

# GEORGIAN MEDICAL NEWS

---

ISSN 1512-0112

No 9 (270) Сентябрь 2017

---

ТБИЛИСИ - NEW YORK



ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Медицинские новости Грузии  
საქართველოს სამედიცინო სიახლენი

# GEORGIAN MEDICAL NEWS

No 9 (270) 2017

Published in cooperation with and under the patronage  
of the Tbilisi State Medical University

Издается в сотрудничестве и под патронажем  
Тбилисского государственного медицинского университета

გამოიცემა თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტთან  
თანამშრომლობითა და მისი პატრონაჟით

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ  
ТБИЛИСИ - НЬЮ-ЙОРК

**GMN: Georgian Medical News** is peer-reviewed, published monthly journal committed to promoting the science and art of medicine and the betterment of public health, published by the GMN Editorial Board and The International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (U.S.A.) since 1994. **GMN** carries original scientific articles on medicine, biology and pharmacy, which are of experimental, theoretical and practical character; publishes original research, reviews, commentaries, editorials, essays, medical news, and correspondence in English and Russian.

**GMN** is indexed in MEDLINE, SCOPUS, PubMed and VINITI Russian Academy of Sciences. The full text content is available through EBSCO databases.

**GMN: Медицинские новости Грузии** - ежемесячный рецензируемый научный журнал, издаётся Редакционной коллегией и Международной академией наук, образования, искусств и естествознания (IASEIA) США с 1994 года на русском и английском языках в целях поддержки медицинской науки и улучшения здравоохранения. В журнале публикуются оригинальные научные статьи в области медицины, биологии и фармации, статьи обзорного характера, научные сообщения, новости медицины и здравоохранения.

Журнал индексируется в MEDLINE, отражён в базе данных SCOPUS, PubMed и ВИНТИ РАН. Полнотекстовые статьи журнала доступны через БД EBSCO.

**GMN: Georgian Medical News** – საქართველოს სამედიცინო სიახლენი – არის ყოველთვიური სამეცნიერო სამედიცინო რეცენზირებადი ჟურნალი, გამოიცემა 1994 წლიდან, წარმოადგენს სარედაქციო კოლეგიისა და აშშ-ის მეცნიერების, განათლების, ინდუსტრიის, ხელოვნებისა და ბუნებისმეტყველების საერთაშორისო აკადემიის ერთობლივ გამოცემას. GMN-ში რუსულ და ინგლისურ ენებზე ქვეყნდება ექსპერიმენტული, თეორიული და პრაქტიკული ხასიათის ორიგინალური სამეცნიერო სტატიები მედიცინის, ბიოლოგიისა და ფარმაციის სფეროში, მიმოხილვითი ხასიათის სტატიები.

ჟურნალი ინდექსირებულია MEDLINE-ის საერთაშორისო სისტემაში, ასახულია SCOPUS-ის, PubMed-ის და ВИНТИ РАН-ის მონაცემთა ბაზებში. სტატიების სრული ტექსტი ხელმისაწვდომია EBSCO-ს მონაცემთა ბაზებშიდან.

## МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ ГРУЗИИ

Ежемесячный совместный грузино-американский научный электронно-печатный журнал  
Агентства медицинской информации Ассоциации деловой прессы Грузии,  
Академии медицинских наук Грузии, Международной академии наук, индустрии,  
образования и искусств США.  
Издается с 1994 г., распространяется в СНГ, ЕС и США

### НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

Лаури Манагадзе

### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Нино Микаберидзе

### НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Зураб Вадачкориа - председатель Научно-редакционного совета**

Михаил Бахмутский (США), Александр Геннинг (Германия), Амиран Гамкрелидзе (Грузия),  
Константин Кипиани (Грузия), Георгий Кавтарадзе (Грузия), Георгий Камкамидзе (Грузия),  
Паата Куртанидзе (Грузия), Вахтанг Масхулия (Грузия), Тамара Микаберидзе (Грузия),  
Тенгиз Ризнис (США), Реваз Сепиашвили (Грузия), Дэвид Элуа (США)

### НАУЧНО-РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Лаури Манагадзе - председатель Научно-редакционной коллегии**

