hospital stay more than 48 hours in patients with cholecystolithiasis after laparoscopic surgery on the gallbladder (laparoscopic cholecystectomy and cholecystolithotomy).

Material and methods. The one-center open prospective study involved 136 patients with cholecystolithiasis. The average age of the patients was 48.9 ± 12.6 years (from 22 to 78 years), 79.41 % – women. Laparoscopic cholecystectomy was performed in 103 patients, of which 53 patients had 4-port laparoscopic cholecystectomy (4PLC) and 50 patients – single-incision laparoscopic cholecystectomy (SILC). Laparoscopic cholecystolithotomy (LCLT) was performed in 33 patients. Groups of patients were comparable by age. The baseline indices of laboratory general-clinical and biochemical blood tests, ultrasound scan of the hepato-biliary system, the duration of surgical intervention and the duration of stay in the hospital were evaluated. Predictors were determined using binary logistic regression.

Results. The average duration of laparoscopic cholecystolithotomy was 61.06 ± 13.27 minutes, which was significantly longer than the duration of laparoscopic four-port cholecystectomy (42.83 ± 16.97 minutes, $P = 0.001$) and single-port cholecystectomy (36.60 ± 14.37 minutes, $P = 0.001$). The average duration of SILC (36.60 ± 14.37 minutes) was significantly shorter than the mean duration of 4PLC (42.83 ± 16.97 minutes), ($P = 0.039$). The average stay in hospital after surgery (4PLC, SILC and LCLT) did not exceed 4.2 days, and the shortest period of postoperative hospital stay was in patients with the LCLT group, although the difference did not reach the limit of statistical probability. Most of the studied parameters, including anthropometric (body weight, height, body mass index, age, gender), had no probable effect on the duration of staying in hospital after surgery. The excess of fibrinogen in the blood serum from the baseline of over 2.2 g/L in patients with cholecystolithiasis increases the risk of delay in the hospital more than 48 hours after the intervention by 20 times (95 % CI 2.97–136.61; $P = 0.002$). The decrease of the hemoglobin level <135 g/L in the preoperative period was associated with an increase of odds ratio of prolonging the stay of patients in the hospital for more than 72 hours by 2.48 times (95 % CI 1.16–5.29), and the absence of an increase in body temperature on the first day after the operation on the gallbladder reduced the odds ratio of stay in the hospital by 66 % (VS = 0.34; 95 % DI 0.1661–0.6885; $P = 0.0028$).

Conclusions. The influence of the type of laparoscopic intervention (SILC, 4PLC, LCLT) on the duration of postoperative stay of patients with cholecystolithiasis has not been established. The predictor of staying in the hospital for more than 48 hours after operation in patients with cholecystolithiasis was the preoperative level of fibrinogen above 2.2 g/l. The level of hemoglobin before the surgery on the gallbladder less than 135 g/l increases the risk of prolonged postoperative stay of patients for more than 72 hours by 2.48 times, and the absence of increased body temperature on the first day after the operation reduces the risk of delay in the hospital for more than three days by 66 %.

Перехід у хірургії на лапароскопічні оперативні втручання значно скоротив терміни перебування хворих у стаціонарі та суттєво зменшив витрати на лікування [8]. Хоча тривалість перебування хворих у стаціонарі в більшості клінічних досліджень використовується як сурогатна кінцева точка, цей показник добре висвітлює характер і темпи відновлення пацієнтів після операції [7].

На думку більшості дослідників [2,3,5,6], терміни перебування в стаціонарі тісно пов'язані з тривалістю оперативного втручання, інтраопераційними та після-

операційними ускладненнями (кровотечі, ятрогенні пошкодження жовчних протоків, інфекційні ускладнення), адекватністю анагезії, індексом маси тіла, гострим запальним процесом, оператором. Післяопераційна нудота та блювота є іншими факторами, які також можуть вплинути на післяопераційний перебіг і подовжити терміни лікарняного перебування [2,3,5,6].

Водночас у низці досліджень не встановлено залежність терміну післяопераційного стаціонарного перебування від тривалості операції, ступеня анестезіологічного ризику, віку та статі хворих, стану курін-

ня, супутніх захворювань, ургентності оперативних втручань [1,3].

Дослідження предикторів, що впливають на терміни післяопераційного перебування у стаціонарі хворих на холециститаз, стосуються переважно різних модифікацій лапароскопічної холецистектомії (одно-, дво-, три-, чотирипортової). У науковій літературі бракує джерел, в яких вивчалися б фактори, з якими пов'язані ускладнення холециститазомії та терміни післяопераційного перебування хворих на холециститаз після органозбережних (лапароскопічна холециститазомія) операцій на жовчному міхурі.

Мета роботи

Визначення предикторів, що асоціюються з подовженням терміну стаціонарного перебування понад 48 годин хворих на холециститаз після лапароскопічних оперативних втручань на жовчному міхурі (лапароскопічної холецистектомії та холециститазомії).

Матеріали і методи дослідження

Одноцентрове відкрите проспективне дослідження здійснили в період із 2015 до 2017 р. на базі кафедри факультетської хірургії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри – професор В. М. Клименко). У дослідження після підписання інформованої згоди на участь залучили 136 хворих на холециститаз. Середній вік становив $48,9 \pm 12,6$ року (від 22 до 78 років), 79,41 % – жінки. Виконали такі оперативні втручання на жовчному міхурі: 103 хворим – лапароскопічну холецистектомію: 53 – чотирипортову (4-port laparoscopic cholecystectomy – 4PLC), 50 – однопортову (single-incision laparoscopic cholecystectomy – SILC); 33 пацієнтам виконали лапароскопічну холециститазомію (Laparoscopic Cholecystolithotomy – LCLT). Групи хворих зіставні за віком. Оцінювали вихідні показники лабораторних загальноклінічних і біохімічних аналізів крові, ультразвукового сканування гепатобіліарної системи, ступінь анестезіологічного ризику ASA, тривалість оперативного втручання та терміни перебування у стаціонарі.

Результати статистично опрацювали за допомогою пакетів програм Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA, №AXXR712D833214FAN5) і MedCalc 10.2.0.0. Гіпотезу щодо нормальності розподілу кількісних показників аналізували з використанням Shapiro–Wilk test. Показники кількісних ознак наведено у вигляді середнього арифметичного (M) і стандартного відхилення (SD) за умов нормального розподілу, медіани (Me) та міжквартильного розмаху ($Q_{25}; Q_{75}$) у разі розподілу, що відрізняється від нормального. Показники якісних ознак наведено у вигляді абсолютних і відносних частот. Різницю у групах за кількісними показниками визначали методом параметричної статистики (за критерієм Стьюдента), непараметричної статистики (за критерієм Wilcoxon); за якісними показниками – критерій χ^2 . Для визначення предикторів, що асоціюються з подовженням терміну перебування у стаціонарі понад 48 годин хворих на холециститаз після оперативних

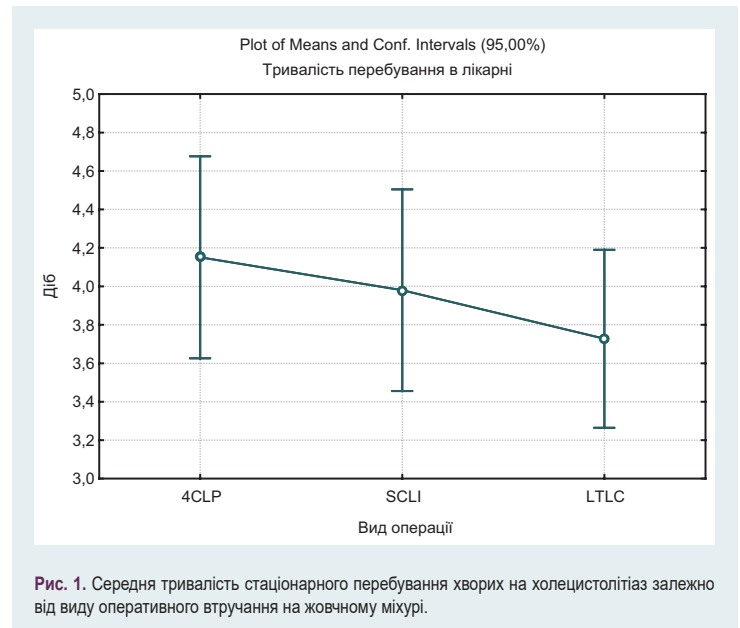


Рис. 1. Середня тривалість стаціонарного перебування хворих на холециститаз залежно від виду оперативного втручання на жовчному міхурі.

втручань на жовчному міхурі, використовували метод бінарного логістичного регресійного аналізу. Для визначення незалежних предикторів чинники, які мали вірогідне прогностичне значення при уніваріантному аналізі, покроково включали в мультиваріантну модель. Дані наведено у вигляді відношення шансів та їхніх довірчих інтервалів. Критичні значення (cut-off value) кількісних показників, що включали до логістичного регресійного аналізу, визначали за допомогою ROC-аналізу. Статистичну розбіжність показників визначали на рівні $p < 0,05$, всі тести двобічні.

Результати та їх обговорення

Середня тривалість лапароскопічної холециститазомії становила $61,06 \pm 13,27$ хвилини, що вірогідно більше тривалості лапароскопічної чотирипортової холецистектомії ($42,83 \pm 16,97$ хвилини, $p = 0,001$) та однопортової холецистектомії ($36,60 \pm 14,37$ хвилини, $p = 0,001$). Середня тривалість SILC ($36,60 \pm 14,37$ хвилини) була достовірно меншою за середню тривалість 4PLC ($42,83 \pm 16,97$ хвилини), ($p = 0,039$).

У дослідженні N. Sato et al. (2014) проаналізовано 220 випадків SILC. Середній час операції становив 145 хвилин (діапазон – 55–435 хвилин), а у 28 % (62) пацієнтів був потрібен тривалий операційний час. Незалежними факторами, що асоціювалися з тривалим операційним часом, були індекс маси тіла ($p = 0,009$), гострий холецистит ($p < 0,001$) та оператор ($p < 0,001$). Тривалий операційний час суттєво пов'язаний зі збільшенням внутрішньоопераційної крововтрати ($p < 0,001$) та тривалим перебуванням у лікарні після операції на жовчному міхурі ($p < 0,001$) [6].

У нашому дослідженні під час аналізу тривалості перебування хворих у стаціонарі після оперативного втручання на жовчному міхурі встановили: середній час перебування у стаціонарі після операцій (4PLC, SILC та LCLT) не перевищував 4,2 доби, а найкоротший термін післяопераційного госпітального пе-

Таблиця 1. Показники ROC-аналізу деяких вихідних параметрів

Показник, одиниці вимірювання	Площа під кривою	95 % довірчий інтервал	Рівень достовірності, p	Чутливість, %	Специфічність, %	Точка розподілу
Ширина жовчного міхура, мм	0,819	0,740–0,882	0,0001	62,5 %	100%	>28
Фібриноген, г/л	0,717	0,633–0,791	0,0278	93,1%	60,0 %	>2,2
Кількість тромбоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	0,777	0,698–0,844	0,0260	55,0 %	100 %	≤ 254

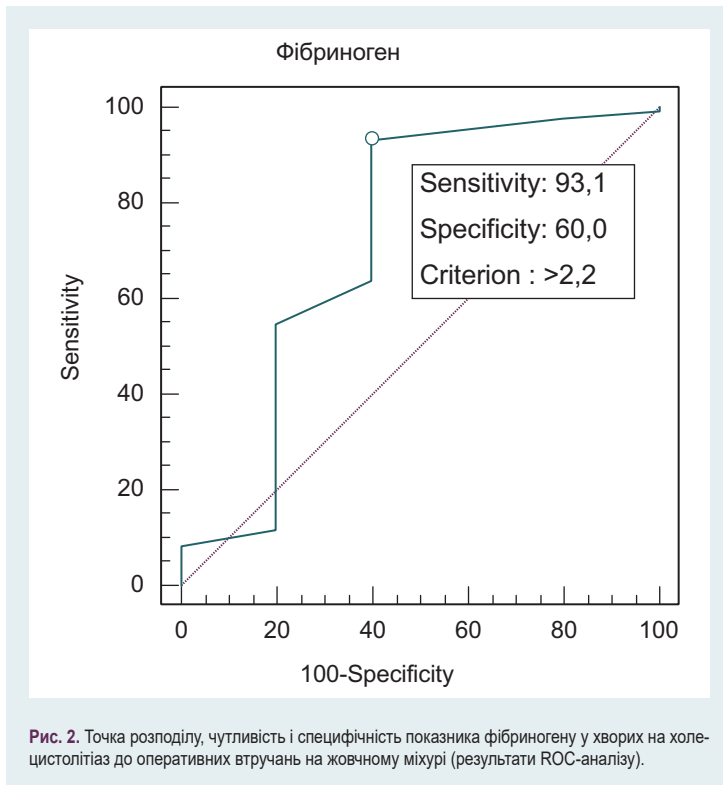


Рис. 2. Точка розподілу, чутливість і специфічність показника фібриногену у хворих на холецистолітаз до оперативних втручань на жовчному міхурі (результати ROC-аналізу).

ребування був у хворих групи LCLT, хоча різниця не досягла межі статистичної вірогідності (рис. 1).

Дві доби після операції в лікарні перебували 9,1 % (3/33) хворих групи LCLT та 3,78 % (2/53) пацієнтів групи 4PLC. Мінімальна кількість днів перебування у стаціонарі при застосуванні SILC становила 3 доби. На третю добу після операції лікарню залишили 45,28 % (24) хворих групи 4PLC, 46 % (23) пацієнтів групи SILC і 42,42 % (14) осіб групи LCLT, різниця статистично невірогідна. На четверту добу зі стаціонара виписали 20,75 % (11) хворих групи 4PLC, 40 % (20) пацієнтів групи SILC та 33,33 % (11) осіб групи LCLT. Отже, в перші 4 доби після оперативних втручань на жовчному міхурі з лікарні виписали 79,41 % (108/136) хворих. У групі LCLT максимальна тривалість стаціонарного перебування хворого після операції становила 8 днів, а при 4PLC та SILC – 14 днів. Усіх хворих у задовільному стані виписали зі стаціонара.

У дослідженні М. Е. Issa et al. (2005) 130 пацієнтів мали розширені лапароскопічні операції. Медіана післяопераційного перебування в лікарні становила 3 дні (міжквартильний діапазон – 2–5), а 62,3 % (81) пацієнтів виписали протягом 3 днів після операції [4].

Для визначення факторів, що асоціюються з подовженням терміну перебування у стаціонарі понад 48 годин хворих на холецистолітаз після лапароскопічних оперативних втручань на жовчному міхурі, виконали

бінарний логістичний аналіз усіх вихідних показників. Попередньо за допомогою ROC-аналізу з'ясували критичні значення вихідних антропометричних, загальноклінічних, біохімічних, інструментальних показників у хворих на холецистолітаз.

Тривалість і вид лапароскопічного хірургічного втручання на жовчному міхурі, а також переважна більшість вивчених показників, зокрема антропометричних (вага, зріст, індекс маси тіла, вік, стать), не мали вірогідного впливу на термін перебування хворих у стаціонарі після операції. Але збільшення фібриногену більше ніж 2,2 г/л (рис. 2), поперечного розміру жовчного міхура понад 28 мм (за УЗ даними), зменшення кількості тромбоцитів до $\leq 254 \times 10^9/\text{л}$ асоціювалось із подовженням терміну перебування хворих у стаціонарі понад 48 годин після операції (табл. 1).

Для визначення факторів ризику, що спричиняють подовження терміну перебування у стаціонарі понад 48 годин після операцій на жовчному міхурі, побудували уніваріантну модель і розрахували відношення шансів. Серед усіх показників тільки рівень фібриногену понад 2,2 г/л продемонстрував вірогідні предикторні властивості щодо прогнозування подовження терміну перебування хворих у стаціонарі понад 48 годин після втручань на жовчному міхурі з приводу холецистолітазу. Перевищення вихідного рівня фібриногену в сироватці крові понад 2,2 г/л у хворих на холецистолітаз до операції збільшує ризик затримки у стаціонарі понад 48 годин після втручання майже у 20 разів (95 % ДІ 2,97–136,61; $p = 0,002$).

Попри те, що наше дослідження обмежене невеликою вибіркою, отримані результати цілком узгоджуються з даними метааналізів та інших клінічних досліджень.

Так, у дослідженні D. P. J. Howard et al. (2011) [3] проаналізовано ймовірні причини затримки понад 48 годин на стаціонарному етапі лікування хворих, яким виконали лапароскопічну холецистектомію. Вивчили 776 випадків холецистектомій, із них 8 % (62) пацієнтів перебували в лікарні понад 2 доби. Автори не встановили вплив показників віку, статі, індексу маси тіла, стану куріння, супутніх захворювань, ургентності оперативних втручань, ступеня анестезіологічного ризику (ASA) на тривалість перебування у стаціонарі. Водночас холецистектомії з приводу гострого холециститу (45,2 % проти 21,0 %, $p < 0,01$), більша тривалість оперативних втручань (90 проти 60 хвилин, $p < 0,001$, MWU-тест), частіша конверсія до відкритих втручань (30,6 % проти 0 %), підтікання жовчі (45,2 % проти 1,6 %), пізні видалення дренажів, неадекватний контроль болю (11,3 % проти 4,8 %) та ранні післяопераційні ускладнення (42,9 % проти 16,2 %) вірогідно частіше призводили до подовження терміну перебування у стаціонарі. Найбільш вагомими ускладненнями у хворих, які перебували у стаціонарі

понад 48 годин після лапароскопічної холецистектомії, були підтікання жовчі (8,1 %), післяопераційна нудота та блювота (8,1 %) [3].

S. P. Cheng S.P. et al. (2008) репроективно (за 6,5 року) переглянули історії хвороб 287 пацієнтів віком понад 65 років, яким успішно виконали лапароскопічну холецистектомію. Ускладнення зареєстрували у 16,7 % (48) хворих, смертність – 0,7 %. Автори порівняли клінічні дані пацієнтів із коротшим і довшим післяопераційним перебуванням у шпиталі. Середній термін післяопераційного перебування у стаціонарі становив 3 дні (міжквартильний діапазон – 3–5 діб). Єдиним незалежним предиктором тривалого післяопераційного перебування було виникнення будь-якого серйозного ускладнення (відношення шансів (ВШ) = 3,144; 95 % ДІ 1,882–5,251) [1].

На думку M. E. Issa et al. (2005), тривалість операції не впливає на час післяопераційного перебування у стаціонарі. Подовження терміну післяопераційного стаціонарного лікування (більше ніж 3 доби) можна очікувати, якщо пацієнт був у лікарні з гострим або тяжким захворюванням понад 6 днів до операції, а також у хворих із важкою супутньою патологією. Незалежні прогностичні фактори тривалого перебування хворих після операції в стаціонарі: оцінювання анестезіологічного ризику ASA 3 або 4 бали (відносний ризик (ВР) = 4,610; $p = 0,0002$) і перебування в лікарні більше ніж 6 днів до операції (ВР = 0,151 за добу, $p = 0,001$). Незалежними прогностичними показниками, що асоціювалися зі збільшенням тривалості передопераційного перебування у стаціонарі, були екстремне надходження до лікарні (ВР = 9,516; 95% ДІ 5,770–13,261; $p < 0,0001$) та основна патологія (ВР = 7,948; 95% ДІ 3,623–12,273; $p = 0,0004$) [4].

Додаткове вивчення можливих предикторів подовження терміну перебування понад 72 години хворих у стаціонарі після операцій на жовчному міхурі з приводу холецистолітазу дало змогу встановити вплив ще 2 показників. Зменшення в передопераційному періоді рівня гемоглобіну <135 г/л асоціювалося зі зростанням в 2,48 рази (95 % ДІ 1,16–5,29) відношення шансів подовження терміну перебування хворих у стаціонарі, а відсутність підвищення температури тіла в першу добу після операції на жовчному міхурі зменшувало відношення шансів на 66 % (ВШ = 0,34; 95 % ДІ 0,1661–0,6885; $p = 0,0028$).

Отже, не встановили вплив виду лапароскопічного втручання (SILC, 4PLC, LCLT) на тривалість післяопераційного перебування хворих на холецистолітаз. Предиктором перебування у стаціонарі понад 48 годин після операції хворих на холецистолітаз виявився передопераційний рівень фібриногену. Рівень гемоглобіну до оперативного втручання на жовчному міхурі менший за 135 г/л збільшує ризик подовження післяопераційного перебування хворих понад 72 години, а відсутність у першу добу після операції підвищення температури тіла знижує ризик затримки у стаціонарі понад 3 доби.

Висновки

1. Тривалість перебування хворих у стаціонарі після оперативного втручання на жовчному міхурі з

приводу холецистолітазу не залежить від віку, статі, індексу маси тіла, стану тютюнопаління, супутніх захворювань, ступеня анестезіологічного ризику (ASA), виду та тривалості операції. Найкоротший середній термін госпітального перебування був у хворих групи LCLT порівняно з SILC і 4PLC.

2. Фактором ризику подовження терміну перебування понад 48 годин хворих на холецистолітаз після лапароскопічного втручання на жовчному міхурі є збільшення вихідного рівня фібриногену в передопераційному періоді понад 2,2 г/л (ВШ = 20; 95% ДІ 2,97–136,61; $p = 0,002$).

3. Зменшення в передопераційному періоді рівня гемоглобіну <135 г/л асоціювалося зі зростанням у 2,48 рази (95 % ДІ 1,16–5,29) відношення шансів, а відсутність підвищення температури тіла в першу добу після лапароскопічної операції на жовчному міхурі з приводу холецистолітазу зменшувало на 66 % відношення шансів (ВШ = 0,34; 95 % ДІ 0,1661–0,6885; $p = 0,0028$) затримки хворих у стаціонарі більше ніж 72 години.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Клименко В. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. факультетської хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сиволап Д. В., аспірант каф. факультетської хірургії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Клименко В. Н., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. факультетской хирургии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Сиволап Д. В., аспирант каф. факультетской хирургии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Information about authors:

Klimenko V. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Faculty Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Syvolap D. V., MD, Postgraduate Student, Department of Faculty Surgery, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 26.12.2017

Після доопрацювання / Revised: 16.01.2018

Прийнята до друку / Accepted: 05.02.2018

Список літератури

- [1] Factors associated with prolonged stay after laparoscopic cholecystectomy in elderly patients / S.P. Cheng, Y.C. Chang, C.L. Liu, et al. // *Surg Endosc.* – 2008. – Vol. 22(5). – P. 1283–1289.
- [2] Meta-analysis of randomized controlled trials on the safety and effectiveness of day-case laparoscopic cholecystectomy / K. Gurusamy, S. Junnarkar, M. Farouk, B.R. Davidson // *British Journal of Surgery.* – 2008. – Vol. 95. – P. 161–168.
- [3] Factors associated with prolonged hospital stay following planned day-case laparoscopic cholecystectomy: General 0032 / D.P.J. Howard, J. Isherwood, Y. Jabri, et al. // *British Journal of Surgery.* – 2011. – Vol. 98. – P. 139.
- [4] Predictors of duration of postoperative hospital stay in patients undergoing advanced laparoscopic surgery / M.E. Issa, M. Al-Rashedy, P. Ballester, B.J. Ammori // *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* – 2005. – Vol. 15(2). – P. 90–93.
- [5] Predicting prolonged hospital stay after laparoscopic cholecystectomy / Y. Morimoto, H. Mizuno, Y. Akamaru, K. Yasumasa, et al. // *Asian J Endosc Surg.* – 2015. – Vol. 8(3). – P. 289–295.

- [6] Risk factors for a prolonged operative time in a single-incision laparoscopic cholecystectomy / N. Sato, K. Yabuki, K. Shibao, Y. Mori, et al. // *HPB (Oxford)*. – 2014. – Vol. 16(2). – P. 177–182.
- [7] Short-stay surgery: what really happens after discharge? / T.T. Tran, P. Kaneva, N.E. Mayo, et al. // *Surgery*. – 2014. – Vol. 156(1). – P. 20–27.
- [8] Effectiveness of the clinical pathway to decrease length of stay and cost for laparoscopic surgery / K. Uchiyama, K. Takifuji, M. Tani, et al. // *Surg Endosc.* – 2002. – Vol. 16(11). – P. 1594–1597.

References

- [1] Cheng, S. P., Chang, Y. C., Liu, C. L., Yang, T. L., Jeng, K. S., Lee, J. J., & Liu, T. P. (2008) Factors associated with prolonged stay after laparoscopic cholecystectomy in elderly patients. *Surg Endosc.*, 22(5), 1283–1289. doi: 10.1007/s00464-007-9610-4.
- [2] Gurusamy, K., Junnarkar, S., Farouk, M., & Davidson, B. R. (2008) Meta-analysis of randomized controlled trials on the safety and effectiveness of day-case laparoscopic cholecystectomy. *British Journal of Surgery*, 95, 161–168. doi: 10.1002/bjs.6105.
- [3] Howard, D. P. J., Isherwood, J., Jabri, Y., Saunders, R., & Phillips, D. (2011) Factors associated with prolonged hospital stay following planned day-case laparoscopic cholecystectomy: General 0032. *British Journal of Surgery*, 98, 139.
- [4] Issa, M. E., Al-Rashedy, M., Ballester, P., & Ammori, B. J. (2005) Predictors of duration of postoperative hospital stay in patients undergoing advanced laparoscopic surgery. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.*, 15(2), 90–93.
- [5] Morimoto, Y., Mizuno, H., Akamaru, Y., Yasumasa, K., Noro, H., Kono, E., & Yamasaki, Y. (2015) Predicting prolonged hospital stay after laparoscopic cholecystectomy. *Asian J Endosc Surg.*, 8(3), 289–295. doi: 10.1111/ases.12183.
- [6] Sato, N., Yabuki, K., Shibao, K., Mori, Y., Tamura, T., Higure, A., & Yamaguchi, K. (2014) Risk factors for a prolonged operative time in a single-incision laparoscopic cholecystectomy. *HPB (Oxford)*, 16(2), 177–182. doi: 10.1111/hpb.12100.
- [7] Tran, T. T., Kaneva, P., Mayo, N. E., Fried, G. M., Feldman, L. S. (2014) Short-stay surgery: what really happens after discharge? *Surgery*, 156(1), 20–27. doi: 10.1016/j.surg.2014.03.024.
- [8] Uchiyama, K., Takifuji, K., Tani, M., Onishi, H., & Yamaue, H. (2002) Effectiveness of the clinical pathway to decrease length of stay and cost for laparoscopic surgery. *Surg Endosc.*, 16(11), 1594–1597. doi: 10.1007/s00464-002-9018-0.

Ведення хворих на аутоімунні захворювання печінки на основі останніх рекомендацій EASL з урахуванням власного досвіду

Ю. М. Степанов¹, С. В. Косинська¹, О. В. Павленко²

¹ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро, Україна, ²Одеський національний медичний університет, Україна

До аутоімунних захворювань печінки належать аутоімунний гепатит (АІГ), первинний біліарний цирроз/холангіт (ПБХ), первинний склерозуючий холангіт (ПСХ) та аутоімунні холангіопатії. Вони є рідкими, недостатньо вивченими, а отже складними для розуміння та ведення навіть вузькопрофільними спеціалістами.

Мета роботи – надати сучасне уявлення про аутоімунні захворювання печінки та їхні особливості.

Важливо розрізняти АІГ, ПБХ, ПСХ. Епідеміологічні дані свідчать про їхню низьку поширеність, але спостерігають її збільшення. Уражають осіб молодого та середнього віку, АІГ і ПБХ діагностують частіше в жінок, ПСХ – у чоловіків. Етіологічні чинники залишаються невідомими, розглядається роль вірусно-бактеріальних, токсичних, медикаментозних агентів, що змінюють імунну систему з формуванням аутоантител. Мають значення генетичні фактори. Діагностика базується на характерних ознаках. АІГ може перебігати як гострий чи хронічний гепатит, цироз або фульмінантна печінково-клітинна недостатність, тривало може бути безсимптомним. Для ПБХ і ПСХ характерна клініка холестази – шкірний свербіж, жовтяниця, зміни шкіри. На пізніх стадіях розгортається картина цирозу печінки. У печінкових пробах при АІГ переважає цитоліз, який сягає великих значень, при ПБХ та ПСХ – холестаз із високими лужною фосфатазою та ГГТП. Діагностика за маркерами має провідне значення в нашій країні. На користь АІГ свідчить визначення ANA, SMA, анти-LKM, анти-SLA, анти-LP анти-LC1, ASGP-R, підвищення IgG. Високоспецифічним маркером ПБХ є AMA-M2, при ПСХ можуть виявлятися p-ANCA. Серед візуалізуючих методів гепатобіліарної системи виділено МРХПГ як точний метод оцінювання протокової системи при ПСХ та еластограму печінки для визначення ступеня фіброзу при її різних захворюваннях. Лікування аутоімунних захворювань печінки, згідно з останніми рекомендаціями EASL, включає імуносупресивну терапію гормонами, азатиоприном, іншими цитостатиками, УДХК. Оскільки дані доказової медицини лімітовані, вважається, що в лікуванні таких хворих має перевагу думка лікаря-експерта. Наведено клінічні приклади, що наочно демонструють особливості ведення цих хворих.

Висновки. Діагностика та лікування аутоімунних захворювань печінки є складним процесом. У цьому допомагають сучасні рекомендації, поряд з тим мають значення клінічний досвід лікаря та індивідуальні дані конкретного хворого.

Ключові слова:

аутоімунний гепатит, первинний біліарний цирроз/холангіт, первинний склерозуючий холангіт, характерні ознаки, діагностика, сучасне лікування.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 101–108

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.127703

E-mail:

stepanovgastro@i.ua, kosinskay@gmail.com

Ведение больных с аутоиммунными заболеваниями печени на основе последних рекомендаций EASL с учетом собственного опыта

Ю. М. Степанов, С. В. Косинская, Е. В. Павленко

К аутоиммунным заболеваниям печени относят аутоиммунный гепатит (АИГ), первичный билиарный цирроз/холангит (ПБХ), первичный склерозирующий холангит (ПСХ) и аутоиммунные холангиопатии. Они являются редкими, недостаточно изученными, поэтому сложными для понимания и ведения даже узкопрофильными специалистами.

Цель работы – предоставить современное представление об аутоиммунных заболеваниях печени и их особенностях.

Важно четко различать АИГ, ПБХ, ПСХ. Эпидемиологические данные свидетельствуют об их низкой распространенности, но отмечается ее рост. Поражают лиц молодого и среднего возраста, АИГ и ПБХ диагностируют чаще женщин, ПХ – у мужчин. Этиологические факторы остаются неизвестными, рассматривается роль вирусно-бактериальных, токсических, медикаментозных агентов, которые изменяют иммунную систему с формированием аутоантител. Имеют значение генетические факторы. Диагностика основывается на характерных признаках. АИГ может протекать как острый или хронический гепатит, цирроз или фульминантная печеночно-клеточная недостаточность, длительно может быть бессимптомным. Для ПБХ и ПСХ характерна клиника холестаза – кожный зуд, желтуха, изменения кожи. На поздних стадиях разворачивается картина цирроза печени. В печеночных пробах при АИГ преобладает цитоліз, достигающий высоких значений, при ПБХ и ПСХ – холестаз с высокими щелочной фосфатазой и ГГТП. Диагностика по маркерам имеет решающее значение в нашей стране. В пользу АИГ свидетельствуют обнаружение ANA, SMA, анти-LKM, анти-SLA, анти-LP анти-LC1, ASGP-R, повышение IgG. Високоспецифичным маркером ПБХ является AMA-M2, при ПСХ могут определяться p-ANCA. Среди визуализирующих методов гепатобилиарной системы выделены МРХПГ как точный метод оценки протоковой системы при ПСХ и эластограмму печени для установления степени фиброза при ее различных заболеваниях. Лечение аутоиммунных заболеваний печени, согласно последним рекомендациям EASL, включает иммуносупрессивную терапию гормонами, азатиоприном, другими цитостатиками, УДХК. Поскольку данные доказательной медицины лимитированы, считается, что в лечении таких больных перевешивает мнение врача-эксперта. Приведены клинические примеры, демонстрирующие особенности ведения этих больных.

Выводы. Диагностика и лечение аутоиммунных заболеваний печени – сложный процесс. В этом значительно помогают современные рекомендации, вместе с тем имеют значение клинический опыт врача и индивидуальные данные больного.

Ключевые слова:

аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз/холангит, первичный склерозирующий холангит, характерные признаки, диагностика, современное лечение.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 101–108

Key words:
autoimmune
hepatitis, primary
biliary cirrhosis,
cholangitis,
disease attributes,
diagnosis,
treatment.

Pathologia
2018; 15 (1), 101–108

Management of patients with autoimmune liver diseases on the basis of the latest EASL recommendations and our own experience

Yu. M. Stepanov, S. V. Kosynska, O. V. Pavlenko

Autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis/cholangitis (PBC), primary sclerosing cholangitis (PSC) and autoimmune cholangiopathies are the autoimmune liver diseases. These diseases are rare and remain under-explored, therefore difficult for understanding and conducting even by specialists.

Aim. To provide a comprehensively modern view of autoimmune liver diseases and their features.

It is important to clearly distinguish AIG, PBH, and PSC between each other. Epidemiological data indicate low prevalence of these diseases, but its growth is noted. Most of the patients are young and middle age, prevalence of the AIH and PBC is higher in women, for PSC – in men. Etiologic factors remain unknown; the role of viral-bacterial, toxic, drugs that change the immune system with forming of autoantibodies is examined. Genetic factors also may play role in pathogenesis of these diseases.

Diagnostics of autoimmune liver diseases are based on specific signs. AIH can proceed as acute or chronic hepatitis, cirrhosis or fulminant hepatic-cellular insufficiency, but also can be asymptomatic for a long time. For PBC and PSC, the clinic of cholestasis is characterized by skin itch, jaundice, skin changes. In later stages, a picture of cirrhosis develops. Hepatic tests in patients with AIH are characterized by predominance of cytolytic that can reach high values, and for PBC and PSC – cholestasis with high alkaline phosphatase and GGTP.

Diagnostics with specific markers of autoimmune liver diseases are crucial for our country. AIH is characterized by detection of ANA, SMA, anti-LKM, anti-SLA, anti-LP anti-LC1, ASGP-R, and increased level of IgG. A highly specific PBC marker is AMA-M2, while p-ANCA can be determined in PSC.

Among the visualizing methods of the hepatobiliary system, MRCP was identified as an accurate method for evaluating the duct system in PSC and liver elastography for evaluating the degree of fibrosis.

Treatment of autoimmune liver diseases, according to the latest EASL recommendations, includes immunosuppressive therapy with hormones, azathioprine, other cytostatics, UDCA. Since the data of evidence-based medicine are limited, it is believed that an expert opinion can be crucial for the treatment of such patients. Clinical examples showing the features of management of autoimmune liver diseases are given in this article.

Conclusions. Diagnosis and treatment of autoimmune liver diseases are a complex process. In this case, the latest modern recommendations can considerably help, at the same time, the clinical experience of the doctor and the patient's individual data still matter

Усе частіше у практиці трапляються захворювання печінки, що мають аутоімунні причини та механізми розвитку, тому останніми роками інтерес лікарів і науковців до цієї проблеми суттєво зріс. До аутоімунних захворювань печінки належать такі нозологічні одиниці, як аутоімунний гепатит, первинний біліарний цирроз/холангіт, первинний склерозуючий холангіт та аутоімунні холангіопатії. Ці захворювання вважають доволі рідкісними, недостатньо вивченими, а отже складними для розуміння та ведення навіть вузькопрофільними спеціалістами. Згідно з чинними нормативними документами, ці захворювання є профільними для гастроентерологів-гепатологів, а не лікарів загального профілю, хоча не рідко саме вони є першими, хто має справу з цими хворими й повинен діагностувати або запідозрити патологію та передати вчасно, на ранніх стадіях, спеціалісту.

Мета роботи

Надати сучасне уявлення про аутоімунні захворювання печінки та їхні особливості.

Насамперед, необхідно чітко розрізнити ці захворювання. Для цього можна схематично представити локалізацію та напрям аутоагресії проти окремих структур печінки при окремих нозологічних одиницях (рис. 1).

Умовно при аутоімунному гепатиті аутоагресія спрямована проти власне гепатоцитів, при первинному

біліарному циррози/холангіті – проти мікроскопічних біліарних проточків, при первинному склерозуючому холангіті – проти макроскопічних протоків, передусім холедоху та великих печінкових протоків.

На жаль, це мало зрозуміло з тих громіздких визначень, що надають сучасні посібники.

За визначенням, аутоімунний гепатит (АІГ) – це хронічне запальне захворювання печінки, що перебігає з плазмоклітинною інфільтрацією, перипортальним або більш поширеним запаленням, істотною гіпергаммаглобулінемією, появою в сироватці крові аутоантитіл і задовільною відповіддю на імуносупресивну терапію [3,7,9,16].

Поширеність його коливається від 4 до 43 (в Європі – 15–25) випадків на 100 000 населення; менше хворіють в азіатських країнах, більше – в етнічно закритих регіонах; частіше хворіють жінки, ніж чоловіки, у співвідношенні 4:1–8:1 [8,11,18].

Первинний біліарний цирроз – це запальне захворювання міждолькових і септальних жовчних протоків аутоімунної природи, коли поступово порушуються внутрішньопечінкові жовчні протоки, що призводить до дуктопенії та персистуючого холестазу з розвитком цирозу та термінальної стадії печінкової недостатності [4,6,10]. Зараз введено точніший термін – «первинний біліарний холангіт» (ПБХ), що відбиває суть захворювання [4]. Поширеність низька – 2–40 на 100 000 населення; частіше хворіють жінки, ніж чоловіки (8:1). Найчастіше розвивається в осіб віком 40–60 років, дуже рідко в молодших [4,10,22].

Первинний склерозуючий холангіт (ПСХ) – хронічне захворювання печінки неясної етіології, котре прогресує; характеризується негнійним деструктивним запаленням, облітерувальним склерозом і сегментарною дилатацією внутрішньо- та позапечінкових жовчних протоків, призводячи до вторинного біліарного цирозу [17,20]. Переважно хворіють чоловіки молодого віку, поширеність низька – 6–14 на 100 000 населення [13,17].

Ці захворювання можуть поєднуватись, тобто в конкретного хворого одночасно спостерігають кілька напрямів аутоагресії, тоді розвиваються overlap-синдроми: АІГ+ПБХ, АІГ+ПСХ, рідше – ПБХ+ПСХ [7,18,23,26]. Вони можуть розвиватись пізніше, з розвитком захворювання від класичного монокомпонентного до полікомпонентного.

Складною, не вирішеною проблемою є виявлення ознак аутоімунного процесу на тлі інших захворювань печінки. Описано подібні зміни при медикаментозних, алкогольних, вірусних ураженнях печінки (особливо для вірусу гепатиту С) [3,5,15,25]. При цьому часто неможливо встановити, який патогенез захворювання переважає, які наявні причинно-наслідкові зв'язки. Складно здійснити диференційну діагностику і, відповідно, призначити адекватне лікування.

Патогенез аутоімунних захворювань печінки

Як патогенетичні розглядали різні чинники, але наявність будь-якого прямого причинного зв'язку між цими факторами та розвитком АІГ не виявили [3,8].

Вважають, що вони можуть відігравати роль тригерів, пускових факторів для розвитку первинного епізоду АІГ або викликати його загострення. До них належать передусім вірусно-бактеріальні інфекції [2,3,7,15,25]. Відомо, що мікробні частки взаємодіють із численною кількістю імунних клітин під час інфекції, змінюючи імунну відповідь клітин. Якщо виникає збій імунної відповіді (найбільш вивченою є роль Т-клітин), може розвинути аутоагресія, зокрема проти власних тканин печінки [15,25].

Вивчено широкий спектр медикаментозних засобів, на тлі яких вперше проявляється АІГ. Це майже будь-які препарати рослинного походження, антибіотики, туберкулостатики, протигрибкові засоби, інтерферонотерапія; це певною мірою викладено в доступній науковій літературі [2,5,7].

На жаль, у нашій країні поширені різні імуностимулятори «для поліпшення роботи імунної системи», які особливо часто призначають у період ОРЗ і грипу. Їхня кількість різноманітна, багато лікарів їх плутають із класом власне противірусних препаратів, що спрямовані безпосередньо на віріон. Імуностимулятори саме впливають на імунні клітини та посилення цитокінового каскаду, хоча частина з них позиціонується як ті, що мають противірусний ефект, але цей ефект не прямий, пов'язаний з дією імунної системи. Чинні рекомендації з лікування ГРВІ не рекомендують ці засоби як не доведені, а називають навіть шкідливими. За нашими спостереженнями, у частини хворих АІГ розвивався саме після неадекватного та недоцільного призначення імуностимуляторів. Складно вірогідно підтвердити цей зв'язок, немає відомостей фахової літератури з цієї теми. Але, очевидно, звертати увагу на це потрібно як при опитуванні хворих із можливим АІГ, так і при призначенні цих засобів.

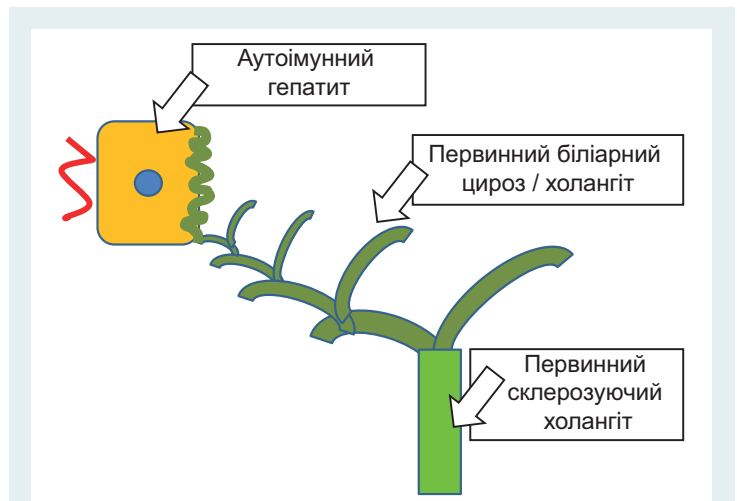


Рис. 1. Локалізація аутоагресії при аутоімунних захворюваннях печінки.

Однак не в кожного, хто контактує з патогенними чинниками, розвивається АІГ. Останнім часом акцентують на генетичних факторах, що зумовлюють розвиток захворювання. З розвитком АІГ асоціюються гени, що розташовані в ділянці HLA, на короткому плечі хромосоми 6, особливо ті, які кодують алелі DRB1 класу II HLA. Вони відповідають за представлення пептидних антигенів CD4-Т-клітинам [3,16].

Продовжують вивчати складний етіопатогенез АІГ, наголошуючи, що є невідомі, досі не виявлені чинники АІГ та інших аутоімунних захворювань [8].

Тригерні фактори інших аутоімунних захворювань печінки подібні. При ПБЦ також виявлено бактерійні, вірусні та інші агенти, які пов'язані з молекулярною мімікрією [6,10,22]. Піруват-дегідрогеназний комплекс E2 – основний антимітохондріальний аутоантиген людини, наявний в інших біологічних видів, має найбільшу подібність до мікробних комплексів (*E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium*, *Chlamydia pneumoniae*, цитомегаловірусна інфекція та ін.) [6,22,25]. Встановлено, що деякі хімічні/ксенобіотичні сполуки (харчові приправи, косметика) можуть стимулювати антимітохондріальні антитіла (AMA) [22]. Не виключається також роль ендокринних чинників у розвитку ПБХ. Відомо, що захворювання частіше розвивається в жінок у клімактеричному періоді, рідше – під час вагітності [10].

У патогенезі ПСХ, крім названих факторів докільця, припускається істотна роль стану кишечника та кишечного бар'єра через чіткий зв'язок із хронічними запальними захворюваннями кишечника (ХЗЗК). Відомо, що 60–80 % пацієнтів із ПСХ мали асоціацію з ХЗЗК [13,17,20]. Для ПСХ також виявлено виражену сімейну та генетичну схильність, котра пов'язана з гаплотипами HLA-B8, -DR3, -DRW52, що підвищує ризик в 10–100 разів [13,17,20].

Діагностика та диференційна діагностика аутоімунних захворювань печінки

Складність захворювань печінки загалом та аутоімунних патологій зокрема пов'язана з тривалою відсутністю симптомів або маскуванням під інші хвороби. АІГ може перебігати як гострий гепатит, хронічний

Таблиця 1. Аутоімунні захворювання, що асоціюються з аутоімунним гепатитом (за системами)

Захворювання ендокринної системи	Аутоімунний тиреоїдит (кожний п'ятий хворий) Аутоімунний поліендокринний синдром 1 типу (рідко) Цукровий діабет 1 типу
Ревматологічні захворювання	Ревматоїдний артрит Ревматичний васкуліт Системний червоний вовчак Синдром Рейно Вогнищева склеродермія Синдром Шегрена CREST-синдром Поліміозит тощо
Захворювання очей	Іридоцикліт Кон'юнктивіт
Гастроентерологічні захворювання	Виразковий коліт Целиакія Overlap-синдром з ПБЦ або ПСХ
Захворювання нирок	Нефропатії
Захворювання крові	Гемолітичні анемії Аутоімунні тромбоцитопенії
Захворювання легень	Інтерстиціальні ураження легень Фіброзуєчий альвеоліт Бронхіальна астма
Дерматологічні захворювання	Вітіліго Алопеція Червоний плаский лишай тощо

гепатит і цироз печінки, можна спостерігати фульмінантну печінково-клітинну недостатність [3,5,7,18]. Хворий може звернутися до лікаря на будь-якій стадії; у 25–34 % хворих АІГ перебігає безсимптомно й діагностується на стадії цирозу печінки [7,11,18]. Цироз може проявлятися відразу ускладненнями: кровотечею з варикозно розширених вен стравоходу, набряково-асцитичним синдромом, печінковою енцефалопатією. У більшості АІГ прогресує до цирозу після кількох років терапії на тлі імуносупресорів і рецидивів захворювання [9,11,12].