Архимандрит Адам - Вахтанг Ахаладзе, Амиран Антадзе, Нелли Антелава, Тенгиз Асатиани,  
Рима Бериашвили, Лео Бокерия, Отар Герзмава, Лиана Гогиашвили, Нодар Гогебашвили,  
Николай Гонгадзе, Лия Дваладзе, Манана Жвания, Ирина Квачадзе,  
Нана Квирквелия, Зураб Кеванишвили,  
Гурам Кикнадзе, Палико Кинтраиа, Теймураз Лежава, Джанлуиджи Мелотти, Караман Пагава,  
Николай Пирцхалаишвили, Мамука Пирцхалаишвили, Фридон Тодуа,  
Кеннет Уолкер, Рамаз Хецуриани, Рудольф Хохенфеллинер, Кахабер Челидзе,  
Тинатин Чиковани, Арчил Чхотуа, Рамаз Шенгелия

Website:

[www.geomednews.org](http://www.geomednews.org)

The International Academy of Sciences, Education, Industry & Arts. P.O.Box 390177,  
Mountain View, CA, 94039-0177, USA. Tel/Fax: (650) 967-4733

**Версия:** печатная. **Цена:** свободная.

**Условия подписки:** подписка принимается на 6 и 12 месяцев.

**По вопросам подписки обращаться по тел.: 293 66 78.**

**Контактный адрес:** Грузия, 0177, Тбилиси, ул. Асатиани 7, III этаж, комната 313

тел.: 995(32) 254 24 91, 995(32) 222 54 18, 995(32) 253 70 58

Fax: +995(32) 253 70 58, e-mail: [ninomikaber@hotmail.com](mailto:ninomikaber@hotmail.com); [nikopir@dgmholding.com](mailto:nikopir@dgmholding.com)

**По вопросам размещения рекламы обращаться по тел.: 5(99) 97 95 93**

© 2001. Ассоциация деловой прессы Грузии

© 2001. The International Academy of Sciences,  
Education, Industry & Arts (USA)

## **GEORGIAN MEDICAL NEWS**

Monthly Georgia-US joint scientific journal published both in electronic and paper formats of the Agency of Medical Information of the Georgian Association of Business Press; Georgian Academy of Medical Sciences; International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (USA).

Published since 1994. Distributed in NIS, EU and USA.

### **SCIENTIFIC EDITOR**

Lauri Managadze

### **EDITOR IN CHIEF**

Nino Mikaberidze

### **SCIENTIFIC EDITORIAL COUNCIL**

#### **Zurab Vadachkoria - Head of Editorial council**

Michael Bakhmutsy (USA), Alexander Gënning (Germany), Amiran Gamkrelidze (Georgia), David Elua (USA), Konstantin Kipiani (Georgia), Giorgi Kavtaradze (Georgia), Giorgi Kamkamidze (Georgia), Paata Kurtanidze (Georgia), Vakhtang Maskhulia (Georgia), Tamara Mikaberidze (Georgia), Tengiz Riznis (USA), Revaz Sepiashvili (Georgia)

### **SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD**

#### **Lauri Managadze - Head of Editorial board**

Archimandrite Adam - Vakhtang Akhaladze, Amiran Antadze, Nelly Antelava, Tengiz Asatiani, Rima Beriashvili, Leo Bokeria, Kakhaber Chelidze, Tinatin Chikovani, Archil Chkhotua, Lia Dvaladze, Otar Gerzmava, Liana Gogiashvili, Nodar Gogebashvili, Nicholas Gongadze, Rudolf Hohenfellner, Zurab Kevanishvili, Ramaz Khetsuriani, Guram Kiknadze, Paliko Kintraia, Irina Kvachadze, Nana Kvirkevelia, Teymuraz Lezhava, Gianluigi Melotti, Kharaman Pagava, Nicholas Pirtskhalaishvili, Mamuka Pirtskhalaishvili, Ramaz Shengelia, Pridon Todua, Kenneth Walker, Manana Zhvania

### **CONTACT ADDRESS IN TBILISI**

GMN Editorial Board  
7 Asatiani Street, 3<sup>th</sup> Floor  
Tbilisi, Georgia 0177

Phone: 995 (32) 254-24-91  
995 (32) 222-54-18  
995 (32) 253-70-58  
Fax: 995 (32) 253-70-58

### **CONTACT ADDRESS IN NEW YORK**

NINITEX INTERNATIONAL, INC.  
3 PINE DRIVE SOUTH  
ROSLYN, NY 11576 U.S.A.

Phone: +1 (917) 327-7732

### **WEBSITE**

[www.geomednews.org](http://www.geomednews.org)

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статьи в редакцию необходимо соблюдать следующие правила:

1. Статья должна быть представлена в двух экземплярах, на русском или английском языках, напечатанная через **полтора интервала на одной стороне стандартного листа с шириной левого поля в три сантиметра**. Используемый компьютерный шрифт для текста на русском и английском языках - **Times New Roman (Кириллица)**, для текста на грузинском языке следует использовать **AcadNusx**. Размер шрифта - **12**. К рукописи, напечатанной на компьютере, должен быть приложен CD со статьей.

2. Размер статьи должен быть не менее десяти и не более двадцати страниц машинописи, включая указатель литературы и резюме на английском, русском и грузинском языках.

3. В статье должны быть освещены актуальность данного материала, методы и результаты исследования и их обсуждение.

При представлении в печать научных экспериментальных работ авторы должны указывать вид и количество экспериментальных животных, применявшиеся методы обезболивания и усыпления (в ходе острых опытов).

4. К статье должны быть приложены краткое (на полстраницы) резюме на английском, русском и грузинском языках (включающее следующие разделы: цель исследования, материал и методы, результаты и заключение) и список ключевых слов (key words).

5. Таблицы необходимо представлять в печатной форме. Фотокопии не принимаются. **Все цифровые, итоговые и процентные данные в таблицах должны соответствовать таковым в тексте статьи**. Таблицы и графики должны быть озаглавлены.

6. Фотографии должны быть контрастными, фотокопии с рентгенограмм - в позитивном изображении. Рисунки, чертежи и диаграммы следует озаглавить, пронумеровать и вставить в соответствующее место текста **в tiff формате**.

В подписях к микрофотографиям следует указывать степень увеличения через окуляр или объектив и метод окраски или импрегнации срезов.

7. Фамилии отечественных авторов приводятся в оригинальной транскрипции.

8. При оформлении и направлении статей в журнал МНГ просим авторов соблюдать правила, изложенные в «Единых требованиях к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», принятых Международным комитетом редакторов медицинских журналов - <http://www.spinesurgery.ru/files/publish.pdf> и [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

В конце каждой оригинальной статьи приводится библиографический список. В список литературы включаются все материалы, на которые имеются ссылки в тексте. Список составляется в алфавитном порядке и нумеруется. Литературный источник приводится на языке оригинала. В списке литературы сначала приводятся работы, написанные знаками грузинского алфавита, затем кириллицей и латиницей. Ссылки на цитируемые работы в тексте статьи даются в квадратных скобках в виде номера, соответствующего номеру данной работы в списке литературы. Большинство цитированных источников должны быть за последние 5-7 лет.

9. Для получения права на публикацию статья должна иметь от руководителя работы или учреждения визу и сопроводительное отношение, написанные или напечатанные на бланке и заверенные подписью и печатью.

10. В конце статьи должны быть подписи всех авторов, полностью приведены их фамилии, имена и отчества, указаны служебный и домашний номера телефонов и адреса или иные координаты. Количество авторов (соавторов) не должно превышать пяти человек.

11. Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять статьи. Корректурa авторам не высылается, вся работа и сверка проводится по авторскому оригиналу.

12. Недопустимо направление в редакцию работ, представленных к печати в иных издательствах или опубликованных в других изданиях.

**При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются.**

## REQUIREMENTS

Please note, materials submitted to the Editorial Office Staff are supposed to meet the following requirements:

1. Articles must be provided with a double copy, in English or Russian languages and typed or computer-printed on a single side of standard typing paper, with the left margin of **3** centimeters width, and **1.5** spacing between the lines, typeface - **Times New Roman (Cyrillic)**, print size - **12** (referring to Georgian and Russian materials). With computer-printed texts please enclose a CD carrying the same file titled with Latin symbols.

2. Size of the article, including index and resume in English, Russian and Georgian languages must be at least 10 pages and not exceed the limit of 20 pages of typed or computer-printed text.

3. Submitted material must include a coverage of a topical subject, research methods, results, and review.

Authors of the scientific-research works must indicate the number of experimental biological species drawn in, list the employed methods of anesthetization and soporific means used during acute tests.

4. Articles must have a short (half page) abstract in English, Russian and Georgian (including the following sections: aim of study, material and methods, results and conclusions) and a list of key words.

5. Tables must be presented in an original typed or computer-printed form, instead of a photocopied version. **Numbers, totals, percentile data on the tables must coincide with those in the texts of the articles.** Tables and graphs must be headed.