ПБХ і ПСХ є основними холестатичними захворюваннями, перебігають з вираженим шкірним свербіжем і жовтяницею. Крім власне холангіту, ПБХ і ПСХ мають ознаки гепатиту, з часом також прогресують у цироз [4,13,17,19]. При ПБХ виділяють доклінічну, безсимптомну стадію, розгорнуту стадію клінічних проявів, кінцеву стадію з ускладненнями. За нашим досвідом, до особливостей перебігу ПБХ і ПСХ належить швидкий розвиток портальної гіпертензії, що не відповідає стадії ураження печінки, при доволі збереженому гепатоциті. Так, спостерігали випадок розвитку портальної гіпертензії при ПБХ за 1 рік від 0–1 стадії до 2 стадії за даними ЕГДС без лікування.

У розгорнутій клінічній картині ПБХ визначають тяжкий шкірний свербіж, характерний стан шкіри (жовтяниця, сухість, гіперпигментація та гіперкератоз шкірних покривів, виражені розчухування – частіше на животі, нижніх кінцівках, ксантелазми – частіше на повіках). Через недостатність надходження жовчі в кишечник розвивається біліарна недостатність – не перетравлюються жири, є стеаторея, нестача жиророзчинних вітамінів, синдром мальабсорбції, схуднення.

Також часто розвиваються жовчні камені, біліарний панкреатит. З прогресуванням холестази спостерігають остеопороз, а потім остеомаляцію – крихкість хребців, патологічні переломи. Зниження імунітету через хворобу та приймання імуносупресорів зумовлює важкий перебіг банальних інфекцій, особливо дихальних шляхів, аж до загибелі. Подібні прояви холестази спостерігають при ПСХ.

Важливо звертати увагу на супутні аутоімунні захворювання [18], що можуть поєднуватись з АІГ, ПБХ, ПСХ (табл. 1).

Є відмінність і за лабораторними даними. За показниками біохімічних печінкових тестів для АІГ характерний виражений цитоліз, іноді з дуже високими рівнями АлТ, АсТ, за відсутності чи незначного холестази [3,9,16,26].

Для ПБХ і ПСХ властиві надзвичайно високі показники холестази, ЛФ і ГГТП, що можуть бути єдиними проявами захворювання на ранній стадії, а цитоліз фактично є наслідком холестази й залежить від ступеня ураження гепатоциту [10,14,26].

Інструментальні методи, що застосовуються для діагностики та диференційної діагностики аутоімунних захворювань, включають рутинне УЗД ОЧП, КТ ОЧП, МРТ ОЧП, МРХПГ, ЕРХПГ, ендоскопічне УЗД, доплер-УЗД судин черевної порожнини.

Ці методи виявляють ознаки гепатиту, холангіту, зміни паренхіми печінки при цирозі, портальну гіпертензію, гепато- та спленомегалію, стан протоків, камені жовчного міхура та протоків, патологію підшлункової залози. Останнім часом активно застосовують неінвазивні еластографічні методи для оцінювання фіброзу печінки [19]. Однак дані цих досліджень не є специфічними, можуть бути визначені при інших захворюваннях біліарного тракту. З нашого досвіду, нерідко хворому виконують увесь перелік досліджень, навіть багаторазово, поки встановлять діагноз, а іноді його так і не можна уточнити.

Безумовно, першорядне значення в діагностиці та диференційній діагностиці АІГ, ПБЦ та інших захворювань печінки має визначення маркерів [2,3,5,7,9,10,16,23,24]. Найчастіше для діагностики АІГ визначають такі маркери, як антинуклеарні антитіла (ANA), антитіла до гладком'язових клітин (SMA), антитіла до мікосомів печінки і нирок (анти-LKM), до розчинних печінкових (анти-SLA) і печінково-панкреатичних (анти-LP) антигенів, до цитозольного антигену печінки типу 1 (анти-LC1); останнім часом у практику входить визначення антитіл до асіало-глікопротеїнових рецепторів (ASGP-R). Спектр відомих встановлених аутоантитіл набагато більший, постійно поповнюється новими маркерами [7,8]. Вони відрізняються специфічністю та чутливістю, але жоден не є патогномічним, тому продовжуються пошуки «ідеального» маркера.

Гістологію вважають необхідною для встановлення діагнозу АІГ. Для АІГ характерні перипортальний гепатит без ураження жовчних протоків, ступінчасті некрози, інфільтрати з лімфоцитів і плазмодитів, які скупчуються на межі між стромою та паренхімою. При гострому перебігу – панлобулярний гепатит із розлогими мостоподібними некрозами гепатоцитів, можуть

бути перичентральні некрози, а з часом при хронізації процесу відзначають перехід від перичентрального до перипортального гепатиту. Можна спостерігати зміни, що не характерні для АІГ (холангіти, стеатоз і стеатогепатит, гранульоми) та знижують вірогідність, але не виключають діагноз АІГ. На пізніх стадіях визначають фіброз і цироз печінки. Морфологічних ознак, патогномонічних для АІГ, немає. Їх можна спостерігати при інших захворюваннях печінки – медикаментозних, вірусних, токсичних [3,5,7,9,16,26].

Через відсутність прямих однозначних ознак Міжнародна група з вивчення АІГ (1999) сформулила діагностичні критерії захворювання з оцінюванням у балах, виділивши діагнози визначеного та вірогідного АІГ [3,9,16]. Для встановлення визначеного діагнозу потрібна відсутність в анамнезі гемотрансфузій, приймання гепатотоксичних ліків, зловживання алкоголю; відсутність сироваткових маркерів активної вірусної інфекції; рівні γ -глобулінів і IgG, що перевищують нормальні більше ніж у 1,5 рази; титри ANA, SMA і LKM 1:80 для дорослих і понад 1:20 для дітей; суттєве підвищення активності АсАТ, АлАТ і менш виражене підвищення лужної фосфатази.

Пізніше наведено спрощені критерії АІГ (2008), що включають головні ознаки захворювання [3,9,16], у тому числі морфологічні (табл. 2). На жаль, через обмеженість даних біопсії в нашій країні не завжди можливе використання подібних критеріїв у повному обсязі.

Розрізняють підтипи АІГ, причому деякі дослідники виділяють I та II, інші – ще й III підтип. АІГ I типу характеризується наявністю антинуклеарних антитіл (ANA) і/або SMA [3,7,9,16]. АІГ II типу характеризується наявністю специфічних антитіл типу 1 до мікросом печінки/нирок (анти-LKM1) або нечасто анти-LKM типу 3 (анти-LKM3) і/або антитіл до цитозольного антигену печінки типу 1 (анти-LC1) [3,7,9,16]. АІГ III типу відрізняється антитілами до розчинних печінкових (анти-SLA) та печінково-панкреатичних (анти-LP) антигенів, що вважають ідентичними маркерами (анти-SLA/LP) [9]. Однак є думка, що поділ АІГ на підтипи є недоречним, оскільки вони не мають відмінностей за клінічними, біохімічними, гістологічними, генетичними ознаками [24]. Ми також дотримуємось цієї думки, бо в конкретного хворого може бути настільки різним серологічний профіль, індивідуальний перебіг захворювання, непередбачувана відповідь на лікування, що виділення підтипу не впливатиме на тактику ведення хворого, а матимуть значення саме індивідуальні дані.

Для діагностики ПБЦ найбільше значення має визначення антимітохондріальних антитіл (AMA-M2), які є головним серологічним діагностичним маркером захворювання, мають високу специфічність – до 95 %. Через це необхідність біопсії печінки при ПБЦ є суперечливою.

Для ПБХ під час морфологічного дослідження характерне ураження жовчних каналців – картина негнійного деструктивного холангіту, з наступним перидуктулярним фіброзом, розвитком септ і формуванням мікронодулярного цирозу [4,6,10,22]. Прогресування ПБХ зумовлене ступенем ураження жовчних проток.

Таблиця 2. Спрощені діагностичні критерії аутоімунного гепатиту (2008)

Показники	Значення	Бали
ANA або SMA	$\geq 1:40$	1
ANA або SMA або LKM або SLA	$\geq 1:80$ $\geq 1:40$ Позитивно	2
IgG	> верхньої межі норми >1,1 норми	1 2
Біопсія печінки (ознаки гепатиту)	схожа на АІГ типова для АІГ	1 2
Відсутність вірусного гепатиту	+	2
Інтерпретація	імовірний підтверджений	≥ 6 балів ≥ 7 балів

Одночасно спостерігають ранню та пізню стадії, а отже є можливість помилки даних біопсії через неоднорідність ураження печінки. Тому, за рекомендаціями EASL 2017, біопсія показана, коли серологічна діагностика не інформативна. Біопсія повинна бути якісною, містити мінімум 11 портальних трактів [10], але на практиці це не завжди можливо.

Для оцінювання ступеня фіброзу, його динаміки, розвитку циротичних змін при ПБХ, ПСХ, АІГ та інших захворюваннях печінки доцільно застосовувати еластографічні дослідження, що є не інвазивними, дають можливість відносно точно визначити наявність фіброзу від F0 до F4 в різних хворих з одним і тим самим діагнозом і, відповідно, прогнозувати перебіг і кінцеву стадію захворювання [19].

У діагностиці ПСХ основними методами діагностики є інструментальні візуалізаційні методики, насамперед МРХПГ (ЕРХПГ). Виявляють множинні стриктури протоків і ділянки дилатованих протоків – так звані симптоми «бус», або «чоток» [13,17,20]. Під час УЗД можна спостерігати потовщення стінок проток, під час КТ – їх розширення. Для встановлення діагнозу ПСХ необхідно виключити спадкові аномалії, холедохолітаз, операційну травму, малігнізацію, котрі можуть бути причиною змін протоків.

Доволі точним вважають визначення такого маркера, як перинуклеарні антинейтрофільні цитоплазматичні антитіла (p-ANCA). Доцільно виконати обстеження кишечника для виключення чи підтвердження його хронічних запальних захворювань, що поєднуються з ПСХ.

Лікування аутоімунних захворювань

Через обмежену кількість осіб, які хворіють на аутоімунні захворювання, неможливе здійснення істотних клінічних досліджень із достатньою кількістю хворих для значущої статистичної інформації. Оскільки дані доказової медицини лімітовані, то у веденні цих хворих має перевагу думка лікаря-експерта [12]. Тобто власний досвід лікаря є важливим у веденні таких хворих.

У 2015 р. вийшли останні рекомендації EASL із ведення АІГ [9]. У цих рекомендаціях наведено схему застосування імуносупресивної терапії переважно комбінованої, преднізолоном та азатиоприном (рис. 2). Препарати другої лінії, котрі використовують у випадку неефективності першої лінії, включають мікофенолат мofетил, такролімус, циклоспорин, а також терапію моноклональними антитілами інфліксімаб, ритуксімаб [1].

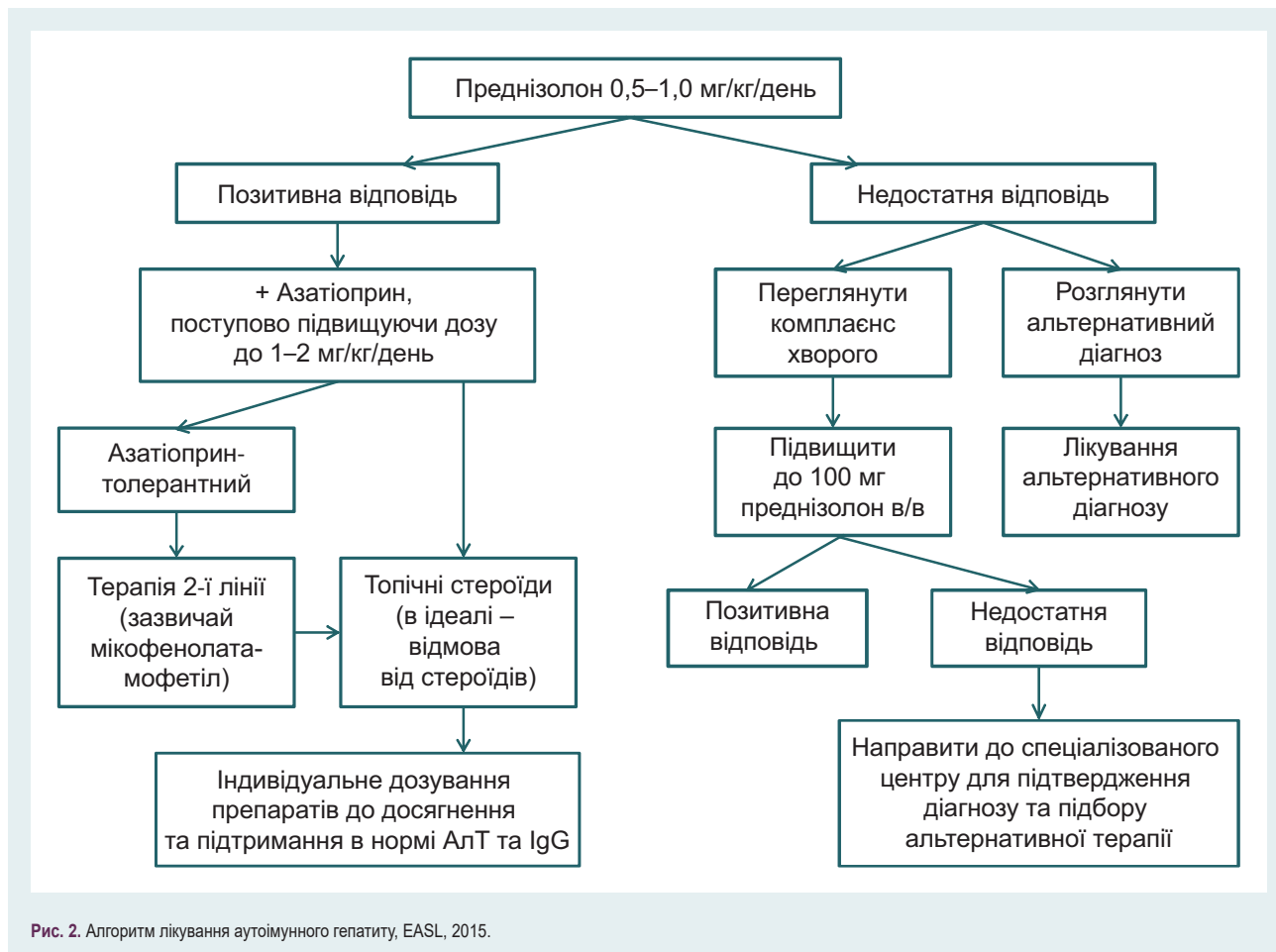


Рис. 2. Алгоритм лікування аутоімунного гепатиту, EASL, 2015.

Лікування має тривати мінімум 3 роки й мінімум 2 роки після нормалізації амінотрансфераз та IgG. Протягом 12 місяців після відміни (відмови) від ліків у 50–90 % випадків виникає рецидив захворювання.

У 2017 р. вийшли рекомендації EASL із ведення хворих на ПБХ [10]. Основний препарат для лікування – урсодезоксихолева кислота (УДХК) [21], яка призначається в дозах 13–15 мг/кг/добу. Через один рік оцінюють ефективність терапії, якщо є ефект, терапія УДХК призначається тривало (фактично довічно) або до трансплантації. За відсутності ефекту призначають другу лінію лікування: обетіхолову кислоту [14], будесонід, фібрати. Найбільш перспективним засобом вважають обетіхолову кислоту, яку активно впроваджують останні роки. На жаль, в Україні вона поки не зареєстрована.

До хірургічних методів лікування АІГ, ПБХ, ПСХ належить трансплантація печінки [7,9,10,12,17,20,23]. При стриктурах великих протоків під час ПСХ можливе стентування біліарних протоків [17,20]. У нашій країні ці види лікування застосовуються вкрай рідко через низку причин.

Клінічні приклади

Приклад 1. Хвора Н., 56 років, направлена ендокринологом, страждає на цукровий діабет 2 типу, інсулінозалежний, протягом 8 років. Під час останньої госпіталізації в зв'язку з ризиком гіперглікемічної коми виявлені вперше підвищені АлТ, АсТ до 10 норм при нормальних показниках ЛФ, ГГТП, білірубину тощо.

Скарг із боку шлунково-кишкового тракту не має, раніше на гепатити не страждала. Алкоголь майже не вживає, з токсичними речовинами не працювала. Кілька років отримує інсуліни, антигіпертензивний засіб вальсартан+гідрохлортіазид, аспірин приймала давно, інші НПЗП і нові ліки не приймала. ІМТ = 34,2 кг/м².

При дообстеженні виключено вірусні причини гепатиту, виявлено високі титри антитіл ANA, хоча інші – SMA, анти-LKM, анти-SLA, анти-LP, AMA-M2 – були негативні. Рівень IgG вище норми – 17,6 г/л (норма – 7,0–16,0 г/л). Під час УЗД виявлено гепатомегалію, ознаки хронічного холециститу, панкреатиту. На еластограмі жорсткість печінки відповідала F0, тобто фіброз не визначено. Виставили ймовірний діагноз АІГ І типу, вперше виявлений, гострий перебіг. Ураховуючи високу активність гепатиту, показаний преднізолон у початковій дозі 60 мг. Але системні кортикостероїди можуть викликати підвищення глюкози та розвиток діабету, а в цьому випадку – погіршення діабету. Тому через високі показники глюкози, високий ризик декомпенсації діабету обрали дозу 40 мг преднізолону (у перерахунку – 32 мг метилпреднізолону) та одразу додали азатиоприн у дозі 50 мг, бо він не впливає на вуглеводний обмін. На тлі терапії на 5–6 день різко зросли показники глікемії до 20–30 ммоль/л, були істотно підвищені дози інсуліну. З боку печінкового комплексу спостерігали швидку позитивну динаміку, зменшення до 3 норм, а протягом місяця визначали

нормалізацію показників АлТ, АсТ. Тому доза метил-преднізолону зменшена швидше, ніж зазвичай, – за 6 тижнів до 4 мг, а азатиоприну – через 2 тижні збільшена до 100 мг. Такі дози залишаються кілька місяців, зберігається нормальний рівень АлТ, АсТ, нормальний рівень ІgG, стабілізувались показники глікемії.

Приклад 2. Хвора Ю., 44 роки, 58 кг, астеник, звернулася самостійно у зв'язку зі шкірним свербіжем, незначною жовтяницею, підвищеними АлТ, АсТ до 8–10 норм, ЛФ – до 3–4 норм, ГГТП – до 20 норм, з переважаючим холестаза, підвищенням загального та прямого білірубину. Скарги на періодичні болі у правому підребер'ї, після їди. Вірусні маркери негативні. Рівні альбуміну, коагулограми, показники міді, церулоплазміну, феритину, альфа-фетопротеїну нормальні. Виявили високі титри АМА-M2, негативні ANA, SMA, LKM. Під час УЗД, КТ, МРХПГ – гепатомегалія, ознаки початкової портальної гіпертензії, даних про конкременти, ураження протоків немає. Під час ЕГДС не виявили варикозно розширених вен. На еластограмі жорсткість печінки відповідала F1–2. Встановили діагноз ПБХ, призначили терапію УДХК у дозі 13–15 мг/кг. Протягом 1,5 року ефект був мінімальний, дещо знизився цитоліз, хоча свербіж значно зменшився. Додавання преднізолону, азатиоприну – без поліпшення аналізів. Тому доза УДХК збільшена до 1250 мг/добу, тобто до 20 мг/кг. Через 6 місяців – майже нормалізація АлТ, АсТ, зменшення в 2–3 рази ЛФ і ГГТП. На еластограмі погіршення немає. Таку ефективність у хворої можна розцінити як часткову, але це характерно для ПБХ.

Висновки

Діагностика та лікування аутоімунних захворювань печінки є складним процесом. У цьому значно допомагають сучасні рекомендації з ведення хворих із цієї патології. Однак мають значення клінічний досвід лікаря та індивідуальні дані конкретного хворого.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Степанов Ю. М., д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро, Україна.
Косинська С. В., канд. мед. наук, доцент, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро, Україна.
Павленко О. В., канд. мед. наук, доцент каф. інфекційних хвороб, Одеський національний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Степанов Ю. М., д-р мед. наук, профессор, директор ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро, Украина.
Косинская С. В., канд. мед. наук, доцент, ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепро, Украина.
Павленко Е. В., канд. мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней, Одесский национальный медицинский университет, Украина

Information about authors:

Stepanov Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor, Director of the State Institution "Institute of Gastroenterology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine.

Kosynska S. V., MD, PhD, Associate Professor, State Institution "Institute of Gastroenterology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine.

Pavlenko O. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Infectious Diseases, Odesa National Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 12.12.2017

Після доопрацювання / Revised: 06.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 19.02.2018

Список літератури

- [1] A systematic review and meta-analysis of second-line immunosuppressants for autoimmune hepatitis treatment / M. De Lemos-Bonotto, C. Valle-Tovo, A. Costabeber, et al. // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2018. – Vol. 30(2). – P. 212–216.
- [2] Autoantibodies and Autoimmune Disease During Treatment of Children With Chronic Hepatitis C / J. Molleston, W. Meilman, M. Narkewicz, et al. // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. – 2013. – Vol. 56(3). – P. 304–310.
- [3] Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics / N. Gatselis, K. Zachou, G. Koukoulis, G. Dalekos // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21(1). – P. 60–83.
- [4] Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis' / U. Beuers, M. Gershwin, R. Gish, et al. // *Journal of Hepatology*. – 2015. – Vol. 63(5). – P. 1285–1287.
- [5] Clinical features and outcomes of patients with drug-induced autoimmune hepatitis: A retrospective cohort study / A. Licata, M. Maida, D. Cabibi, et al. // *Digestive and Liver Disease*. – 2014. – Vol. 46(12). – P. 1116–1120.
- [6] Corrigan M. Aspects of the Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis / M. Corrigan, G. Hirschfield // *Digestive Diseases*. – 2015. – Vol. 33(2). – P. 102–108.
- [7] Czaja A. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis: Current Status and Future Directions / A. Czaja // *Gut and Liver*. – 2016. – Vol. 10(2). – P. 177–203.
- [8] Czaja A. Global Disparities and Their Implications in the Occurrence and Outcome of Autoimmune Hepatitis / A. Czaja // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2017. – Vol. 62(9). – P. 2277–2292.
- [9] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis / European Association for the Study of the Liver // *Journal of Hepatology*. – 2015. – Vol. 63(4). – P. 971–1004.
- [10] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis / European Association for the Study of the Liver // *Journal of Hepatology*. – 2017. – Vol. 67(1). – P. 145–172.
- [11] Epidemiology and causes of death in a Swedish cohort of patients with autoimmune hepatitis / A. Danielsson Borssén, H. Marschall, A. Bergquist, et al. // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 52(9). – P. 1022–1028.
- [12] Expert clinical management of autoimmune hepatitis in the real world / R. Liberal, Y. de Boer, R. Andrade, et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2017. – Vol. 45(5). – P. 723–732.
- [13] Incidence, prevalence, and natural history of primary sclerosing cholangitis in the United Kingdom / H. Liang, S. Manne, J. Shick, et al. // *Medicine*. – 2017. – Vol. 96(24). – P. e7116.
- [14] Jhaveri M. New developments in the treatment of primary biliary cholangitis – role of obeticholic acid / M. Jhaveri, K. Kowdley // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. – 2017. – Vol. 13. – P. 1053–1060.
- [15] Lapierre P. Regulatory T Cells in Autoimmune and Viral Chronic Hepatitis / P. Lapierre, A. Lamarre // *Journal of Immunology Research*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.
- [16] Manns M. Autoimmune hepatitis – Update 2015 / M. Manns, A. Lohse, D. Vergani // *Journal of Hepatology*. – 2015. – Vol. 62(1). – P. S100–S111.
- [17] Pathogenesis of Primary Sclerosing Cholangitis and Advances in Diagnosis and Management / J. Eaton, J. Talwalkar, K. Lazaridis, et al. // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145(3). – P. 521–536.
- [18] Population-based prevalence, incidence, and disease burden of autoimmune hepatitis in South Korea / B. Kim, H. Choi, M. Ki, et al. // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12(8). – P. e0182391.
- [19] Poupon R. Non-Invasive Assessment of Liver Fibrosis Progression and Prognosis in Primary Biliary Cholangitis / R. Poupon // *Digestive Diseases*. – 2015. – Vol. 33(2). – P. 115–117.
- [20] Singh S. Primary sclerosing cholangitis: diagnosis, prognosis, and management / S. Singh, J. A. Talwalkar // *Clin Gastroenterol Hepatol*. – 2013. – Vol. 11(8). – P. 98–907.