6. Photographs are required to be contrasted and must be submitted with doubles. Please number each photograph with a pencil on its back, indicate author's name, title of the article (short version), and mark out its top and bottom parts. Drawings must be accurate, drafts and diagrams drawn in Indian ink (or black ink). Photocopies of the X-ray photographs must be presented in a positive image in **tiff format**.

Accurately numbered subtitles for each illustration must be listed on a separate sheet of paper. In the subtitles for the microphotographs please indicate the ocular and objective lens magnification power, method of coloring or impregnation of the microscopic sections (preparations).

7. Please indicate last names, first and middle initials of the native authors, present names and initials of the foreign authors in the transcription of the original language, enclose in parenthesis corresponding number under which the author is listed in the reference materials.

8. Please follow guidance offered to authors by The International Committee of Medical Journal Editors guidance in its Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals publication available online at: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)  
[http://www.icmje.org/urm\\_full.pdf](http://www.icmje.org/urm_full.pdf)

In GMN style for each work cited in the text, a bibliographic reference is given, and this is located at the end of the article under the title "References". All references cited in the text must be listed. The list of references should be arranged alphabetically and then numbered. References are numbered in the text [numbers in square brackets] and in the reference list and numbers are repeated throughout the text as needed. The bibliographic description is given in the language of publication (citations in Georgian script are followed by Cyrillic and Latin).

9. To obtain the rights of publication articles must be accompanied by a visa from the project instructor or the establishment, where the work has been performed, and a reference letter, both written or typed on a special signed form, certified by a stamp or a seal.

10. Articles must be signed by all of the authors at the end, and they must be provided with a list of full names, office and home phone numbers and addresses or other non-office locations where the authors could be reached. The number of the authors (co-authors) must not exceed the limit of 5 people.

11. Editorial Staff reserves the rights to cut down in size and correct the articles. Proof-sheets are not sent out to the authors. The entire editorial and collation work is performed according to the author's original text.

12. Sending in the works that have already been assigned to the press by other Editorial Staffs or have been printed by other publishers is not permissible.

**Articles that Fail to Meet the Aforementioned  
Requirements are not Assigned to be Reviewed.**

## ავტორთა საქურაღებოლ!

რედაქციაში სტატიის წარმოდგენისას საჭიროა დაიცვათ შემდეგი წესები:

1. სტატია უნდა წარმოადგინოთ 2 ცალად, რუსულ ან ინგლისურ ენებზე დაბეჭდილი სტანდარტული ფურცლის 1 გვერდზე, 3 სმ სიგანის მარცხენა ველისა და სტრიქონებს შორის 1,5 ინტერვალის დაცვით. გამოყენებული კომპიუტერული შრიფტი რუსულ და ინგლისურენოვან ტექსტებში - **Times New Roman (Кириллица)**, ხოლო ქართულენოვან ტექსტში საჭიროა გამოვიყენოთ **AcadNusx**. შრიფტის ზომა – 12. სტატიას თან უნდა ახლდეს CD სტატიით.

2. სტატიის მოცულობა არ უნდა შეადგენდეს 10 გვერდზე ნაკლებს და 20 გვერდზე მეტს ლიტერატურის სიის და რეზიუმეების (ინგლისურ, რუსულ და ქართულ ენებზე) ჩათვლით.

3. სტატიაში საჭიროა გაშუქდეს: საკითხის აქტუალობა; კვლევის მიზანი; საკვლევი მასალა და გამოყენებული მეთოდები; მიღებული შედეგები და მათი განსჯა. ექსპერიმენტული ხასიათის სტატიების წარმოდგენისას ავტორებმა უნდა მიუთითონ საექსპერიმენტო ცხოველების სახეობა და რაოდენობა; გაუტკივარებისა და დაძინების მეთოდები (მწვავე ცდების პირობებში).

4. სტატიას თან უნდა ახლდეს რეზიუმე ინგლისურ, რუსულ და ქართულ ენებზე არანაკლებ ნახევარი გვერდის მოცულობისა (სათაურის, ავტორების, დაწესებულების მითითებით და უნდა შეიცავდეს შემდეგ განყოფილებებს: მიზანი, მასალა და მეთოდები, შედეგები და დასკვნები; ტექსტუალური ნაწილი არ უნდა იყოს 15 სტრიქონზე ნაკლები) და საკვანძო სიტყვების ჩამონათვალი (key words).