- [21] Surrogate Endpoints for Optimal Therapeutic Response to UDCA in Primary Biliary Cholangitis / H. van Buuren, W. Lammers, M. Harms, B. Hansen // *Digestive Diseases*. – 2015. – Vol. 33(2). – P. 118–124.
- [22] Tanaka A. Environmental basis of primary biliary cholangitis / A. Tanaka, P. Leung, M. Gershwin // *Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 243(2). – P. 184–189.
- [23] The overlap syndrome between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis / A. Floreani, R. Motta, N. Cazzagon, et al. // *Digestive and Liver Disease*. – 2015. – Vol. 47(5). – P. 432–435.
- [24] Type 1 and type 2 autoimmune hepatitis in adults share the same clinical phenotype / P. Muratori, C. Lalanne, A. Fabbri, et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – Vol. 41(12). – P. 1281–1287.
- [25] Vergani D. Autoimmune manifestations in viral hepatitis / D. Vergani, G. Mieli-Vergani // *Seminars in Immunopathology*. – 2013. – Vol. 35(1). – P. 73–85.
- [26] Vierling J. Autoimmune Hepatitis and Overlap Syndromes: Diagnosis and Management / J. Vierling // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2015. – Vol. 13(12). – P. 2088–2108.
- [17] Eaton, J., Talwalkar, J., Lazaridis, K., Gores, G., Lindor, K. (2013). Pathogenesis of Primary Sclerosing Cholangitis and Advances in Diagnosis and Management. *Gastroenterology*, 145(3), 521–536. doi: 10.1053/j.gastro.2013.06.052.
- [18] Kim, B., Choi, H., Ki, M., Kim, K., Jang, E., & Jeong, S. (2017). Population-based prevalence, incidence, and disease burden of autoimmune hepatitis in South Korea. *PLoS ONE*, 12(8), e0182391. doi: 10.1371/journal.pone.0182391.
- [19] Poupon, R. (2015). Non-Invasive Assessment of Liver Fibrosis Progression and Prognosis in Primary Biliary Cholangitis. *Digestive Diseases*, 33(2), 115–117. doi: 10.1159/000440758.
- [20] Singh, S., & Talwalkar, J. (2013). Primary Sclerosing Cholangitis: Diagnosis, Prognosis, and Management. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 898–907. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.016.
- [21] van Buuren, H., Lammers, W., Harms, M., & Hansen, B. (2015). Surrogate Endpoints for Optimal Therapeutic Response to UDCA in Primary Biliary Cholangitis. *Digestive Diseases*, 33(2), 118–124. doi: 10.1159/000440759.
- [22] Tanaka, A., Leung, P., & Gershwin, M. (2018). Environmental basis of primary biliary cholangitis. *Experimental Biology and Medicine*, 243(2), 184–189. doi: 10.1177/1535370217748893.
- [23] Floreani, A., Motta, R., Cazzagon, N., Franceschet, I., Roncalli, M., Del Ross, T., et al. (2015). The overlap syndrome between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Digestive and Liver Disease*, 47(5), 432–435. doi: 10.1016/j.dld.2015.02.002.
- [24] Muratori, P., Lalanne, C., Fabbri, A., Cassani, F., Lenzi, M., & Muratori, L. (2015). Type 1 and type 2 autoimmune hepatitis in adults share the same clinical phenotype. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(12), 1281–1287. doi: 10.1111/apt.13210.
- [25] Vergani, D., & Mieli-Vergani, G. (2013). Autoimmune manifestations in viral hepatitis. *Seminars in Immunopathology*, 35(1), 73–85. doi: 10.1007/s00281-012-0328-6.
- [26] Vierling, J. (2015). Autoimmune Hepatitis and Overlap Syndromes: Diagnosis and Management. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(12), 2088–2108. doi: 10.1016/j.cgh.2015.08.012.

References

- [1] De Lemos-Bonotto, M., Valle-Tovo, C., Costabeber, A., Mattos, A., & Azeredo-da-Silva, A. (2018). A systematic review and meta-analysis of second-line immunosuppressants for autoimmune hepatitis treatment. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 30(2), 212–216. doi: 10.1097/MEG.0000000000001019.
- [2] Molleston, J., Mellman, W., Narkewicz, M., Balistreri, W., Gonzalez-Peralta, R., Jonas, M., et al. (2013). Autoantibodies and Autoimmune Disease During Treatment of Children With Chronic Hepatitis C. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(3), 304–310. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182774cae.
- [3] Gatselis, N., Zachou, K., Koukoulis, G., & Dalekos, G. (2015). Auto-immune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 60–83. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.60.
- [4] Beuers, U., Gershwin, M. E., Gish, R. G., Invernizzi, P., Jones, D. E. J., Lindor, K., et al. (2015). Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'. *Journal of Hepatology*, 63(5), 1285–1287. doi: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.031.
- [5] Licata, A., Maida, M., Cabibi, D., Butera, G., Macaluso, F., Alessi, N., et al. (2014). Clinical features and outcomes of patients with drug-induced autoimmune hepatitis: A retrospective cohort study. *Digestive and Liver Disease*, 46(12), 1116–1120. doi: 10.1016/j.dld.2014.08.040.
- [6] Corrigan, M., & Hirschfield, G. (2015). Aspects of the Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis. *Digestive Diseases*, 33(2), 102–108. doi: 10.1159/000440755.
- [7] Czaja, A. (2016). Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis: Current Status and Future Directions. *Gut and Liver*, 10(2), 177–203. doi: 10.5009/gnl15352.
- [8] Czaja, A. (2017). Global Disparities and Their Implications in the Occurrence and Outcome of Autoimmune Hepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 62(9), 2277–2292. doi: 10.1007/s10620-017-4675-y.
- [9] European Association for the Study of the Liver (2015) EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*, 63(4), 971–1004. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.030.
- [10] European Association for the Study of the Liver (2017) EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *Journal of Hepatology*, 67(1), 145–172. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.022.
- [11] Danielsson Borssén, Å., Marschall, H. U., Bergquist, A., Rorsman, F., Weiland, O., Kechagias, S., et al. (2017). Epidemiology and causes of death in a Swedish cohort of patients with autoimmune hepatitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(9), 1022–1028. doi: 10.1080/00365521.2017.1335772.
- [12] Liberal, R., de Boer, Y., Andrade, R., Bouma, G., Dalekos, G., Floreani, A., Gleeson, D., et al. (2017). Expert clinical management of autoimmune hepatitis in the real world. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 45(5), 723–732. doi: 10.1111/apt.13907.
- [13] Liang, H., Manne, S., Shick, J., Lissos, T., & Dolin, P. (2017). Incidence, prevalence, and natural history of primary sclerosing cholangitis in the United Kingdom. *Medicine*, 96(24), e7116. doi: 10.1097/MD.00000000000007116.
- [14] Jhaveri, M., & Kowdley, K. (2017). New developments in the treatment of primary biliary cholangitis – role of obeticholic acid. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 13, 1053–1060. doi: 10.2147/TCRM.S113052.
- [15] Lapiere, P., & Lamarre, A. (2015). Regulatory T Cells in Autoimmune and Viral Chronic Hepatitis. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–9. doi: 10.1155/2015/479703.
- [16] Manns, M., Lohse, A., & Vergani, D. (2015). Autoimmune hepatitis – Update 2015. *Journal of Hepatology*, 62(1), S100–S111. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.005.

The case of synchronous fallopian tube and endometrium cancer. Clinical observation

A. M. Romaniuk, N. I. Gyryavenko, M. S. Lyndin, V. V. Sikora, A. M. Piddubnyi

Sumy State University, Ukraine

Background. The problems of pre-operative cancer diagnosis of the fallopian tube are associated with a rare occurrence of this disease. More rarely, there is a combination of the fallopian tube cancer and other gynecological tumors. Clinical observation of the fallopian tube cancer and endometrial cancer in postmenopausal woman is presented, which demonstrates the difficulty of the pre-operative diagnostics of these pathologies combination.

Case presentation. We described a case of uterine tube cancer in Ukrainian woman (77 years), which had been combined with adenocarcinoma of an endometrium.

Conclusion. Primary fallopian tubes carcinoma is a rare disease with an insufficiently studied etiology. The clinical manifestations are not always present in full. Diagnosis in pre-operative period is very hard to establish. Only the qualitative morphological investigation allows establishing the primary lesion of the fallopian tube. Introducing immunohistochemical investigations in practice serves as additional methods for correct diseases diagnostic, which allow more fully characterizing the prognosis and suggesting appropriate treatment of the patients.

Key words:

adenocarcinoma, Fallopian tube, prognosis.

Pathologia

2018; 15 (1), 109–113

DOI:

10.14739/2310-1237.2018.1.129192

E-mail:

pathomorph@gmail.com,
n.gyryavenko@med.sumdu.edu.ua

Випадок синхронного раку маткової труби та ендометрія. Клінічне спостереження

A. M. Романюк, Н. І. Гирявенко, М. С. Линдін, В. В. Сікора, А. М. Піддубний

Проблеми доопераційної діагностики раку маткової труби пов'язані з рідкістю виникнення цього захворювання. Ще рідше спостерігають поєднання раку маткової труби та інших гінекологічних пухлин. Наведено клінічне спостереження раку маткової труби та раку ендометрія в жінки в постменопаузі, яке демонструє складності доопераційної діагностики комбінації цих патологій.

Представлення випадку. Описали випадок раку маткової труби в української жінки (77 років), який поєднувався з аденокарциномою ендометрія.

Висновки. Первинний рак маткових труб є рідкісною патологією з недостатньо вивченою етіологією. Клінічні прояви не завжди наявні в повному обсязі. Діагноз у передопераційному періоді встановлюють рідко. Тільки якісне морфологічне дослідження дає можливість визначити первинність ураження маткової труби. Впровадження імуногістохімічних досліджень у практику є додатковим методом для правильної діагностики захворювань, які дають змогу точніше охарактеризувати прогноз і запропонувати адекватні методи лікування пацієнтів.

Ключові слова:

первинна аденокарцинома, фаллопієва труба, прогноз.

Патологія. – 2018. –

Т. 15, № 1(42). – С. 109–113

Случай синхронного рака маточной трубы и эндометрия. Клиническое наблюдение

A. H. Романюк, Н. И. Гирявенко, Н. С. Линдин, В. В. Сикора, А. М. Поддубный

Проблемы дооперационной диагностики рака маточной трубы связаны с редкой встречаемостью данного заболевания. Еще реже отмечают сочетание рака маточной трубы и других гинекологических опухолей. Представлено клиническое наблюдение рака маточной трубы и рака эндометрия у женщины в постменопаузе, которое демонстрирует сложности дооперационной диагностики комбинации данных патологий.

Представление случая. Описали случай рака маточной трубы у украинской женщины (77 лет), который сочетался с аденокарциномой эндометрия.

Выводы. Первичный рак маточных труб – редкая патология с недостаточно изученной этиологией. Клинические проявления не всегда присутствуют в полном объеме. Диагноз в предоперационном периоде устанавливают редко. Только качественное морфологическое исследование позволяет установить первичность поражения маточной трубы. Иммуногистохимические исследования на практике служат дополнительными методами для правильной диагностики заболеваний, позволяют более полно охарактеризовать прогноз и предложить адекватные методы лечения пациентов.

Ключевые слова:

первичная аденокарцинома, фаллопиева труба, прогноз.

Патология. – 2018. –

Т. 15, № 1(42). – С. 109–113

Background

To date, the fallopian tube tumors are ranged from 0.3 % to 1.1 % of all malignant tumors of the female genital organs, being the most rare oncogynecology disease [1]. It was described for the first time in 1847 by Reno. According to available statistics, in average 3.6 cases of malignant fallopian tube tumors per 1 million women [2,3] are registered annually in the United States. The most

of the malignant fallopian tube tumors have epithelial nature and are presented by serous adenocarcinomas (60–90 %); however, in practical activities almost all morphological forms of epithelial and stromal neoplasms occur [4]. Diagnostics of this tumor is difficult, due to the low severity of the clinical picture. According to literature data, the frequency of the diagnosis of this pathology on pre-operative stage fluctuates up to 21 % [3,5].

Sometimes the fallopian tube cancer (FTC) is a random finding during the surgery on the uterus and parovarium with other diseases. More than 60 % cases of the FTC occur with postmenopausal women [6]. However till now the risk factors of this disease remain insufficiently studied. These include reproductive tract infections, genetic factors (the presence of the defective gene BRCA1 and BRCA2) and others [7]. Fallopian tubes are frequently secondarily affected, provided the ovarian, uterus body, gastrointestinal tract, mammary glands are affected for the first time. Development of the synchronous tumors in oncogynecology ranges to 6 % cases maximum [8], even more rarely it is possible to find a combination of the fallopian tube tumors and other gynecological tumors. We present a clinical case of the patient with the primary fallopian tube cancer (PFTC) in combination with endometrial cancer. This case report of the relatively rare disease demonstrates the nonspecific clinical course and the difficulty of timely disease diagnostics.

Case presentation

A 77-year-old Ukrainian female patient was admitted to the Clinical Oncological Dispensary with complaints on bleeding from the genital organs. Menopause is during 24 years. Complaints have appeared about a year ago. A family oncological anamnesis of the patient was not burdened. Gynecological examination revealed that the uterus is not enlarged, relatively movable, uterine appendages are not palpable.

The transvaginal ultrasound examination: endometrial hyperplasia with increased vascularization, uterine appendages are unchanged (Fig. 1).

In order to establish the diagnosis endometrial biopsy in the dashed scrapings form was performed. The result of histological examination showed growth of the highly differentiated endometrioid adenocarcinoma (ICD – C 54.1).

After X-ray examination of lungs pathological changes were not found. Laboratory researches showed the presence of the leukocytosis (12.5×10^9) in the blood, but the other indicators were presented in the normal range.

The diagnosis was the following: a malignant neoplasm of the uterus body (endometrium), st.1, gr.2; and she has been operated – hysterectomy with uterine appendages, resection of the greater omentum.

Intraoperative: the uterus was not enlarged, the tumor was located in the uterus cavity, in the form of friable sebaceous growths. The right and left ovaries, right fallopian tube were not changed. The left fallopian tube was in the form of sacculated tumor with a next size: $4.0 \times 4.0 \times 3.5$ cm. On the cut the lesion tube was like a cavity, it was filled by gray-pink masses in the form of cauliflower (Fig. 2).

On the left, fallopian tube in the sacculated tumor mass form, on the cut in the form of a cauliflower; the left ovary is normal (1). In the uterine cavity the tumor is in the form of loose sebaceous growths (2).

Histological tissue characteristics were studied with using of serial stepped sections, stained with hematoxylin and eosin. The result of histological studies: 1. Endometrium tumor – highly differentiated endometrial adenocarcinoma with superficial invasion into myometrium (M8140/3 G₁ – the absence areas of a solid structure, with prevalence of low nuclei atypia of the epithelial cells) (Fig. 3-1). 2. The left fallopian tube tumor – serous papillary adenocarcinoma of the fallopian tube with tumor invasion into the muscle layer (M8441/3 G₂ – tumor consisting of short papillary structures with dense fibrous stroma, atypia, polymorphism and hyperchromatosis of the nuclei, and high nuclear cytoplasmic ratio) (Fig. 3-2).

To determine the histogenesis of these neoplasias, the stage of their proliferative activity and tumor cells anaplasia, characteristics of prediction and selection of appropriate methods of patient treatment, we conducted the immunohistochemical investigations using the following markers (Table 1).

For immunohistochemical investigations sections were produced with the thickness of 3–4 mcm, which were subjected to the standard process of dewaxing and dehydration in xylol and alcohols in rising concentration. Immunohistochemical reaction was held in two stages: I – Incubation with primary monoclonal antibodies in dilution from 1:100 to 1:400, during the 30 minutes ($t = 37^\circ\text{C}$);

Table 1. Antibodies for immunohistochemical reaction

Antibody	Host	Clone	Dilution	Cellular localization
ERα	Rabbit	SP1	1:200	Nuclear
PR	Rabbit	YR85	1:150	Nuclear
p53	Mouse	SP5	1:100	Nuclear
Ki-67	Rabbit	SP6	1:100	Nuclear

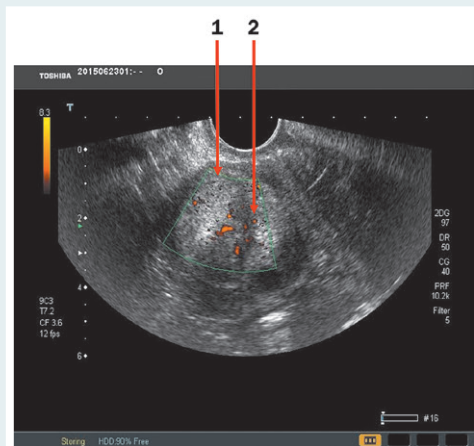


Fig. 1. The transvaginal ultrasound examination.
1: uterus;
2: foci of vascularization.

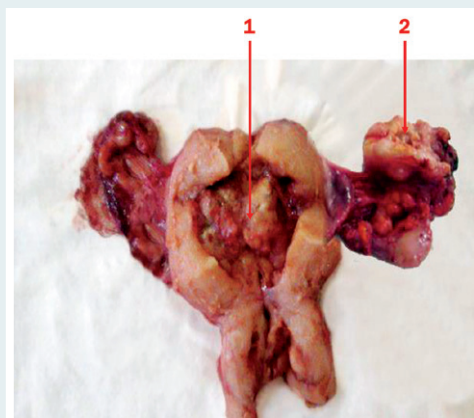


Fig. 2. Macroscopic picture of postoperative material.

II – Incubation with secondary antibodies (UltraVision), during the 30 minutes ($t = 37^{\circ}\text{C}$). As a chromogen diaminobenzidine ($t = 37^{\circ}\text{C}$, 30 minutes) was used with Mayer's hematoxylin staining of the negatively stained nuclei.

The immunohistochemical investigations of the endometrium tumor showed the intensive reaction to the estrogen receptors and progesterone. The Ki-67 proliferation marker in the endometrium tumor was weakly positive, only about 10 % of the nuclei were positive. The negative reaction to the anti-p53 antibodies was observed (Fig. 4).

At the same time immunohistochemical investigations of the left fallopian tube tumor showed a negative reaction to the estrogen and progesterone receptors. Very intensive reaction was observed to the anti-Ki-67 antibodies, where more than a 90 % of tumor nuclei were positive. Ki-67 is a reliable indicator of proliferation in almost all human tumor formations. Also, the intensive reaction was observed with anti-p53 antibodies, where more than 90 % of tumor cells nuclei were positive (Fig. 5).

This aspect of the immunohistochemistry showed that a profound violation of the genetic program with the emergence of mutant p53 gene occurred in this case and a relationship between an increase in the expression of p53 and the growth of morphological atypia and malignancy stage was detected.

The postoperative period was unremarkable. At this time the patient is on a dynamic observation.

Discussion

PFTC is the most rare malignant tumor of the female genital organs [1,9]. To date, in the United States about 2,000 cases of the PFTC were reported [10]. FTC is the most often found after the fourth decades of the life, with an average age of 62 years (17–88 years) [11,12]. The total five-year survival ranges from 14 % to 57 % [4,9]. The rare occurrence of the FTC allows asserting that the experience of even a small number of observations

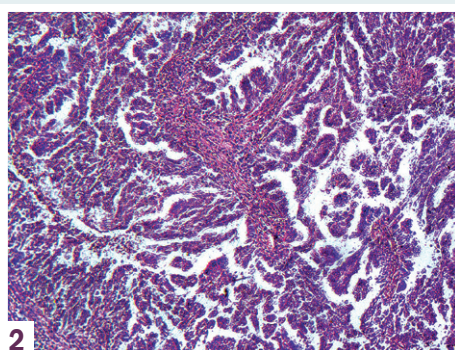
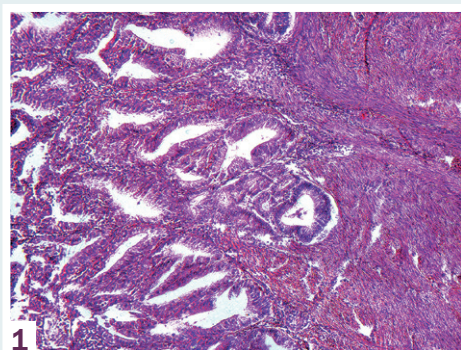


Fig. 3. The tumor of endometrium (1) and left fallopian tube (2). Staining with hematoxylin-eosin.

Zoom $\times 100$.

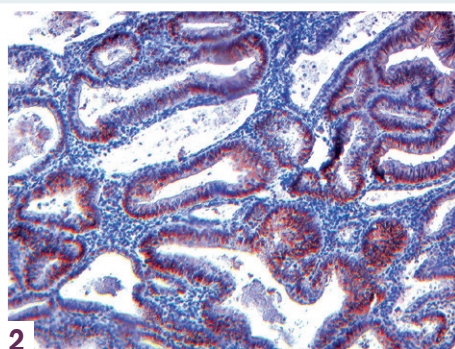
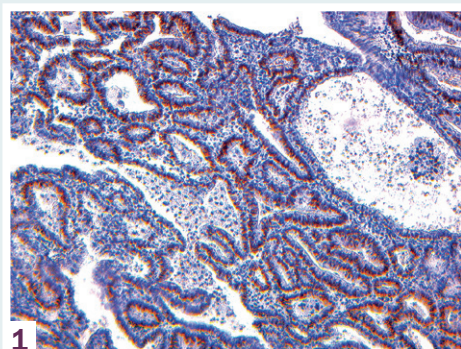
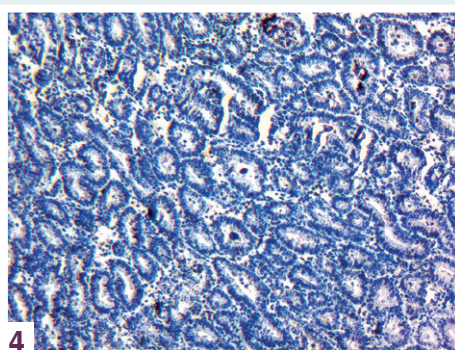
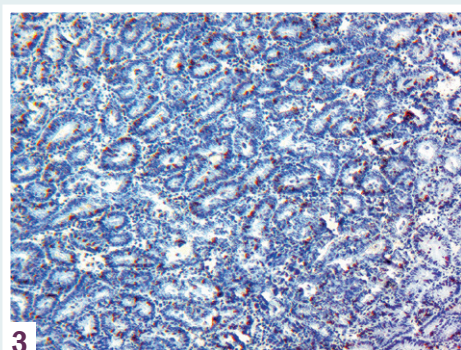


Fig. 4. The tumor of endometrium.

1: intensely positive tumor cells for estrogen receptors;
2: intensely positive tumor cells for progesterone receptors;
3: weak positive reaction to the Ki-67;
4: negative reaction to p53. The immunohistochemical reactions.

Zoom $\times 100$.



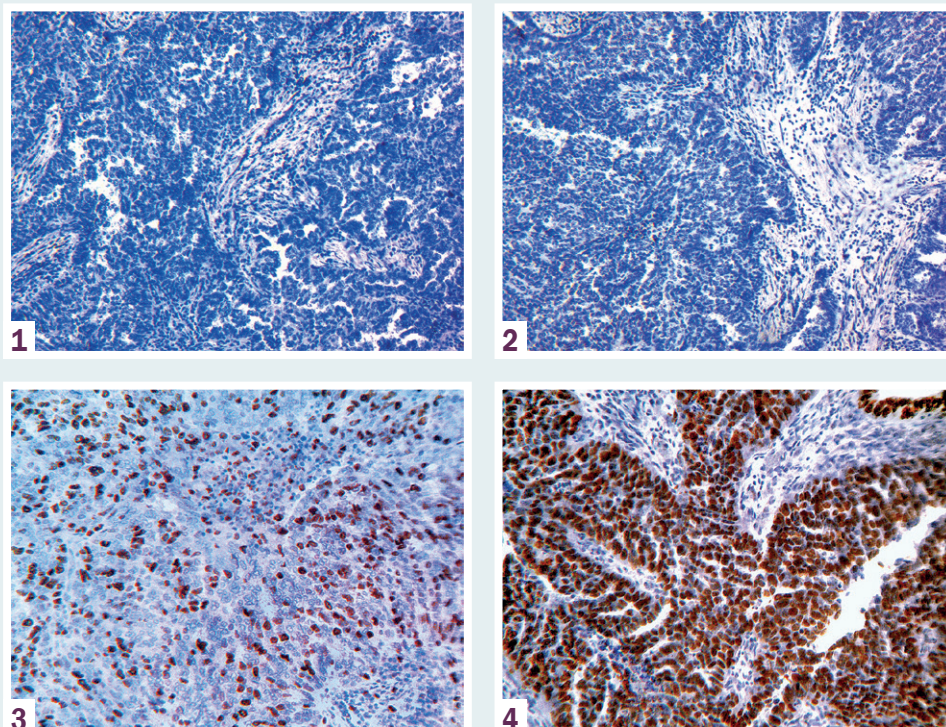


Fig. 5. The left fallopian tube.

1: negative tumor cells for estrogen receptors;
 2: negative tumor cells for progesterone receptors;
 3: intensely positive reaction to the Ki-67;
 4: intensely positive reaction to the p53. The immunohistochemical reactions.

Zoom $\times 100$.

has an undoubted scientific and practical interest. Many authors believe that the actual incidence of the PFTC is much higher, because the most cases of serous carcinoma are erroneously diagnosed as ovarian cancer. You cannot find enough information in the literature about the simultaneous presence of endometrium and fallopian tube tumors either. These neoplasias at an early stage are asymptomatic, in connection with that the diagnosis is rarely set on the pre-operative stage. The most common symptoms of PFTC are abdominal pain, vaginal bleeding, watery discharge from the genital tract, general condition impaired and palpation of tumor formation in the pelvis [11]. In this case the symptoms were meager, and maybe associated with the presence of endometrial tumor. The differential diagnosis of these two locations is quite complicated. Determining the level of tumor marker CA-125 in the blood serum is very important in FTC diagnostics. However, in this case, the research was not conducted. For better FTC diagnostics it is reasonable to conduct a comprehensive survey which includes the ultrasound examination, computed tomography, a diagnostic laparoscopy with biopsy and tumor marker CA-125 determination.

The results of histological and immunohistochemical research showed that in this case there were two absolutely different tumors, which have different sensitivity to the treatment and prognosis. Moreover, adventitiously detected fallopian tube tumor had more unfavorable indicators (a lower degree of differentiation, the absence of steroid receptors, high level of the Ki-67 and p53 receptors expression), as compared with uterus body tumor.

All aforesaid demonstrates the necessary of individual approach to each case of the FTC and requires a separate choice of the treatment tactics, with considering independent prognostic disease factors.

Conclusion

Primary fallopian tubes carcinoma is a rare disease with an insufficiently studied etiology. The clinical manifestations are not always present in full. Diagnosis in pre-operative period is very hard to establish. Only the qualitative morphological investigation allows establishing the primary lesion of the fallopian tube. Introducing immunohistochemical investigations in practice serves as additional methods for correct diseases diagnostic, which allow more fully characterizing the prognosis and suggesting appropriate treatment of the patients.

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

Information about authors:

Romaniuk A. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Pathology Department, Sumy State University, Ukraine.

Guryavenko N. I., MD, Assistant of the Pathology Department, Sumy State University, Ukraine.

Lyndin M. S., MD, PhD, Assistant of the Pathology Department, Sumy State University, Ukraine.

Sikora V. V., MD, Postgraduate Student of the Pathology Department, Sumy State University, Ukraine.

Piddubnyi A. M., MD, Postgraduate Student of the Pathology Department, Sumy State University, Ukraine.

Відомості про авторів:

Романюк А. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії, Сумський державний університет, Україна.

Гирявенко Н. І., асистент каф. патологічної анатомії, Сумський державний університет, Україна.

Линдін М. С., канд. мед. наук, асистент каф. патологічної анатомії, Сумський державний університет, Україна.

Сікора В. В., аспірант каф. патологічної анатомії, Сумський державний університет, Україна.

Піддубний А. М., аспірант каф. патологічної анатомії, Сумський державний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Романюк А. Н. д-р мед. наук, профессор, зав. каф. патологической анатомии, Сумский государственный университет, Украина.
 Гирявенко Н. И., ассистент каф. патологической анатомии, Сумский государственный университет, Украина.
 Лындин Н. С., канд. мед. наук, ассистент каф. патологической анатомии, Сумский государственный университет, Украина.
 Сикора В. В., аспирант каф. патологической анатомии, Сумский государственный университет, Украина.
 Поддубный А. М., аспирант каф. патологической анатомии, Сумский государственный университет, Украина.

Надійшла до редакції / Received: 28.11.2017

Після доопрацювання / Revised: 27.12.2017

Прийнято до друку / Accepted: 15.02.2018

References

- [1] Tavassoli, F. A., & Devilee, P. (2003). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs* IARC Press, Lyon.
- [2] Rosenblatt, K. A., Weiss, N. S., & Schwartz, S. M. (1989). Incidence of malignant fallopian tube tumors. *Gynecol Oncol*, 35, 236–9. doi: [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(89\)90051-6](https://doi.org/10.1016/0090-8258(89)90051-6).
- [3] Benoit, M. F., & Hannigan, E. V. (2006). A 10-year review of primary fallopian tube cancer at a community hospital: a high association of synchronous and metachronous cancers. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 16(1), 29–35. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00292.x.
- [4] Yuen, J. H., Wong, G. C., & Lam, C. H. (2002). Preoperative sonographic diagnosis of primary fallopian tube carcinoma. *J Ultrasound Med*, 21(10), 1171–1173. doi: 10.7863/jum.2002.21.10.1171.
- [5] Pectasides, D., Pectasides, E., & Economopoulos, T. (2006). Fallopian tube carcinoma: a review. *Oncologist*, 11, 902–912. doi: 10.1634/theoncologist.11-8-902.
- [6] Benedet, J. L., Bender, H., Jones, H., Nagan, H. Y., & Pecorelli, S. (2000). FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynaecological cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet*, 70, 209–62. doi: 10.1016/S0020-7292(00)90001-8.
- [7] Colgan, T. J. (2003). Challenges in the early diagnosis and staging of Fallopian tube carcinomas associated with BRCA mutations. *Int J Gynecol Pathol*, 22, 109–20.
- [8] Tong, S. Y., Lee, Y. S., Park, J. S., Bae, S. N., Lee, J. M., & Namkoong, S. E. (2008). Clinical analysis of synchronous primary neoplasms of the female reproductive tract. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 136, 78–82. doi: 10.1016/j.ejogrb.2006.09.010.
- [9] Nordin, A. J. (1994). Primary carcinoma of fallopian tube: a 20-year literature review. *Obstet Gynecol Surv*, 49, 349–61.
- [10] Oliveira, C., Duarte, H., Bartosch, C., & Fernandes, D. (2013). Small fallopian tube carcinoma with extensive upper abdominal dissemination: a case report. *J Med Case Rep*, 7(1), 252. doi: 10.1186/1752-1947-7-252.
- [11] Deffieux, X., Morice, P., Thoury, A., Camatte, S., Duvillard, P., & Castaigne, D. (2005). Extension lymphatique pelvienne et lombo-aortique dans le cancer de la trompe: topographie et implications chirurgicales. *Gynecol Obstet Fertil*, 33(1–2), 23–8. doi: 10.1016/j.gyobfe.2004.11.008.
- [12] Pectasides, D., Pectasides, E., Papaxoinis, G., Andreadis, C., Papatsibas, G., Fountzilias, G. et al. (2009). Primary fallopian tube carcinoma: Results of a retrospective analysis of 64 atients. *Gynecol Oncol.*, 115(1), 97–101. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.06.025.

Чоловіча інфертильність в умовах великого промислового міста: роль хімічних, фізичних та емоційних факторів

О. О. Ломейко, Ю. М. Колесник, Н. В. Авраменко

Запорізький державний медичний університет, Україна

Ключові слова:

чоловіча інфертильність, активні форми кисню, спермограма, хімічні фактори, випромінювання, стрес.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 114–121

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129334

E-mail: elena.bogomaz1009@gmail.com

Проблема безплідних шлюбів загострилась останнім часом у світі. Нині нараховують від 60 до 80 млн безплідних пар, у 50 % випадків безплідність зумовлена чоловічим фактором.

Мета роботи – проаналізувати відомості фахової літератури для узагальнення даних про етіологію та патогенез чоловічого безпліддя в умовах урбанізації та дії факторів довкілля.

Матеріали та методи. Доступні наукові джерела, присвячені механізмам виникнення чоловічого безпліддя в умовах урбанізації, опрацьовані методами оглядового, системного та контент-аналізу. Наведені дані світової статистики та проаналізовані результати сучасних досліджень, що присвячені впливу хімічних, фізичних та емоційних факторів на параметри чоловічої інфертильності. Особливу увагу приділено активним формам кисню та параметрам, які показують морфологічний і функціональний стан сперматозоїдів, а також проблемам чоловічої інфертильності, котрі потребують вирішення. Проаналізовано також інші чинники, що впливають на чоловіче безпліддя: харчові фактори в умовах урбанізації, роль хімічних сполук антропогенного середовища, значення емоційних факторів і ризик, зумовлений фізичними факторами.

Висновки. Підтверджено, що зовнішні умови мають серйозний вплив на розвиток захворювань репродуктивного апарату чоловіків, хоча їх причина та структура досі викладаються нечітко, вони є суперечливими, незважаючи на переконливий перелік чинників, що порушують сперматогенез. На підставі вивчених джерел наукової літератури можна стверджувати: немає єдиної моделі пригнічення чоловічої репродуктивної функції, котра зможе пояснити патогенетичні зміни в різних складових репродуктивного апарату залежно від спрямованості та сили дії несприятливого чинника. Створення такої моделі дасть змогу цілеспрямовано підійти до питання профілактики порушень репродуктивної функції в умовах дії різних зовнішніх факторів. Для виявлення взаємозв'язку між стресом і розвитком вторинного безпліддя та субфертильності в чоловіків надалі потрібне вивчення отриманих закономірностей на основі клініко-лабораторних, статистичних, епідеміологічних досліджень.

Ключевые слова:

мужская инфертильность, активные формы кислорода, спермограмма, химические факторы, излучение, стресс.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 114–121

Мужская инфертильность в условиях большого промышленного города: роль химических, физических и эмоциональных факторов

Е. А. Ломейко, Ю. М. Колесник, Н. В. Авраменко

Проблема бесплодных браков обострилась в последнее время в мире. На сегодня насчитывается от 60 до 80 млн бесплодных пар, в 50 % бесплодность обусловлена мужским фактором.

Цель работы – проанализировать сведения специализированной литературы для обобщения данных про этиологию и патогенез мужского бесплодия в условиях урбанизации и действия факторов внешней среды.

Материалы и методы. Доступные научные источники, посвященные механизмам возникновения мужского бесплодия в условиях урбанизации, изучены методами обзорного, системного и контент-анализа. Приведены данные мировой статистики и проанализированы результаты современных исследований, посвященных влиянию химических, физических и эмоциональных факторов на параметры мужской инфертильности. Акцентируется на активных формах кислорода и параметрах, отображающих морфологическое и функциональное состояние сперматозоидов, а также изучены проблемы мужской инфертильности, требующие решения. Проанализирован ряд других факторов, влияющих на мужское бесплодие: пищевые факторы в условиях урбанизации, роль химических соединений антропогенной среды, значение эмоциональных факторов и риск, обусловленный физическими факторами.

Выводы. Подтверждено, что внешние условия имеют серьезное влияние на развитие заболеваний репродуктивного аппарата мужчин, хотя их причины и структура до сих пор излагаются нечетко, являются спорными, несмотря на убедительный список факторов, нарушающих сперматогенез. На основании изученных источников можно утверждать, что не существует единой модели угнетения мужской репродуктивной функции, которая сможет объяснить патогенетические изменения в различных составляющих репродуктивного аппарата в зависимости от направленности и силы действия неблагоприятного фактора. Создание такой модели позволит направленно подойти к вопросу профилактики нарушения репродуктивной функции в условиях действия различных внешних факторов. Для изучения взаимосвязи между стрессом и развитием вторичного бесплодия и субфертильности у мужчин необходимо дальнейшее изучение полученных закономерностей на основании клинико-лабораторных, статистических и эпидемиологических исследований.

Male infertility in a large industrial city: the role of chemical, physical and emotional factors

O. O. Lomeiko, Yu. M. Kolesnyk, N. V. Avramenko

The problem of infertile marriages has worsened recently in the world. Today there are 60.0 to 80.0 million infertile couples, in 40.0% of cases married couples are infertile due to a man's fault.

The aim of the work is to analyze specialized scientific literature for generalization of data on modern views on etiology and pathogenesis of male infertility in urbanization.

Materials and methods. Available scientific sources over the past five years, devoted to the mechanisms of male infertility in urbanization are studied by the methods of overview, system and content analysis. The data of the world statistics are presented and the data of modern researches devoted to the influence of chemical, physical and emotional factors on the parameters of male infertility are analyzed. It is accentuated on active forms of oxygen and parameters that reflect the morphological and functional state of spermatozoa, as well as the problems of male infertility that need to be addressed. A number of other factors affecting male infertility have been analyzed, in particular: food factors in urbanization, the role of chemical compounds in the anthropogenic environment, the importance of emotional factors and the risk caused by physical factors.

Conclusions. It has been confirmed that external conditions have a serious impact on the development of reproductive system disorders in men, although their causes and structure are still unclear, are controversial despite a convincing list of factors that interfere with spermatogenesis. Based on the sources studied, it can be argued that there is no single model of oppression of the male reproductive function that can explain pathogenetic changes in various components of the reproductive apparatus, depending on the direction and strength of the adverse factor. The creation of such a model will make it possible to approach the issue of prevention of reproductive disorders in a context of various external factors. To study the relationship between stress and the development of secondary infertility and subfertility in men, it is necessary to study further the patterns obtained on the basis of clinical-laboratory, statistical and epidemiological studies.

Key words:
male infertility,
reactive oxygen
species,
spermogram,
hazardous
chemical, radiation,
life stress.

Pathologia
2018; 15 (1), 114–121

Одна з важливих проблем останнього десятиліття – старіння населення на тлі зниження народжуваності. Зростає кількість безплідних шлюбів, погіршуються показники, що характеризують репродуктивне здоров'я населення. Ці процеси спостерігаються в багатьох економічно розвинених країнах світу, в тому числі державах Західної та Східної Європи [7,28,38]. Подібні тенденції простежуються і в нашій країні [9].

За даними статистики, кількість безплідних пар на сьогодні сягає 19 %, і частка чоловічого безпліддя становить 50 % [27]. Ці дані підтвержені нормативними документами ВООЗ, в яких відзначено, що половина безплідних пар не можуть народити дитину саме внаслідок безпліддя чоловіка [22].

За останнє десятиліття з'ясовані етіологія, патогенез, розроблені ефективні методи лікування багатьох патологічних станів, які призводять до чоловічого безпліддя. Здебільшого єдиною аномалією є патологічна спермограма, а інших відхилень під час комплексного об'єктивного й лабораторного дослідження не виявляють [44]. Найбільш актуальним питанням є зміна показників спермограми як причини чоловічої інфертильності в умовах забруднення великого промислового міста. Зокрема, зростання безпліддя в економічно розвинених країнах пов'язують з дією на репродуктивну систему цілого ряду несприятливих аліментарних, психологічних, медико-соціальних чинників, що призводять до зниження чоловічої фертильності [10].

На думку О. І. Тимченко та співавт., феномен зниження фертильності, крім медико-соціального аспекту, має також глибокий біологічний сенс, що примушує звертати увагу на особливості відтворення того чи іншого угруповання населення та прив'язує вивчення питання до певної території. Розглядаючи територіальні особливості поширення чоловічого безпліддя, передусім слід відзначити низку шкідливих факторів, що можуть впливати на розвиток і функцію чоловічих статевих клітин [9].

Як підтверджено багатьма дослідженнями, рівень чоловічої інфертильності може змінюватись залежно від рівня забрудненості в регіоні. У нашій країні під час вивчення доступних епідеміологічних даних визначили зростання поширеності чоловічого безпліддя в Запо-

різькій, Херсонській, Кіровоградській, Житомирській, Сумській, Луганській, Вінницькій, Волинській областях. Зокрема, за значеннями підвищеного ризику чоловічого безпліддя з урахуванням 95 % довірчого інтервалу (ДІ) виділено Запорізьку область з тринадцятиразовим підвищенням ризику. Майже дворазове підвищення ризику відзначено в Одеській (1,92), Хмельницькій (2,12) та Дніпропетровській (2,37) областях, а в Тернопільській області підвищення ризику встановили в 1,69 раза [9].

Основні причини чоловічого безпліддя розглядаються в багатьох роботах [11]. Зокрема, в дослідженні О. Р. Радченко для виявлення рангових місць провідних чинників ризику здійснили факторний аналіз методом розрахунку інтегральних показників і коефіцієнтів інформативності ризику розвитку безпліддя в чоловіків. Такими факторами, на думку автора, є наявність шкідливих звичок (тютюнокуріння, вживання алкоголю) та порушення стереотипів харчування (41,7 %), контакт із професійними шкідливими факторами понад 5 років (дія високих і низьких температур, запиленість і загазованість – 29,5 %), несприятлива екологічна ситуація (11,9 %), ставлення до свого здоров'я, час звернення до фахівців, активність (7,4 %), психоемоційне перенапруження (несприятливий мікроклімат у сім'ї, конфлікти на роботі – 5,9 %), фізична активність (3,6%) [8].

Отже, найбільш суттєвими слід визнати соціально-економічні, екологічні фактори, спосіб життя, істотну зміну міжособових, зокрема шлюбно-сімейних стосунків [50].

Для реалізації нашої роботи виділили такий етіологічний підхід до вивчення причин чоловічого безпліддя:

I. Фактори зовнішнього середовища: 1) фізичні; 2) хімічні; 3) біологічні.

II. Фактори, що визначаються способом життя чоловіка в умовах урбанізації.

III. Чинники, що зумовлені загальносоматичним станом людини.

Мета роботи

Проаналізувати відомості фахової літератури для узагальнення даних про етіологію та патогенез чоловічого безпліддя в умовах урбанізації та дії факторів довкілля.

Методи дослідження

У процесі дослідження використовували методи семантичного оцінювання наукових документів, порівняння, системного та структурно-логічного аналізу.

Проаналізували фактори довкілля (хімічні, фізичні та емоційні), що трапляються в умовах великого промислового міста та можуть впливати на розвиток чоловічої інфертильності.

Результати та їх обговорення

Оцінюючи роль хімічних сполук, велика кількість дослідників визначають: збільшення частоти випадків чоловічого безпліддя пов'язане безпосередньо з впливом антропогенного забруднення довкілля [20].

Протягом десятиліть у результаті інтенсивної антропогенної активності індустріально розвинених країн у довкілля потрапляють тисячі хімічних сполук, до яких організми не були пристосовані у процесі еволюції, внаслідок чого механізми адаптації до них (зокрема біохімічні системи детоксикації та виведення з організму) повністю не сформувалися. В організм людини хімічні політанти проникають з екологічно забрудненою їжею, водою. Під час досліджень харчових продуктів, грудного молока, еякуляту, сироватки крові, фолікулярної рідини ідентифіковано безліч токсикантів різної природи [2].

Є відомості, що в індустріальних країнах Європи та Америки в чоловіків відбувається зниження концентрації сперматозоїдів [42,45]. У пацієнтів, які мешкають і працюють у промислових районах, встановлені виражені порушення показників спермограми, на відміну від жителів сільськогосподарських областей.

Особливо активна патогенна дія встановлена для діоксину й діоксиподібних сполук, пестицидів, гербіцидів, інсектицидів [25,29]. Трихлорфенілетанол, що належить до класу хлорованих вуглеводнів, викликає значне зниження рухливості сперматозоїдів і пригнічує акросомну реакцію. Показано, що в чоловіків, які працюють на виробництві свинцю, частіше спостерігають астено-, оліго- та тератозооспермію і, відповідно, безпліддя.

Експериментальними дослідженнями визначено, що такі метали, як кадмій, свинець, марганець, ртуть порушують диференціювання сперматоцитів і сперматид, призводячи до оліго-, астено- та тератозооспермії [26,29]. Аналізуючи вплив важких металів на розвиток чоловічої інфертильності, слід вказати на результати роботи X. Wang et al., які вивчили дію низьких концентрацій миш'яку як фактора, що індукує окислювальний стрес, на показники спермограми. Доведено, що в цьому випадку відбувається посилення процесів вільнорадикального окислення у крові та еякуляті [32]. Розвиток окислювального стресу пов'язаний із генерацією активних кисневих метаболітів (НО[•]), що спричиняють ушкодження клітинних мембран. Утворення пероксидного радикалу викликає каскад вільнорадикальних окислювальних процесів, які пов'язані з деструкцією ненасичених фосфоліпідів RH мембран клітин [6]. Надалі доля ненасичених фосфоліпідів, що входять до складу біологічних мембран клітин, залежить від співвідношення прооксидантної та антиоксидантної

складових, які визначають загалом рівень вільних радикалів у клітині.

Також фактором, що безпосередньо впливає на чоловічу фертильність, є фосфор і сполуки, котрі імітують ефекти естрогену або є лігандами рецепторів андрогенів. Ці речовини здатні втручатися у природні шляхи ендокринної регуляції процесів гаметогенезу та стероїдогенезу в чоловічому організмі. До речовин такої дії належить природний естроген рослинного походження (фітоестроген), що потрапляє в організм із харчами [47].

Чималу небезпеку становлять різноманітні групи штучно створених хімічних сполук, що мають естрогенну або антиандрогенну активність і все більше забруднюють довкілля. Ця група сполук включає широко застосовувані у промисловості хімічні речовини, компоненти палива та сполуки, котрі утворюються при згоранні нафтопродуктів (поліциклічні ароматичні вуглеводні, поліхлоровані біфеніли, ефіри фталата, алкілфенольні сполуки), а також хлорорганічні пестициди, інсектициди та фунгіциди, що використовуються в сільському господарстві й тваринництві [33,39,41].

Інші дослідники, аналізуючи спермограми, показали: в усіх групах чоловіків, де діяв конкретний несприятливий чинник, зміни торкнулися кількісних і мікроскопічних показників сперматозоїдів [19]. Balise V. D. et al. відзначають, що у працівників нафтогазової промисловості концентрація сперматозоїдів майже в 10 разів нижча, ніж референсні значення [43]. Ці дослідники, вивчаючи мікроскопічні показники сперматозоїдів у працівників нафтогазової промисловості, встановили зниження загальної рухливості більш ніж в 1,5 раза, відносна кількість нерухомих сперматозоїдів зросла майже на 43 %, що викликано приростом мертвих клітин. Автори припускають: в умовах інтоксикації природним і попутним нафтовим газами відбувається прискорений апоптоз сперматозоїдів.

Важкі метали, нейротропні отрути (фенол, толуол, бензин, хлорид аміаку), котрі використовуються на виробництві в різних галузях промисловості й постійно потрапляють у довкілля [18,36], зумовлюють пригнічення сперматогенної функції унаслідок токсичної дії на сперматогенні клітини, клітини Лейдига, гіпоталамус, гіпофіз і механізми зворотного зв'язку в гіпоталамо-гіпофізарно-гонадальній системі. В експериментальних моделях дія паранітрофенолу на фертильність самців білих щурів призводить до дозозалежних морфологічних змін у сперматогенному епітелії, а також до змін ендокринних функцій статевих залоз.

Зв'язок поширення в довкіллі речовин, які є ендокринними дизрапторами, і поступового зниження фертильного потенціалу населення викликає безперечний інтерес, потребуючи наступних досліджень механізмів виникнення порушень генерацій гермінативних клітин і стероїдогенезу у клітинах Лейдига [14].

У роботі В. П. Маминої та співавт. вивчили дію VI-валентного хрому на стан сперматогенного епітелію щурів. Встановили, що дія CrVI навіть у відносно невисоких дозах призводить до порушення гаметогенезу [5].

Отже, в цій групі дефекти торкаються, в основному, шийки й хвоста сперматозоїдів [21,49]. Крім того, хімічні фактори впливають на рівні тестостерону та лютеїнізуючого гормону в бік зниження, що свідчить про пригнічення тестостеронпродуруючої активності яєчок [10].

Окремо варто виділити хімічні фактори, котрі є наслідком змін харчової поведінки в умовах урбанізації та можуть впливати на розвиток чоловічої інфертильності. Так, в умовах великого промислового міста часто маємо незбалансоване та нездорове харчування. Тому потенційною причиною ідіопатичного безпліддя може бути дефіцит мікроелементів і вітамінів в організмі. Продемонстровано, що саме дефіцит вітамінів і мікроелементів (або порушення їх обміну) в результаті зміни середовища існування сучасної людини, характеру її харчування, способу життя посилює оксидативний стрес і зумовлює розвиток порушень у репродуктивній системі чоловіків [16].

У безробітних чоловіків із недостатнім і неповноцінним харчуванням спостерігають помітне зниження рухливості сперматозоїдів, відносна кількість непрогресивно-рухливих і нерухомих сперматозоїдів була підвищеною, що свідчило про посилену динаміку старіння статевих клітин [2].

Учась оксидативного стресу в патогенезі чоловічого безпліддя зумовила вивчення ефективності різних антиоксидантів (вітамінів, мікроелементів) у лікуванні цього захворювання [3,9]. Антиоксиданти захищають організм від вільних радикалів, що утворюються в результаті фізіологічних і патологічних процесів. За сучасними уявленнями, порушення діяльності тіолзалежних ансамблів – центральна особливість окислювального стресу, неодмінного супутника аномалій сперматогенезу [46]. Припускають, що посилення процесів перекисного окислення біополімерів на тлі зниженого антиоксидантного захисту в еякуляті є однією з причин змін у спермограмі [46].

Аналізуючи вплив фізичних факторів на стан чоловічого здоров'я, слід відзначити: сучасні реалії не виключають виникнення нештатних ситуацій на промислових об'єктах, зокрема атомних електростанціях, унаслідок чого персонал може піддатися зовнішньому опроміненню в різних дозах. Крім того, в разі радіонуклідного забруднення довкілля можуть виникати індуковані радіацією порушення в місцевого населення. Вплив радіаційного та мікрохвильового випромінювання на процеси сперматогенезу розглянуто як в експериментальних, так і у клінічних дослідженнях.

Зокрема, в роботі А. А. Дергілева та співавт. під час одноразового загального гама-опромінення в дозах 0,5–1,5 Гр (потужність дози – 0,3 сГр/с) статевозрілих щурів-самців Вістар встановлено різну променеву реакцію статевих клітин на різних стадіях сперматогенезу, починаючи з дози 0,5 Гр, що реалізується в антенатальному та постнатальному онтогенезі потомства першого й другого поколінь, проте чіткої залежності «доза – ефект» не виявили. У цьому дослідженні доведено, що статеві клітини різних стадій сперматогенезу розташовуються за індукованими радіацією ефектами в такому порядку: сперматиди, спермато-

зоїди, сперматоцити та сперматогонії; мінімальною ушкоджувальною дозою одноразового загального гама-опромінення була доза 0,5 Гр [4].

Р. R. McCartney вказує на роль радіохвиль у розвитку чоловічої інфертильності [35]. За даними Barazani Y., відносна кількість рухомих сперматозоїдів може знижуватись при надмірно довгому користуванні телекомунікаційними приладами [30].

Патогенетично в чоловіків, на яких діє несприятливий фізичний чинник, відзначається зниження відносної кількості нормальних сперматозоїдів, що зазначено також у роботах вітчизняних авторів [1].

Особливе значення в аспекті збереження популяції та її генофонду має питання щодо значення опромінення органів репродуктивної системи у відносно невеликих дозах, коли не відбувається стерилізація, що унеможлиблює продовження роду. В цьому випадку радіаційно зумовлені порушення можуть переходити в наступні покоління. З іншого боку, в динаміці процесу сперматогенезу, що триває в чоловічих особин увесь період статевої зрілості, може відбуватися репарація частини індукованих радіацією мутацій або в результаті загибелі окремих клітин у процесі мейозу відбувається елімінація ушкоджень [31].

Значення емоційних факторів. У мегаполісах у чоловіків творчих професій доведено факт зниження тестостерону у крові під впливом емоційного стресу [40]. Механізм впливу емоційного стресу на репродуктивну функцію доволі складний: з одного боку, запускаються загальні механізми розвитку окислювального стресу, з іншого, – підключаються центральні регуляторні механізми на рівні гіпоталамо-гіпофізарного комплексу, які індукують ендокринні порушення в системі «гіпофіз – сім'яники» [37]. Підвищений рівень пролактину викликає пригнічення тестикулярного андрогенопоезу, що негативно позначається на сперматогенній функції. В результаті пригнічення сперматогенезу в умовах хронічного емоційного стресу має інтегральний характер.

У чоловіків творчих професій рухливість сперматозоїдів помірно знижується внаслідок певного зниження відносної кількості активно рухливих форм, а висока частка непрогресивно рухомих форм представлена в основному патологічними клітинами.

Копулятивні розлади під впливом стресу визначено в низці досліджень і, як можна припустити за даними гормонального скринінгу, проведеного L. Juárez-Rojas et al., можуть бути викликані антагоністичними взаємодіями між тестостероном і кортикостероїдами [24].

Особливості патогенезу чоловічої інфертильності в умовах урбанізації. Патогенетично спільним механізмом, що може виявлятися в інфертильних чоловіків під впливом факторів зовнішнього середовища в умовах урбанізації, є окислювальний стрес. Відомо, що несприятливі чинники зовнішнього середовища викликають розвиток окислювального стресу в усіх тканинах організму, зокрема і в тестикулярній тканині [16]. Активні форми кисню у фізіологічних концентраціях є регуляторами сперматогенезу, рухливості сперматозоїдів і взаємодії з яйцеклітиною, але їхнє надмірне накопичення в умовах оксидативного стресу

призводить до uszkodження генетичного матеріалу та мембран клітини [16].

Причиною розвитку оксидативного стресу є аномальне накопичення молекул, що містять кисень у невідновленій формі (reactive oxygen species), – активних форм кисню (АФК). У нормі поява АФК збалансована дією різних антиоксидантних систем, проте при захворюваннях у тканині яєчок наявний надлишок АФК, що вражають чутливі до окислювального стресу клітини сперматогенезу. Найактивніше синтез АФК відбувається в лейкоцитах і незрілих гаметах, що пояснює підтверджене низкою досліджень значення окислювального стресу в розвитку безпліддя при запальних захворюваннях чоловічої статеві системи, варикоцеле і гормональних порушеннях. Антиоксидантна система сім'яних каналців включає ферменти (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза), дрібні молекули (токоферолі, каротини, аскорбінова кислота) та білки-хелатори (трансферин, лактоферин, церулоплазмін) [15].

В умовах розвитку дисбалансу, посилення окислювального стресу АФК виходять з-під контролю антиоксидантної системи, ушкоджують різні структури клітин сперматогенезу, включаючи дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК), мембрани та різні внутрішньоклітинні білки. Результатом цього процесу в яєчках є ушкодження сперматозоїдів, що призводить до їхньої загибелі, порушень структури і/або функціональних властивостей (рухливості й здатності до запліднення) [34].

Результатом стресу та дії несприятливих хімічних факторів зовнішнього середовища є викид у міжклітинне середовище ендогенних флогенів (ініціаторів запалення). Надалі відбувається стимуляція фагоцитозу, активація НАДФН-оксидази нейтрофілів і, зрештою, утворення активних форм кисню – вільних радикалів, перекису водню [48]. Завдяки наявності балансу між утворенням АФК і дією антиоксидантів у сперматозоїдах залишається мінімальна кількість вільних радикалів, що необхідні для регуляції капацитації, акросомальної реакції та злиття з ооцитом, регуляції біохімічних окислювально-відновних реакцій синтезу енергії. Порушення рівноваги між продукцією вільних радикалів і послабленням антиоксидантного захисту в різних відділах чоловічого репродуктивного тракту незалежно від етіологічного чинника є основним показником окислювального стресу, який має позитивну кореляцію зі ступенем чоловічої інфертильності [23].

Оскільки основним субстратом для вільнорадикального окислення є фосфоліпіди, інтенсивність процесів ліпопероксидації безпосередньо залежатиме від їхнього складу та структурної організації, порушення котрих може призводити до зниження рухливості та якості сперматозоїдів і, як наслідок, до інфертильності [12].

Визначено тенденцію до збільшення під впливом стресу ранніх ембріональних втрат – доїмплантаційної загибелі ембріонів. Ці ж автори встановили: доїмплантаційні втрати ембріонів можуть бути зумовлені як порушенням здатності сперматозоїдів запліднювати яйцеклітину, так і наявністю ушкоджень сперматозої-

дів, що не перешкоджають нормальному заплідненню, але впливають на розвиток ембріона на ранніх стадіях (поява домінантних летальних мутацій – велика структурна хромосомна аберація). Зростання доїмплантаційної загибелі ембріонів разом зі збільшенням аберантного поділу та кількості сперматозоїдів із фрагментованою ДНК свідчить про наявність патології процесів сперматогенезу та порушення репродуктивної функції самців лабораторних щурів в умовах експерименту. Дослідники вважають, що тривалий стрес має несприятливий вплив на репродуктивну функцію самців, викликаючи зміну гормонального балансу у крові тварин, зростання кількості аберантного поділу статевих клітин сперматогенного епітелію, вірогідно збільшуючи частку сперматозоїдів на стадії некрозу та сперматозоїдів із фрагментацією ДНК, призводить до атрофії сім'яних каналців, а також до копулятивних розладів [17].

Хронічна дія негативних емоційних факторів супроводжується зниженням активності імунної системи внаслідок імуносупресивної дії стероїдів, може спровокувати розлад бар'єрної функції імунної системи та призвести до соматичного захворювання. Стрес може викликати гормональні й вегетативні прояви, реакції страху або емоційне напруження, що підтверджує наявність взаємовпливу психологічних і фізіологічних процесів [13].

Висновки

1. За даними фахової літератури підтверджено, що зовнішні умови мають вагомий вплив на розвиток захворювань репродуктивного апарату чоловіків, хоча їх причина та структура досі викладаються нечітко, є суперечливими, незважаючи на переконливий перелік чинників, що порушують сперматогенез.

2. Актуальність вивчення специфічності дії різних несприятливих чинників на сперматогенез підтверджена тим, що досі немає чітких розмежувань між ступенем пригнічення сперматогенезу під впливом того чи іншого фактора зовнішнього середовища.

3. Для виявлення взаємозв'язку між дією фізичних, хімічних, емоційних факторів і розвитком вторинного безпліддя та субфертильності в чоловіків потрібне вивчення закономірностей на підставі клініко-лабораторних, статистичних й епідеміологічних досліджень.

4. Немає єдиної думки щодо пригнічення чоловічої репродуктивної функції, котра зможе пояснити патогенетичні зміни в різних складових репродуктивного апарату залежно від спрямованості та сили дії несприятливого чинника.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Відомості про авторів:

Ломейко О. О., асистент каф. акушерства, гінекології та репродуктивної медицини ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Авраменко Н. В., д-р наук, профессор, зав. каф. акушерства, гинекологии та репродуктивной медицины ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Ломейко Е. А., ассистент каф. акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Колесник Ю. М., д-р мед. наук, профессор каф. патологической физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Авраменко Н. В., д-р наук, профессор, зав. каф. акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Information about authors:

Lomeiko O. O., Assistant, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.
Avramenko N. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 04.10.2017

Після доопрацювання / Revised: 10.01.2018

Прийнято до друку / Accepted: 29.01.2018

Список литературы

- Авраменко Н.В. Сперматогенез після екстремальних гіпертермічних, гіпотермічних і травматичних впливів і можливість його медикаментозної корекції в експерименті / Н.В. Авраменко, О.А. Нікіфоров, О.О. Ломейко // Запорожский медицинский журнал. – 2013. – №6(81). – С. 54–57.
- Баранов В.С. Экологические и генетические причины нарушения репродуктивного здоровья и их профилактика / В.С. Баранов, Э.К. Айламазан // Журнал акушерства и женских болезней. – 2007. – №1. – С. 3–10.
- Витамины и каротиноиды в динамике процесса онкогенеза предстательной железы / П.В. Глыбочко, Е.Г. Зезеров, Ю.Г. Аляев, и др. // Сеченовский вестник. – 2011. – №3–4(5–6). – С. 4–13.
- Влияние ионизирующей радиации в нестерилизующих дозах на эмбриогенез и постнатальное развитие потомства двух поколений самцов крыс, половые клетки которых облучены на премеиотических стадиях сперматогенеза / А.А. Дергилев, О.Ф. Чибисова, Г.Ф. Палыга и др. // Радиация и риск. – 2012. – Т. 21. – №2. – С. 39–45.
- Мамина В.П. Оценка состояния сперматогенного эпителия и выход доминантных летальных мутаций у крыс, подвергнутых действию шестивалентного хрома в малых дозах / В.П. Мамина, Л.Д. Шейко, О.А. Жигальский // Успехи современного естествознания. – 2013. – №11. – С. 50–53.
- Николаев А.А. Участие свободных радикалов в функции сперматозоидов / А.А. Николаев, П.В. Логинов, Р.В. Ветошкин // Астраханский медицинский журнал. – 2014. – Т. 9. – №1. – С. 23–29.
- Причины и факторы риска мужской инфертильности / Л.И. Колесникова, С.И. Колесников, Н.А. Курашова, Т.А. Байрова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70 (5). – С. 579–584.
- Радченко О.Р. Факторы риска мужского бесплодия и методы профилактики / О.Р. Радченко // Практическая медицина. – 2012. – Т. 2(57). – С. 218–220.
- Рівень безпліддя в областях за даними МОЗ України / О.І. Тимченко, Д.О. Микитенко, О.П. Коба, О.В. Линчак // Медичні перспективи. – 2014. – Т. 19. – №3. – С. 105–111.
- Тиктинский О.Л. Андрология / О.Л. Тиктинский, С.Н. Калинина, В.В. Михайличенко. – М.: Медицинское информационное агентство, 2010. – 576 с.
- Хлякина О.В. Влияние неблагоприятных эколого-физиологических факторов на репродуктивное здоровье мужчин в аспекте современного подхода к проблеме и профилактике мужского бесплодия / О.В. Хлякина // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2011. – Т. 16. – Вып. 1. – С. 356–359.
- Хышиктуев Б.С. Особенности изменений фосфолипидного состава семенной жидкости у мужчин с нарушением фертильности / Б.С. Хышиктуев, А.А. Кошмелев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – №7. – Р. 27–30.
- Чистякова Н.В. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось и генетические варианты, влияющие на ее активность / Н.В. Чистякова, К.В. Савостьянов // Генетика. – 2011. – Т. 47. – №8. – С. 1013–1025.
- Экспериментальное изучение функционального состояния репродуктивной системы самцов белых крыс при воздействии паранитрофенола / Д.С. Белолюбская, А.Ю. Слепцов, Д.А. Соколутов, И.В. Николаева // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки. – 2015. – №1(01). – С. 48–51.
- Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? / A. Agarwal, S. Roychoudhury, K.B. Bjugstad, Ch.-L. Cho // Ther. Adv. Urol. – 2016. – Vol. 8(5). – P. 302–318.
- Agarwal A. Oxidative stress management in patients with male or female factor infertility / A. Agarwal, M. Cocuzza, H. Abdelrazik // Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment / I. Popov, G. Lewin (Eds.). – Kerala (India), 2008. – P. 195–218.
- Al-Damegh M.A. Stress-Induced Changes in Testosterone Secretion in Male Rats: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidants / M.A. Al-Damegh // Open Jour. An. Sc. – 2014. – Vol. 4. – №2. – P. 70–78.
- An updated systematic review on the possible effect of nonylphenol on male fertility / Z. Noorimotlagh, N. Haghighi, M. Ahmadi Moghadam, F. Rahim // Environ Sci Pollut Res Int. – 2017. – Vol. 24(4). – P. 3298–3314.
- Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts / M. Punab, O. Poolamets, P. Paju et al // Hum Reprod. – 2017. – Vol. 32. – №1. – P. 18–31.
- Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review / J. Carré, N. Gatimel, J. Moreau et al. // Environ. Health. – 2017. – Vol. 16(1). – P. 82.
- Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system / I. Sidorkiewicz, K. Zareba, S. Wolczyński, J. Czerniecki // Toxicol. Ind. Health. – 2017. – Vol. 33(7). – P. 601–609.
- Esteves S.C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination / S.C. Esteves // Int. Braz. J. Urol. – 2014. – Vol. 40(4). – P. 443–453.
- Fujii J. Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process / J. Fujii, S. Tsunoda // Asian J. Androl. – 2011. – Vol. 13(3). – P. 420–423.
- Gradual decrease in spermatogenesis caused by chronic stress / L. Juárez-Rojas, R.M. Viguera-Villaseñor, F. Casillas, S. Retana-Márquez // Acta Histochem. – 2017. – Vol. 119(3). – P. 284–291.
- Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients / E. Den Hond, H. Tourayne, P. De Sutter, et al. // Environ. Int. – 2015. – Vol. 84. – P. 154–160.
- Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning / J. Gandhi, R.J. Hernandez, A. Chen, et al. // Zygote. – 2017. – Vol. 25(2). – P. 103–110.
- Infertility in the light of new scientific reports – focus on male factor / P. Szkodziak, S. Wozniak, P. Czuczwar, et al. // Ann. Agric. Environ. Med. – 2016. – Vol. 23(2). – P. 227–230.
- Inhorn M.C. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century / M.C. Inhorn, P. Patrizio // Hum. Reprod. Update. – 2015. – Vol. 21(4). – P. 411–26.
- Jenardhanan P. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis / P. Jenardhanan, M. Panneerselvam, P.P. Mathur // Semin. Cell. Dev. Biol. – 2016. – Vol. 59. – P. 126–140.
- Lifestyle, environment, and male reproductive health / Y. Barazani, B.F. Katz, H.M. Nagler, D.S. Stember // Urol. Clin. North Am. – 2014. – Vol. 41(1). – P. 55–66.
- Low-dose radiation-induced risk in spermatogenesis / H. Fukunaga, K.T. Butterworth, A. Yokoya, et al. // Int. J. Radiat. Biol. – 2017. – Vol. 93(12). – P. 1291–1298.
- Low-level environmental arsenic exposure correlates with unexplained male infertility risk / X. Wang, J. Zhang, W. Xu et al // Sci. Total. Environ. – 2016. – Vol. 571. – P. 307–313.
- Madeen E.P. Environmental PAH exposure and male idiopathic infertility: a review on early life exposures and adult diagnosis / E.P. Madeen, D.E. Williams // Rev. Environ. Health. – 2017. – Vol. 32(1–2). – P. 73–81.
- Majzoub A. Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenozoospermia / A. Majzoub, A. Agarwal // Indian. J. Urol. – 2017. – Vol. 33(3). – P. 207–214.
- McCartney P.R. Is there a relationship between cell phone electromagnetic waves and infertility? / P.R. McCartney // Am. J. Matern. Child. Nurs. – 2010. – Vol. 35(3). – P. 173.

- [36] Mínguez-Alarcón L. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review / L. Mínguez-Alarcón, R. Hauser, A.J. Gaskins // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 106(4). – P. 864–870.
- [37] Nargund V.H. Effects of psychological stress on male fertility / V.H. Nargund // *Nat. Rev. Urol.* – 2015. – Vol. 12(7). – P. 373–382.
- [38] National, regional, and global trends in infertility: a systematic analysis of 277 health surveys / M.N. Mascarenhas, S.R. Flaxman, T. Boerma, et al. // *PLoS Med.* – 2012. – Vol. 9(12). – e1001356.
- [39] Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans increased abnormal sperm morphology without alterations in aneuploidy: The Yucheng study / P.C. Hsu, M.C. Li, Y.C. Lee, et al. // *Chemosphere.* – 2016. – Vol. 165. – P. 294–297.
- [40] Psychological and educational interventions for subfertile men and women / J. Verkuiljen, C. Verhaak, W.L. Nelen, et al. // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2016. – Vol. 3. – P. CD011034.
- [41] Repeated measures of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in relation to altered reproductive hormones: A cross-sectional study in China / P. Yang, H. Sun, Y.J. Gong, et al. // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* – 2017. – Vol. 220(8). – P. 1340–1346.
- [42] Semen Quality as a Predictor of Subsequent Morbidity: A Danish Cohort Study of 4,712 Men With Long-Term Follow-up / T. Latif, T.K. Jensen, J. Mehlsen, et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2017. – Vol. 186(8). – P. 910–917.
- [43] Systematic review of the association between oil and natural gas extraction processes and human reproduction / V.D. Balise, C.X. Meng, J.N. Cornelius-Green, et al. // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 106(4). – P. 795–819.
- [44] Air Pollution and Quality of Sperm: A Meta-Analysis / T. Fathi Najafi, R. Latifnejad Roudsari, F. Namvar, et al. // *Iran Red. Crescent. Med. J.* – 2015. – Vol. 17(4). – e26930.
- [45] Sengupta P. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015 / P. Sengupta, S. Dutta, E. Krajewska-Kulak // *Am. J. Mens. Health.* – 2017. – Vol. 11(4). – P. 1279–1304.
- [46] The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review / N. Asadi, M. Bahmani, A. Kheradmand, et al. // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2017. – Vol. 11(5). – P. IE01–IE05.
- [47] The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm / R.S. Tavares, S. Escada-Rebello, M. Correia, et al. // *Reproduction.* – 2016. – Vol. 151(1). – R1–R13.
- [48] Tremellen K. Oxidative stress and of male infertility / K. Tremellen // *Hum. Reproduct.* – 2008. – Vol. 14. – №3. – P. 243–258.
- [49] Vecoli C. Environmental pollutants: genetic damage and epigenetic changes in male germ cells / C. Vecoli, L. Montano, M.G. Andreassi // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2016. – Vol. 23(23). – P. 23339–23348.
- [50] Ying L. The effects of psychosocial interventions on the mental health, pregnancy rates, and marital function of infertile couples undergoing in vitro fertilization: a systematic review / L. Ying, L.H. Wu, A.Y. Loke // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 33(6). – P. 689–701.
- References**
- [1] Avramenko, N. V., Nikiforov, O. A., & Lomeyko, O. O. (2013) Spermatohenez pislia ekstremalnykh hipertermichnykh, hipotermichnykh i travmatichnykh vplyviv i mozhlyvist yoho medykamentoznoi korektsii v eksperymnti [Spermatogenesis after extreme hyperthermal, hypothermal and traumatic influences and the possibility of its drug correction in the experiment]. *Zaporozhye medical journal*, 6(81), 54–57. [in Ukrainian].
- [2] Baranov, V. S., & Ajlamazyan, E'. K. (2007) E'kologicheskie i geneticheskie prichiny narusheniya reproduktyvnoho zdorov'ya i ikh profilaktika [Ecological and genetic causes of reproductive health disorders and their prevention]. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej*, 1, 3–10. [in Russian].
- [3] Glybochko, P. V., Zezerov, E. G., Alyaev, Yu. G., Spirichev, V. B., Butnaru, D. V., Severin, S. E., et al. (2011) Vitaminy i karotinoidy v dinamike processa onkogeneza predstatel'noj zhelezy [Vitamins and carotenoids in the dynamics of prostate gland oncogenesis]. *Sechenovskij vestnik*, 3–4(5–6), 4–13. [in Russian].
- [4] Dergilev, A. A., Chibisova, O. F., Palyga, G. F., Ivanov, V. L., & Zhavoronkov, L. P. (2012) Vliyanie ioniziruyushej radiacii v nesterilizuyuschkh dozakh na e'mbriogenezu i postnatal'noe razvitie potomstva dvukh pokolenij samcov krysa, polovye kletki kotorykh obлучeny na premeioticheskikh stadiyakh spermatogeneza [Effect of exposure of rat male germ cells in the pre-meiotic phase of spermatogenesis to radiation at doses below a castration level on ontogenesis of two generations of posterity]. *Radiaciya i risk*, 21(2), 39–45. [in Russian].
- [5] Mamina, V. P., Sheiko, L. D., & Zhigalsky, O. A. (2013) Ocenka sostoyaniya spermatogenogo e'piteliya i vykhod dominantnykh letal'nykh mutacij u krysa, podvergnutykh dejstviyu shhestivalentnogo khroma v malykh dozakh [Assessment of spermatogenous epithelium and exit of dominant lethal mutations in the rats after activity of hexavalent chromium in small doses]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*, 11, 50–53. [in Russian].
- [6] Nikolaev, A. A., Loginov, P. V., & Vetoshkin, R. V. (2014) Uchastie svobodnykh radikalov v funkcii spermatozoidov [Free radical participation in spermatozoid function]. *Astrakhanskij medicinskij zhurnal*, 9(1), 23–29. [in Russian].
- [7] Kolesnikova, L. I., Kolesnikov, S. I., Kurashova, N. A., & Bairova, T. A. (2015) Prichiny i faktory riska muzhskogo infertil'nosti [Causes and Factors of Male Infertility]. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskikh nauk*, 70(5), 579–584. [in Russian].
- [8] Radchenko, O. R. (2012) Faktory riska muzhskogo besplodiya i metody profilaktiki [Risk factors for male infertility and methods of prevention]. *Prakticheskaya medicina*, 2(57), 218–220. [in Russian].
- [9] Tymchenko, O. I., Mykytenko, D. O., Koba, O. P., & Lynchak, O. V. (2014) Riven bezpliddia v oblastiakh za danymy MOZ Ukrainy [Level of infertility in regions according to Ministry of Public Health data]. *Medychni perspektyvy*, 19(3), 105–111. [in Ukrainian].
- [10] Tiktinskij, O. L., Kalinina, S. N., & Mikhajlichenko, V. V. (2010) *Andrologiya [Andrology]*. Moscow : Medicinskoe informacionnoe agentstvo. [in Russian].
- [11] Hlyakina, O. V. (2011) Vliyanie neblagopriyatnykh e'kologo-fiziologicheskikh faktorov na reproduktyvnoe zdorov'ye muzhchin v aspekte sovremennogo podkhoda k probleme i profilaktike muzhskogo besplodiya [Modern approach to influence of adverse ecological and physiological factors on men's reproductive health]. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya: Estestvennye i tekhnicheskie nauki*, 16(1), 356–359. [in Russian].
- [12] Hyshkietuev, B. S., & Koshmelev, A. A. (2010) Osobennosti izmenenij fosfolipidnogo sostava semennoj zhidkosti u muzhchin s narusheniem fertill'nosti [Peculiarities of changes in the phospholipid composition of semen in men with impaired fertility]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 7, 27–30. [in Russian].
- [13] Chistyakova, N. V., & Savost'yanov, K. V. (2011) Gipotalamo-gipofizarno-nadpocheknikovaya os' i geneticheskie varianty, vliyayuschie na ee aktivnost' [The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and genetic variants affecting its reactivity]. *Genetika*, 47(8), 1013–1025 [in Russian].
- [14] Belolyubskaya, D. S., Sleptsov, A. Yu., Sokorutov, D. A., & Nikolaeva, I. V. (2015) E'ksperimental'noe izuchenie funktsional'nogo sostoyaniya reproduktyvnoj sistemy samcov belykh krysa pri vozdeystvii paranitrofenola [Experimental study of the functional state of reproductive system male white rats on exposure p-nitrophenol]. *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta im. M.K. Ammosova. Seriya: Medicinskie nauki*, 1(01), 48–51. [in Russian].
- [15] Agarwal, A., Roychoudhury, S., Bjugstad, K. B., & Cho, Ch. -L. (2016) Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? *Theor. Adv. Urol.*, 8(5), 302–318. doi: 10.1177/1756287216652779.
- [16] Agarwal, A., Cocuzza, M., & Abdelrazik, H. (2008) Oxidative stress management in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*. I. Popov, G. Lewin (Eds.), (P. 195–218). Kerala (India).
- [17] Al-Damegh, M. A. (2014) Stress-Induced Changes in Testosterone Secretion in Male Rats: Role of Oxidative Stress and Modulation by Antioxidants. *Open Jour. An. Sc.*, 4(2), 70–78. doi: 10.4236/ojas.2014.42010.
- [18] Noorimotlagh, Z., Haghghi, N., Ahmadimoghadam, M., & Rahim, F. (2017) An updated systematic review on the possible effect of nonylphenol on male fertility. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 24(4), 3298–3314. doi: 10.1007/s11356-016-7960-y.
- [19] Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., et al. (2017) Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod.*, 32(1), 18–31. doi: 10.1093/humrep/dew284.
- [20] Carré, J., Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Léandri, R. (2017) Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review. *Environ. Health.*, 16(1), 82. doi: 10.1186/s12940-017-0291-8.
- [21] Sidorkiewicz, I., Zaręba, K., Wolczyński, S., & Czerniecki, J. (2017) Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system. *Toxicol. Ind. Health.*, 33(7), 601–609. doi: 10.1177/0748233717695160.
- [22] Esteves, S. C. (2014) Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int. Braz. J. Urol.*, 40(4), 443–453. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.04.02.
- [23] Fujii, J., & Tsunoda, S. (2011) Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process. *Asian J. Androl.*, 13(3), 420–423. doi: 10.1038/aja.2011.10.
- [24] Juárez-Rojas, L., Viguera-Villaseñor, R. M., Casillas, F., & Retana-Márquez, S. (2017) Gradual decrease in spermatogenesis caused by chronic stress. *Acta Histochem.*, 119(3), 284–291. doi: 10.1016/j.acthis.2017.02.004.
- [25] Den Hond, E., Tournaye, H., De Sutter, P., Ombelet, W., Baeyens, W., Covaci, A., et al. (2015) Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ. Int.*, 84, 154–160. doi: 10.1016/j.envint.2015.07.017.

- [26] Gandhi, J., Hernandez, R. J., Chen, A., Smith, N. L., Sheynkin, Y. R., Joshi, G., & Khan, S. A. (2017) Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning. *Zygote*, 25(2), 103–110. doi: 10.1017/S0967199417000028.
- [27] Szkodziak, P., Wozniak, S., Czuczwar, P., Wozniakowska, E., Milart, P., Mroczkowski, A., & Paszkowski, T. (2016) Infertility in the light of new scientific reports – focus on male factor. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 23(2), 227–230. doi: 10.5604/12321966.1203881.
- [28] Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015) Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum. Reprod. Update*, 21(4), 411–26. doi: 10.1093/humupd/dmv016.
- [29] Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., & Mathur, P. P. (2016) Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 59, 126–140. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.03.024.
- [30] Barazani, Y., Katz, B. F., Nagler, H. M., & Stember, D. S. (2014) Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol. Clin. North Am.*, 41(1), 55–66. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.017.
- [31] Fukunaga, H., Butterworth, K. T., Yokoya, A., Ogawa, T., & Prise, K. M. (2017) Low-dose radiation-induced risk in spermatogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 93(12), 1291–1298. doi: 10.1080/09553002.2017.1355579.
- [32] Wang, X., Zhang, J., Xu, W., Huang, Q., Liu, L., Tian, M., et al. (2016) Low-level environmental arsenic exposure correlates with unexplained male infertility risk. *Sci. Total Environ.*, 571, 307–313. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.169.
- [33] Madeen, E. P., & Williams, D. E. (2017) Environmental PAH exposure and male idiopathic infertility: a review on early life exposures and adult diagnosis. *Rev. Environ. Health.*, 32(1–2), 73–81. doi: 10.1515/reveh-2016-0045.
- [34] Majzoub, A., & Agarwal, A. (2017) Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Indian. J. Urol.*, 33(3), 207–214. doi: 10.4103/ijju.IJU_15_17.
- [35] McCartney, P. R. (2010) Is there a relationship between cell phone electromagnetic waves and infertility? *Am. J. Matern. Child. Nurs.*, 35(3), 173. doi: 10.1097/NMC.0b013e3181d8036b.
- [36] Mínguez-Alarcón, L., Hauser, R., & Gaskins, A. J. (2016) Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertil. Steril.*, 106(4), 864–870. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1118.
- [37] Nargund, V. H. (2015) Effects of psychological stress on male fertility. *Nat. Rev. Urol.*, 12(7), 373–382. doi: 10.1038/nrurol.2015.112.
- [38] Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012) National, regional, and global trends in infertility: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.*, 9(12), e1001356. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356.
- [39] Hsu, P. C., Li, M. C., Lee, Y. C., Kuo, P. L., & Guo, Y. L. (2016) Polychlorinated biphenyls and dibenzofurans increased abnormal sperm morphology without alterations in aneuploidy: The Yucheng study. *Chemosphere*, 165, 294–297. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.035.
- [40] Verkuijlen, J., Verhaak, C., Nelen, W. L., Wilkinson, J., & Farquhar, C. (2016) Psychological and educational interventions for subfertile men and women. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, CD011034. doi: 10.1002/14651858.CD011034.pub2.
- [41] Yang, P., Sun, H., Gong, Y. J., Wang, Y. X., Liu, C., Chen, Y. J., et al. (2017) Repeated measures of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in relation to altered reproductive hormones: A cross-sectional study in China. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 220(8), 1340–1346. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.09.004.
- [42] Latif, T., Kold Jensen, T., Mehlsen, J., Holmboe, S. A., Brinth, L., Pors, K., et al. (2017) Semen Quality as a Predictor of Subsequent Morbidity: A Danish Cohort Study of 4,712 Men With Long-Term Follow-up. *Am. J. Epidemiol.*, 186(8), 910–917. doi: 10.1093/aje/kwx067.
- [43] Balise, V. D., Meng, C. X., Cornelius-Green, J. N., Kassotis, C. D., Kennedy, R., & Nagel, S. C. (2016) Systematic review of the association between oil and natural gas extraction processes and human reproduction. *Fertil. Steril.*, 106(4), 795–819. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1099.
- [44] Fathi Najafi, T., Latifnejad Roudsari, R., Namvar, F., Ghavami Ghanbarabadi, V., Hadizadeh Talasaz, Z., & Esmaeli, M. (2015) Air Pollution and Quality of Sperm: A Meta-Analysis. *Iran Red. Crescent. Med. J.*, 17(4), e26930. doi: 10.5812/ircmj.17(4)2015.26930.
- [45] Sengupta, P., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2017) The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. *Am. J. Mens. Health.*, 11(4), 1279–1304. doi: 10.1177/1557988316643383.
- [46] Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2017) The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *J. Clin. Diagn. Res.*, 11(5), IE01–IE05. doi: 10.7860/JCDR/2017/23927.9886.
- [47] Tavares, R. S., Escada-Rebello, S., Correia, M., Mota, P. C., & Ramalho-Santos, J. (2016) The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. *Reproduction*, 151(1), R1–R13. doi: 10.1530/REP-15-0355.
- [48] Tremellen, K. (2008) Oxidative stress and of male infertility. *Hum. Reproduct.*, 14(3), 243–258.
- [49] Vecoli, C., Montano, L., & Andreassi, M. G. (2016) Environmental pollutants: genetic damage and epigenetic changes in male germ cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23(23), 23339–23348. doi: 10.1007/s11356-016-7728-4.
- [50] Ying, L., Wu, L. H., & Loke, A. Y. (2016) The effects of psychosocial interventions on the mental health, pregnancy rates, and marital function of infertile couples undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 33(6), 689–701. doi: 10.1007/s10815-016-0690-8.

Менеджмент споживання кухонної солі при артеріальній гіпертензії (огляд літератури)

I. М. Волошина

Запорізький державний медичний університет, Україна

Ключові слова:

артеріальна гіпертензія, кухонна сіль, артеріальний тиск, калій, натрій.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 122–126

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.127715

E-mail:

phd.voloshyna@gmail.com

Ключевые слова:

артериальная гипертензия, кухонная соль, артериальное давление, калий, натрий.

Патологія. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 122–126

Key words:

arterial hypertension, table salt, blood pressure, potassium, sodium.

Pathologia

2018; 15 (1), 122–126

Мета роботи – огляд поточної доказової бази щодо ефективності дієтичних інтервенцій зі зменшення споживання кухонної солі та доцільності їх призначень у лікуванні артеріальної гіпертензії.

Матеріали та методи. Виконали аналіз даних наукової літератури за останні 10 років, зокрема цитованих за системами Google Scholar, Web of Science, Scopus, враховуючи результати щонайменше 20 рандомізованих міжнародних клінічних досліджень із сумарною кількістю учасників понад 300 тисяч щодо вживання кухонної солі, ризику артеріальної гіпертензії та кардіоваскулярних ускладнень.

Результати. Середній рівень споживання кухонної солі в Україні та світі є понаднормовим, що асоціюється з високими показниками серцево-судинної смертності. Окреслені стратегічні напрями дієтичного менеджменту щодо редукції споживання кухонної солі в Україні.

Висновки. Прихильність хворих на артеріальну гіпертензію до раціону з низьким вмістом натрію є високоефективним та економічно вигідним інструментом нефармакологічного антигіпертензивного лікування, але потребує від лікарів і суміжних спеціалістів поглибленого роз'яснення щодо дотримання пацієнтами цієї методики.

Менеджмент употребления кухонной соли при артериальной гипертензии (обзор литературы)

И. Н. Волошина

Цель работы – обзор доказательной базы касательно эффективности диетических интервенций по уменьшению потребления поваренной соли и целесообразности их назначений в лечении артериальной гипертензии.

Материалы и методы. Проведен анализ данных научной литературы за последние 10 лет, цитируемых по системам Google Scholar, Web of Science, Scopus, с учетом результатов не менее 20 рандомизированных международных клинических исследований с суммарным количеством участников свыше 300 тысяч относительно употребления поваренной соли, риска возникновения артериальной гипертензии и кардиоваскулярных осложнений.

Результаты. Средний уровень потребления поваренной соли в Украине и мире значительно превышает допустимые нормативы, что ассоциируется с высокими показателями сердечно-сосудистой смертности. Определены стратегические направления диетического менеджмента по редукции потребления поваренной соли в Украине.

Выводы. Приверженность больных артериальной гипертензией к рациону с низким содержанием натрия является высокоэффективным и экономически выгодным инструментом нефармакологического антигипертензивного лечения, однако требует от врачей и смежных специалистов углубленного разъяснения данной методики пациентам.

Management of table salt consumption in hypertensive patients (review)

I. M. Voloshyna

Purpose. The review is aimed to light the current evidence data about the effectiveness of dietary interventions on reducing table salt consumption and discussing the appropriateness of dietary recommendations prescribed by physicians to hypertensive patients.

Materials and methods. The analysis of the specialized scientific literature over the past 10 years, cited by the systems of Google Scholar, Web of Science, Scopus considering the results of at least 20 randomized international clinical trials with more than 300.000 participants regarding table salt consumption, hypertension risk and cardiovascular outcomes has been done.

Results. The average consumption of kitchen salt in Ukraine as well as all worldwide is excessive and associated with high cardiovascular mortality rates. The strategic approaches of dietary intervention management in reduction of table salt consumption Ukraine are outlined.

Conclusions. The compliance of hypertensive patients to low-sodium diet is considered as highly effective and cost-effective non-pharmacological antihypertensive treatment but requires doctors and related professionals to provide the detailed explanation of this diet to patients.

Артеріальна гіпертензія (АГ) – головна причина кардіоваскулярної смертності у світі й уражає майже 25 % дорослого населення; поширеність АГ, за прогнозами, у 2025 році зросте до 1,5 млрд осіб; 7,6 млн

передчасних смертей (майже 13,5 % від загальної кількості), 54 % інсультів і 47 % подій, що викликані ішемічною хворобою серця, виникають унаслідок високого артеріального тиску (АТ) [3,18]. В Україні

майже 12 млн осіб, які хворі на АГ, що становить у межах 30 % дорослого населення. Крім важких ускладнень для серцево-судинної системи, нирок тощо, АГ спричиняє раннє старіння організму, погіршення когнітивної функції, супроводжує ожиріння, цукровий діабет, атеросклероз, що часто розвивається вже у віці 40–50 років [17,25]. За період 1999–2013 рр. в Україні зросли показники виявлення хворих на АГ, цереброваскулярну патологію (зокрема й асоційовану з АГ) [19]. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ), посилюючись на ґрунтовну доказову базу, вказує на наявність взаємозв'язку високого рівня споживання кухонної солі з АГ, тому закликає держави-члени вжити заходи щодо зменшення споживання кухонної солі для зменшення кількості смертей від серцево-судинних захворювань та інсульту [13,28].

Кухонна сіль (натрію хлорид) є загальноновизнаним стратегічним нутрієнтом, споживання якого в більшості розвинутих країн невинно зростає щороку [5,7,8]. За результатами клінічних, експериментальних спостережень встановлений тісний взаємозв'язок між рівнем споживання кухонної солі та наявністю АГ, що дало можливість розглядати зловживання кухонною сіллю як один із головних модифікованих факторів ризику АГ [14,17]. Епідеміологічні дослідження показали, що збільшене споживання кухонної солі асоціюється з підвищеним ризиком серцево-судинних подій, а дієтичні інтервенції, спрямовані на зменшення споживання натрію та збільшення споживання калію, дають змогу суттєво зменшити рівень артеріального тиску (АТ) [1,2,9,12]. Провідні світові організації з питань охорони здоров'я наголошують, що редукція кількості споживаної кухонної солі є найефективнішим превентивним заходом щодо запобігання кардіоваскулярним подіям [3,28,29].

Показники споживання кухонної солі в Україні та світі

На відміну від економічно розвинених країн, в Україні питанням менеджменту споживання кухонної солі приділялось недостатньо уваги як на національному рівні, так і серед медичної спільноти [26]. Уникнення обговорення проблеми зловживання кухонною сіллю призвело до невтішної статистики: серед мешканців 66 країн Україна посіла абсолютне перше місце за показниками серцево-судинної смертності, що пов'язана з надмірним вживанням кухонної солі [22]. Цей факт з'ясували експерти Гарвардського університету, які репрезентують наукову групу NUTRICODE, що займається системним аналізом споживання натрію у світі та розраховує дозо-залежний вплив натрію на рівень АТ за даними клінічних випробувань. У цей

метааналіз увійшли дані з березня 2008 до грудня 2011 р., які були систематично зібрані з результатів попередніх національних чи субнаціональних опитувань щодо індивідуальних рівнів споживання натрію, що ґрунтуються на показниках екскреції з сечею і/або дієтичного раціону; загалом 205 опитувальників із 66 країн із представниками 187 націй, котрі репрезентують 74,1 % дорослого населення світу. Застосовуючи Баєсівську ієрархічну модель, визначили середній рівень споживання натрію зі статистичною поправкою на показники віку, статі та календарного року серед 187 націй [21,22].

У результаті виявилось, що в 2010 р. середній рівень споживання натрію у світі дорівнював 3,95 г на добу (10 г кухонної солі). Серед 187 націй перевищення рекомендованої ВООЗ межі споживання натрію (2 г на добу) зареєстровано у 181 (99,2 %) регіонах [21]. В Україні середній рівень споживання натрію становив 4,2 г на добу (10,7 г кухонної солі). Тотожні рівні вживаного натрію виявили в Словаччині, Словенії, Португалії та Російській Федерації. В абсолютному значенні це були не найвищі темпи споживання: в Узбекистані добове споживання кухонної солі становило 14,5 г; у Вірменії та Азербайджані – 12,7 г. У країнах західної Європи середній рівень споживання натрію становив 3,8 г на добу (9,6 г кухонної солі). Загалом по всіх країнах прослідковано чітку тенденцію до збільшення споживання натрію зі збільшенням віку, особливо серед осіб, старших за 70 років [21].

У 2014 році експерти Світової Ліги Гіпертензії запропонували номенклатуру для оцінювання рівня споживання кухонної солі, зважаючи на низку розбіжностей серед науковців щодо трактування нормального вмісту кухонної солі в раціоні (табл. 1) [3,23]. Згідно з класифікацією, середній рівень споживання кухонної солі в Україні є дуже високим, вдвічі вищим за рекомендовану безпечну кількість солі.

Наступним етапом дослідження NUTRICODE стало оцінювання взаємозв'язку споживання натрію з показниками АТ залежно від віку, наявності АГ і раси [22]. Надалі розраховували очікуваний ефект від зменшення споживання натрію на рівень систолічного АТ, величину змін серцево-судинного ризику. Знаючи абсолютні значення смертності в кожній країні, визначали кількість смертей, атрибутивних до вживання натрію вище за референтний рівень (понад 4 г на добу), стратифікованих за віком і статтю. В Україні абсолютний показник загальної серцево-судинної смертності, що пов'язана зі зловживанням кухонною сіллю, становив 473, інсультів – 126, ішемічної хвороби серця (ІХС) – 320 випадків на 1 млн населення. Українські значення

Таблиця 1. Номенклатура добових рівнів споживання кухонної солі (рекомендації Світової Ліги Гіпертензії)

Термінологія	Добовий вміст у харчовому раціоні		
	Сіль, г	Натрій, мг	Натрій, ммоль
Низький	Не визначено, але близько <0,25	Не визначено, але близько <100	Не визначено, але близько <4,3
Нормальний рівень для предків (історичні часи)	<2,5	<1000	<43
Рекомендований	<5,0	<2000	<87
Високий	≥5,0–10,0	≥2000–4000	≥87–174
Дуже високий	>10–15	>4000–6000	>174–261
Екстремально високий	>15	>6000	>261

виявились найвищими серед усіх країн світу, що увійшли в дослідження. Російська Федерація посіла друге місце за абсолютною кількістю серцево-судинної смертності, котра пов'язана з надмірним споживанням натрію. Відповідні показники дорівнювали 400 випадків на 1 млн населення загальної смертності, 145 випадків інсультів і 230 смертей від ІХС. Цікаво, що в Польщі показник загальної серцево-судинної смертності, що пов'язана зі зловживанням кухонною сіллю, становив 148 випадків на 1 млн населення. Загалом у країнах Західної Європи середній показник загальної кардіоваскулярної смертності, атрибутивної до дієтичного раціону з вмістом кухонної солі понад 4 г на добу, становив 137 випадків, інсультів – 35, ІХС – 69 подій на 1 млн населення. Це в 3–4 рази менше, ніж в Україні. Отже, доцільність редукції кількості кухонної солі в раціоні мешканців України нині є гостро актуальною [21,22,26].

Вплив зменшення споживання кухонної солі на артеріальний тиск і ризик асоційованих ускладнень

Численними клінічними й експериментальними дослідженнями показано, що зменшення споживання натрію у складі кухонної солі сприяє зниженню АТ як у хворих на АГ, так і в нормотензивних осіб [8,10,20,29]. Група японських учених встановила, що раціон із високим вмістом кухонної солі незалежно асоціюється зі ступенем гіпертензивного ураження органів-мішеней [14].

Результати міжнародного мультицентрового проекту NUTRICODE показали наявність лінійного, дозо-залежного взаємозв'язку між зменшенням споживання кухонної солі та рівнем АТ ($p < 0,001$ для лінійного і $p = 0,58$ для нелінійного). Коли для отриманих даних застосували інверс-варіантну зважену метарегресію, з'ясувалось: у середньому при зменшенні вживання натрію на 2,3 г на добу рівень систолічного АТ зменшувався на 3,82 мм рт. ст. [22].

У дослідженні DASH щодо ефективності дієтичних інтервенцій показано, що раціон з обмеженням кухонної солі впливає на темпи зниження АТ інтенсивніше, ніж DASH-дієта чи стандартний «американський» тип харчування (група контролю) [17]. Згідно з умовами протоколу, 412 учасників проекту рандомізовані у групи за типом раціону та кількістю натрію, що вживають за добу. Виявили: зменшення кількості натрію з великої до помірної асоціюється зі зниженням систолічного АТ на 2,1 мм рт. ст. ($p < 0,001$) при стандартному типі харчування, а при дотриманні DASH-дієти зниження систолічного АТ відбулось на рівні 1,3 мм рт. ст. ($p = 0,03$). Зниження рівня натрію з помірного до низького призводило до додаткового зниження САТ на 4,6 мм рт. ст. ($p < 0,001$) у контрольній групі та на 1,7 мм рт. ст. ($p < 0,01$) у групі DASH-дієти. З'ясувалось, що вплив натрію на рівень АТ спостерігали в усіх учасників дослідження незалежно від наявності АГ, раси, статі. У підгрупах із раціоном на основі DASH-дієти встановили вірогідно нижчі рівні АТ, але найнижчі значення спостерігали при вживанні малої кількості солі. Базуючись на цих даних, у 2010 році створені дієтичні рекомендації для мешканців США, в яких акцентовано важливість щоденного контролю за споживанням солі [1].

Вплив дієтичних інтервенцій зі зменшення споживання кухонної солі на ризик виникнення кардіоваскулярних подій детально вивчали в мультицентрових рандомізованих дослідженнях ТОНР I і ТОНР II з тривалим періодом follow-up 10–15 років. У дослідженні взяли участь 5159 пацієнтів віком 30–54 років із передгіпертензією, яким провели детальне роз'яснення, спеціальне навчання зі зменшення споживання кухонної солі та наступного контролю за вживаною кількістю солі. Первинною кінцевою точкою вважали серцево-судинні захворювання (інфаркт міокарда, інсульт, коронарна реваскуляризація чи смерть від серцево-судинних подій). Пацієнти були рандомізовані у групу зниженого споживання солі чи у групу контролю. З'ясувалось, що ризик кардіоваскулярних подій був на 25 % нижчий у групі дієтичних інтервенцій (відносний ризик 0,75; 95 % довірчий інтервал 0,57–0,99; $p = 0,04$) після здійснення поправки на вік, стать, расову належність тощо. Отже, зменшення споживання кухонної солі, крім зниження АТ per se, асоціювалось із тривалим зниженням ризику серцево-судинних ускладнень [8,9].

Результати метааналізу 13 клінічних досліджень за участі 177 025 осіб показали, що високе споживання натрію у складі кухонної солі асоціюється зі збільшенням ризику інсультів на 23 %, інших серцево-судинних захворювань – на 14 % [12]. У Фінляндії завдяки реалізації державного проекту «Північна Карелія» зменшення споживання кухонної солі серед населення скоротилось на третину, що призвело до зниження кількості інсультів, ішемічної хвороби серця у країні на 75 % і 80 % відповідно [16].

У дослідженні GenSalt, що тривало 4,5 року за участю 487 дорослих громадян КНР, виявили прямий кореляційний взаємозв'язок між кількістю вживаної кухонної солі та рівнем АТ як при короткостроковому, так і при тривалому спостереженні, що свідчило про високу сіль-чутливість у загальній популяції [11].

За даними дослідження Chang H.Y. et al., показана висока ефективність та економічна користь використання солі зі зниженим вмістом натрію, що збагачена 30 % калію хлоридом. У будинку для літніх людей 1981 особа була рандомізована у групу дієти з використанням такої солі та групу контролю з вживанням звичайної солі. За 31 місяць спостереження в основній групі, що споживала сіль зі зниженим вмістом калію, спостерігали на 41 % менше смертей від серцево-судинних захворювань. Використання солі, що збагачена калієм, асоціювалось зі збільшенням тривалості життя на 3–9 місяців і зменшенням витрат на лікування серцево-судинних хвороб на 426 доларів на рік [4].

В економічно розвинутих країнах, зважаючи на доказову базу щодо шкоди вживання продуктів із високим вмістом натрію для здоров'я нації, постійно оновлюється законодавча база й практичні рекомендації з контролю за кількістю вживаної кухонної солі [6,15,24].

Чинні рекомендації експертів ВООЗ свідчать про доцільність зменшення споживання кухонної солі, що є одним із найвпливовіших й економічно вигідних механізмів для поліпшення стану здоров'я населення та «найшвидшим шляхом» до ефективної профілактики хронічних хвороб [27,28].

Отже, наявна доказова база щодо високої ефективності й економічної доцільності дієтичних інтервенцій зі зменшення споживання кухонної солі є достатньо обґрунтованою для їхньої імплементації в Україні.

Стратегії зменшення споживання кухонної солі в Україні

Резолюцією Світової Ліги Гіпертензії (2016 р.) визначені глобальні світові стратегії щодо зменшення споживання кухонної солі, котрі доцільно впроваджувати в Україні [3]. Це сприяло б зниженню частоти виникнення АГ та асоційованих із нею ускладнень. Основні положення:

– Державне управління має брати активну участь у розвитку та імплементації мультисекторальної Національної стратегії зі зменшення споживання кухонної солі в Україні.

– Регуляторні механізми та моніторинг контролю за вмістом солі у продуктах є найбільш ефективними за умови участі державного нагляду порівняно з добровільними намірами виробників продуктів.

– Громадянська освіта та поширення інформації щодо джерел надходження кухонної солі з харчовими продуктами має пріоритетне значення.

– Чіткий контроль за рівнем споживання солі, джерелами солі в раціоні, вмістом солі у харчах, а також обізнаність та увага громадськості, медичних фахівців до цієї проблеми – ключові компоненти реалізації програми з редукції споживання кухонної солі.

– Інтегративні зусилля зі зменшення споживання кухонної солі водночас зі збільшенням споживання калію та профілактикою йододефіциту – важливі ланки оптимізації здоров'я населення.

– Актуальним є висвітлення, промоція досліджень, наукових публікацій, презентацій із питань доцільності зменшення споживання кухонної солі.

– Проведення навчальних семінарів для лікарів та інших медичних фахівців для підвищення рівня знань із питань зменшення кардіоваскулярного ризику шляхом дієтичних інтервенцій є необхідним для впровадження рекомендацій зі зменшення споживання солі у практичну діяльність.

Висновки

1. Стратегічні напрями дієтичного менеджменту щодо редукції споживання кухонної солі в Україні є гостро актуальними, зважаючи на високі показники серцево-судинної смертності, що асоційовані зі зловживанням кухонною сіллю.

2. Прихильність хворих на АГ до раціону з низьким вмістом натрію є високоефективним та економічно вигідним інструментом нефармакологічного антигіпертензивного лікування, але потребує від лікарів і суміжних спеціалістів поглибленого роз'яснення щодо його дотримання пацієнтами.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним є здійснення пілотних наукових досліджень з вивчення динаміки середнього рівня споживання натрію та калію в раціоні українців і визначення можливого взаємозв'язку з частотою виникнення серцево-судинних подій.

Відомості про автора:

Волошина І. М., д-р мед. наук, доцент каф. сімейної медицини, терапії, кардіології і неврології ФПО, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторе:

Волошина И. Н., д-р мед. наук, доцент каф. семейной медицины, терапии, кардиологии и неврологии ФПО, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Information about author:

Voloshyna I. M., MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Family Medicine, Therapy, Cardiology and Neurology of FPE, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 30.11.2017

Після доопрацювання / Revised: 30.01.2018

Прийнято до друку / Accepted: 08.02.2018

Список літератури

- [1] Лашкул З.В. Особливості епідеміології артеріальної гіпертензії та її ускладнень на регіональному рівні з 1999 по 2013 роки / З.В. Лашкул // Сучасні медичні технології. – 2014. – №2. – С. 134–141.
- [2] Сіль при гіпертензії: вживати неможливо відмовитись? / І.М. Волошина, В.І. Кривенко, В.Г. Дейнера // Артеріальна гіпертензія. – 2016. – №5(49). – С. 47–52.
- [3] Хвороби системи кровообігу як медико-соціальна і суспільно-політична проблема : аналітично-статистичний посібник / під ред. В.М. Коваленка, В.М. Корнацького. – К., 2014. – 280 с.
- [4] 2016 Dietary Salt Fact Sheet and Call to Action: The World Hypertension League, International Society of Hypertension, and the International Council of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation / N.R. Campbell, D.T. Lackland, M.L. Niebylski, et al. International Council of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation // J. Clin. Hypertens. (Greenwich). – 2016. – Vol. 18(11). – P. 1082–1085.
- [5] 40-Year CHD Mortality Trends and the Role of Risk Factors in Mortality Decline: The North Karelia Project Experience / P. Jousilahti, T. Laatikainen, V. Salomaa et al. // P. Glob. Heart. – 2016. – Vol. 11(2). – P. 207–212.
- [6] He F.J. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programs / F.J. He, G.A. MacGregor // J. Hum. Hypertens. – 2009. – Vol. 23. – P. 363–384.
- [7] Aronow W.S. Reduction in dietary sodium improves blood pressure and reduces cardiovascular events and mortality / W.S. Aronow // Annals of Translational Medicine. – 2017. – Vol. 5(20). – P. 405.
- [8] Associations of urinary sodium excretion with cardiovascular events in individuals with and without hypertension: a pooled analysis of data from four studies / A. Mente, M. O'Donnell, S. Rangarajan, et al. // The Lancet. – 2016. – Vol. 388. – Issue 10043. – P. 465–475.
- [9] Dietary Sodium and Cardiovascular Disease Risk – Measurement Matters / M.E. Cogswell, K. Mugavero, B.A. Bowman, T.R. Frieden // New England Journal of Medicine. – 2016. – Vol. 375. – P. 580–586.
- [10] He F.J. Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials / F.J. He, J. Li, G.A. Macgregor // Brit. Med. J. – 2013. – Vol. 346. – f1325.
- [11] Effect of potassium-enriched salt on cardiovascular mortality and medical expenses of elderly men / H.Y. Chang, Y.W. Hu, C.S. Yue, et al. // Am. J. Clin. Nutr. – 2006. – Vol. 83(6). – P. 1289–1296.
- [12] Amer M. Effects of dietary sodium and the DASH diet on the occurrence of headaches: results from randomised multicentre DASH-Sodium clinical trial / M. Amer, M. Woodward, L.J. Appel // BMJ Open. – 2014. – Vol. 4. – Issue 12. – e006671.
- [13] Graudal N.A. Effects of low-sodium diet vs. high-sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review) / N.A. Graudal, T. Hubeck-Graudal, G. Jurgens // Am. J. Hypertens. – 2012. – Vol. 25. – Issue 1. – P. 1–15.
- [14] Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: Systematic reviews and meta-analyses from the Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE) / R. Micha, M.L. Shulkin, J.L. Peñalvo, et al. // Plos One. – 2017. – Vol. 12. – Issue 4. – e0175149.

- [15] Choi S.E. Expansion of the National Salt Reduction Initiative / S.E. Choi, M.L. Brandeau, S. Basu // *Medical Decision Making*. – 2016. – Vol. 36. – Issue 1. – P. 72–85.
- [16] Global Sodium Consumption and Death from Cardiovascular Causes / D. Mozaffarian, S. Fahimi, G.M. Singh, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371. – P. 624–634.
- [17] Health Professional Advice and Adult Action to Reduce Sodium Intake / S.L. Jackson, S.M.C. Coleman King, S. Park, et al. // *American Journal of Preventive Medicine*. – 2016. – Vol. 50. – P. 30–39.
- [18] High Salt Intake Is Independently Associated With Hypertensive Target Organ Damage / Y. Imaizumi, K. Eguchi, T. Murakami et al. // *The Journal of Clinical Hypertension*. – 2016. – Vol. 18. – P. 315–321.
- [19] Charlton K.E. Innovative and Collaborative Strategies to Reduce Population-Wide Sodium Intake / K.E. Charlton, K. Langford, J. Kaldor // *Current Nutrition Reports*. – 2015. – Vol. 4. – P. 279–289.
- [20] Kim H. Diagnostic status of hypertension on the adherence to the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet / H. Kim, F.C.D. Andrade // *Preventive Medicine Reports*. – 2016. – Vol. 4. – P. 525–531.
- [21] Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP) / N.R. Cook, J.A. Cutler, E. Obarzanek, et al. // *BMJ*. – 2007. – Vol. 334. – Issue 7599. – P. 885.
- [22] Proposed Nomenclature for Salt Intake and for Reductions in Dietary Salt / R.C. Norm, M.D. Campbell, R. Correa-Rotter, et al. // *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*. – 2015. – Vol. 17. – Issue 4. – P. 247–251.
- [23] Reproducibility of Blood Pressure Responses to Dietary Sodium and Potassium Interventions. The GenSalt Study / D. Gu, Q. Zhao, J. Chen, et al. // *Hypertension*. – 2013. – Vol. 62. – Issue 3. – P. 499–505.
- [24] Strazzullo P. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies / P. Strazzullo, N.M. Kandala, F.P. Cappuccio // *BMJ*. – 2009. – Vol. 339. – b4567.
- [25] Choi H.Y. Salt Sensitivity and Hypertension: A Paradigm Shift from Kidney Malfunction to Vascular Endothelial Dysfunction / H.Y. Choi, H.C. Park, S.K. Ha // *Electrolyte Blood Press.* – 2015. – Vol. 13(1). – P. 7–16.
- [26] The Science of Salt: A regularly updated systematic review of the implementation of salt reduction interventions (March-August 2016) / J.A. Santos, K. Trieu, T.S. Raj, et al. // *The Journal of Clinical Hypertension*. – 2017. – Vol. 19. – Issue 4. – P. 439–451.
- [27] Wang G. The cost-effectiveness of interventions designed to reduce sodium intake / G. Wang, D. Labarthe // *J. Hypertens.* – 2011. – Vol. 29. – Issue 9. – P. 1693–1699.
- [28] World Health Organization. A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. World Health Day 2013. Report. – Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2013. – P. 1–39.
- [29] Zoccali C. Moderator's view: Salt, cardiovascular risk, observational research and recommendations for clinical practice / C. Zoccali, F. Mallamaci // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2016. – Vol. 31. – P. 1405–1408.
- [9] Cogswell, M. E., Mugavero, K., Bowman, B. A., & Frieden, T. R. (2016) Dietary Sodium and Cardiovascular Disease Risk – Measurement Matters. *New England Journal of Medicine*, 375, 6, 580–586. doi: 10.1056/NEJMsb1607161.
- [10] He, F. J., Li, J., & Macgregor, G. A. (2013). Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Brit. Med. J.*, 346, f1325. doi: 10.1136/bmj.f1325.
- [11] Chang, H. Y., Hu, Y. W., Yue, C. S., Wen, Y. W., Yeh, W. T., Hsu, L. S., et al. (2006). Effect of potassium-enriched salt on cardiovascular mortality and medical expenses of elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83(6), 1289–1296. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1289.
- [12] Amer, M., Woodward, M., & Appel, L. J. (2014). Effects of dietary sodium and the DASH diet on the occurrence of headaches: results from randomised multicentre DASH-Sodium clinical trial. *BMJ Open*, 4(12), e006671. doi: 10.1136/bmjopen-2014-006671.
- [13] Graudal, N. A., Hubeck-Graudal, T., & Jurgens, G. (2012). Effects of low-sodium diet vs. high-sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review). *Am J Hypertens.*, 25(1), 1–15. doi: 10.1038/ajh.2011.210.
- [14] Micha, R., Shulkin, M. L., Peñalvo, J. L., Khatibzadeh, S., Singh, G. M., Rao, M., et al. (2017) Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: Systematic reviews and meta-analyses from the Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCODE). *PLOS ONE*, 12(4), e0175149. doi: 10.1371/journal.pone.0175149.
- [15] Choi, S. E., Brandeau, M. L., & Basu, S. (2016) Expansion of the National Salt Reduction Initiative. *Medical Decision Making*, 36(1), 72–85. doi: 10.1177/0272989X15583846.
- [16] Mozaffarian, D., Fahimi, S., Singh, G. M., Micha, R., Khatibzadeh, S., Engell, R., et al. (2014). Global Sodium Consumption and Death from Cardiovascular Causes. *N. Engl. J. Med.*, 371, 624–634. doi: 10.1056/NEJMoa1304127.
- [17] Jackson, S. L., Coleman King, S. M., Park, S., Fang, J., Odum, E. C., & Cogswell, M. E. (2016) Health Professional Advice and Adult Action to Reduce Sodium Intake. *American Journal of Preventive Medicine*, 50(1), 30–39. doi: 10.1016/j.amepre.2015.04.034.
- [18] Imaizumi, Y., Eguchi, K., Murakami, T., Arakawa, K., Tsuchihashi, T., & Kario, K. (2016) High Salt Intake Is Independently Associated With Hypertensive Target Organ Damage. *The Journal of Clinical Hypertension*, 18(4), 315–321. doi: 10.1111/jch.12668.
- [19] Charlton, K. E., Langford, K., & Kaldor, J. (2015) Innovative and Collaborative Strategies to Reduce Population-Wide Sodium Intake. *Current Nutrition Reports*, 4(4), 279–289.
- [20] Kim, H., & Andrade, F. C. D. (2016). Diagnostic status of hypertension on the adherence to the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *Preventive Medicine Reports*, 4, 525–531. doi: 10.1016/j.pmedr.2016.09.009.
- [21] Cook, N. R., Cutler, J. A., Obarzanek, E., Buring, J. E., Rexrode, K. M., Kumanyika, S. K., et al. (2007). Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ*, 334(7599), 885. doi: 10.1136/bmj.39147.604896.55.
- [22] Norm, R. C. Campbell, M. D., Correa-Rotter, R., Cappuccio, F., Webster, R. J., Lackland, D. T., et al. (2015). Proposed Nomenclature for Salt Intake and for Reductions in Dietary Salt. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*, 17(4), 247–251. doi: 10.1111/jch.12442.
- [23] Gu, D., Zhao, Q., Chen, J., Gu, D., Zhao, Q., Chen, J., et al. (2013). Reproducibility of Blood Pressure Responses to Dietary Sodium and Potassium Interventions. *The GenSalt Study. Hypertension*, 62(3), 499–505. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01034.
- [24] Strazzullo, P., Kandala, N. M., & Cappuccio, F. P. (2009). Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ*, 339, b4567. doi: 10.1136/bmj.b4567.
- [25] Choi, H. Y., Park, H. C., & Ha, S. K. (2015). Salt Sensitivity and Hypertension: A Paradigm Shift from Kidney Malfunction to Vascular Endothelial Dysfunction. *Electrolyte Blood Press.* 13(1), 7–16. doi: 10.5049/EBP.2015.13.1.7.
- [26] Santos, J. A., Trieu, K., Raj, T. S., Arcand, J., Johnson, C., Webster, J., & McLean, R. (2017) The Science of Salt: A regularly updated systematic review of the implementation of salt reduction interventions (March-August 2016). *The Journal of Clinical Hypertension*, 19(4), 439–451. doi: 10.1111/jch.12971.
- [27] Wang, G., & Labarthe, D. (2011). The cost-effectiveness of interventions designed to reduce sodium intake. *J Hypertens*, 29(9), 1693–1699. doi: 10.1097/HJH.0b013e328349ba18.
- [28] World Health Organization. (2013). A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. World Health Day 2013. Report. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- [29] Zoccali, C., & Mallamaci, F. (2016) Moderator's view: Salt, cardiovascular risk, observational research and recommendations for clinical practice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 31, 1405–1408. doi: 10.1093/ndt/gfw277.