5. ცხრილები საჭიროა წარმოადგინოთ ნაბეჭდი სახით. ყველა ციფრული, შემაჯამებელი და პროცენტული მონაცემები უნდა შეესაბამებოდეს ტექსტში მოყვანილს.

6. ფოტოსურათები უნდა იყოს კონტრასტული; სურათები, ნახაზები, დიაგრამები - დასათაურებული, დანომრილი და სათანადო ადგილას ჩასმული. რენტგენოგრამების ფოტოასლები წარმოადგინეთ პოზიტიური გამოსახულებით **tiff** ფორმატში. მიკროფოტოსურათების წარწერებში საჭიროა მიუთითოთ ოკულარის ან ობიექტივის საშუალებით გადიდების ხარისხი, ანათალებების შედეგების ან იმპრეგნაციის მეთოდი და აღნიშნოთ სურათის ზედა და ქვედა ნაწილები.

7. სამამულო ავტორების გვარები სტატიაში აღინიშნება ინიციალების თანდართვით, უცხოურისა – უცხოური ტრანსკრიპციით.

8. სტატიას თან უნდა ახლდეს ავტორის მიერ გამოყენებული სამამულო და უცხოური შრომების ბიბლიოგრაფიული სია (ბოლო 5-8 წლის სიღრმით). ანბანური წყობით წარმოდგენილ ბიბლიოგრაფიულ სიაში მიუთითეთ ჯერ სამამულო, შემდეგ უცხოელი ავტორები (გვარი, ინიციალები, სტატიის სათაური, ჟურნალის დასახელება, გამოცემის ადგილი, წელი, ჟურნალის №, პირველი და ბოლო გვერდები). მონოგრაფიის შემთხვევაში მიუთითეთ გამოცემის წელი, ადგილი და გვერდების საერთო რაოდენობა. ტექსტში კვადრატულ ფხიხლებში უნდა მიუთითოთ ავტორის შესაბამისი N ლიტერატურის სიის მიხედვით. მიზანშეწონილია, რომ ციტირებული წყაროების უმეტესი ნაწილი იყოს 5-6 წლის სიღრმის.

9. სტატიას თან უნდა ახლდეს: ა) დაწესებულების ან სამეცნიერო ხელმძღვანელის წარდგინება, დამოწმებული ხელმოწერითა და ბეჭდით; ბ) დარგის სპეციალისტის დამოწმებული რეცენზია, რომელშიც მითითებული იქნება საკითხის აქტუალობა, მასალის საკმაობა, მეთოდის სანდოობა, შედეგების სამეცნიერო-პრაქტიკული მნიშვნელობა.

10. სტატიის ბოლოს საჭიროა ყველა ავტორის ხელმოწერა, რომელთა რაოდენობა არ უნდა აღემატებოდეს 5-ს.

11. რედაქცია იტოვებს უფლებას შეასწოროს სტატია. ტექსტზე მუშაობა და შეჯერება ხდება საავტორო ორიგინალის მიხედვით.

12. დაუშვებელია რედაქციაში ისეთი სტატიის წარდგენა, რომელიც დასაბეჭდად წარდგენილი იყო სხვა რედაქციაში ან გამოქვეყნებული იყო სხვა გამოცემებში.

აღნიშნული წესების დარღვევის შემთხვევაში სტატიები არ განიხილება.



Содержание:

<b>Goldman A., Wollina U.</b> MIXED TYPE BASAL CELL CARCINOMA OF THE AURICLE – SINGLE STAGE RECONSTRUCTION AFTER R0-RESECTION BY A MODIFIED ANTIA-BUCH FLAP (CLINICAL CASE REPORT).....	7
<b>Lytvynenko M., Shkolnikov V., Bocharova T., Sychova L., Gargin V.</b> PECULIARITIES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CERVICAL SQUAMOUS CANCER IN HIV INFECTION.....	10
<b>Kuyun L., Kurchenko I., Bisuyuk Yu.</b> IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF APPENDIX CELL WALL INFILTRATE IN ACUTE PHLEGMONOUS APPENDICITIS .....	15
<b>Zilfyan A., Abovyan A.</b> A NEW APPROACH TO KERATOCONUS DIAGNOSTICS USING MATRIX METALLOPROTEINASE-9 MARKER .....	20
<b>Cherepynska Yu., Volkova O., Riabokon E., Baglyk T.</b> ANALYSIS OF THE LONG-TERM CLINICAL RESULTS OF USING 940 μm DIODE LASER IN PATIENTS WITH GENERALIZED MODERATE CHRONIC PERIODONTITIS .....	24
<b>Койшибаева Л.М., Тургунов Е.М., Сандблум Г., Телеуов М.К., Баймуратова М.Г.</b> ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ.....	30
<b>Гулзода М.К., Халимова Ф.Т., Шукуров Ф.А., Гулин А.В.</b> ПОПУЛЯЦИОННО-КЛАСТЕРНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ ЖЕНЩИН .....	38
<b>Rekvava M., Dundua T., Kobulia M., Javashvili L., Giorgadze E.</b> INSULIN LIKE GROWTH FACTOR 1 POSSIBLE DEPENDENCE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME OF NODULAR PATHOLOGY OF THE THYROID GLAND.....	46
<b>Bilchenko O., Kravtsova V., Samburh Y., Hodlevska O., Gavrilyuk V.</b> PECULIARITIES OF REMODELING OF HEART AND NEUROHUMORAL STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE AND CONCOMITANT RENAL DISEASE DEPENDING ON THE VALUE OF THE EJECTION FRACTION OF THE LEFT VENTRICLE .....	51
<b>Мамедов М.К., Мамедова Т.Н., Рагимзаде С.Э., Рагимов А.А.</b> СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИИ ГЕПАТИТА С СРЕДИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОЖИВАЮЩИХ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ.....	55
<b>Hukhlina O., Antoniv A., Dudka I., Dudka T., Mandryk O.</b> PECULIARITIES OF THE CLINICAL COURSE OF NON-ALCOHOLIC STEATONEPHRITIS AGAINST THE BACKGROUND OF THE CHRONIC KIDNEY DISEASE OF THE I-III STAGE WITH SECONDARY ARTERIAL HYPERTENSION .....	59
<b>Sokhan A., Zots Y., Gavrylov A., Iurko K., Solomennik A., Kuznietsova A.</b> LEVELS OF NEUROSPECIFIC MARKERS IN CEREBROSPINAL FLUID OF ADULT PATIENTS WITH BACTERIAL MENINGITIS .....	65
<b>Kolesnikova E., Potapenko A.</b> EFFECT OF THE CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS ON VASCULAR AGING IN PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE CONCOMITANT WITH SUBCLINICAL HYPOTHYROIDISM.....	69

<b>Zimmermann P., Scheibe A., Marotz J., Wollina U.</b> ANALYSIS OF TISSUE OXYGENATION IN CHRONIC LEG ULCERS BY COMBINATION OF A MULTI-SPECTRAL CAMERA AND A HYPER-SPECTRAL PROBE.....	75
<b>Мудренко И.Г., Потапов А.А., Сотников Д.Д., Коленко О.И., Кмыга А.П.</b> ПСИХОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ИНТЕРВЕНЦИИ ВО ВРЕМЯ ПЕРВОГО ЭПИЗОДА ПСИХОЗА У БОЛЬНЫХ С АУТОАГРЕССИВНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ.....	81
<b>Tsertsvadze T., Mitskevich N., Bilanishvili A., Gitraladze D., Porakishvili N.</b> PHAGOCYTOSIS AND EXPRESSION OF FC $\gamma$ -RECEPTORS AND CD180 ON MONOCYTES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA.....	88
<b>Мирошниченко М.С., Шерстюк С.А., Зубова Е.О., Наконечная С.А.</b> ПАТОГЕННО ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ГИПОКСИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ, В ОРГАНАХ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ).....	94
<b>Kikalishvili N., Beriashvili R., Muzashvili T., Burkadze G.</b> AGE-RELATED SPECIFICITIES OF ENDOMETRIAL PROLIFERATION/STEM CELL INDEX DISTRIBUTION.....	99
<b>Kovalchuk O., Cherkasov E., Dzevulska I., Kaminsky R., Korsak A., Sokurenko L.</b> DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF RATS' ADENOHYPOPHYSIS IN BURN DISEASE.....	104
<b>Койшибаев Ж.М., Тургунов Е.М., Сандблум Г., Лавриненко А.В., Жумакаев А.М.</b> ДИНАМИКА ЭНТЕРОПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ.....	108
<b>Masiukovich T., Jokhadze M., Murtazashvili T., Bakuridze A.</b> CHARACTERIZATION OF SULPHIDE SILT PELOIDS IN SOME LAKES WITHIN ADJARA REGION AND DETERMINATION OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS CONTENT.....	115
<b>Kairkhanova Y., Saimova A., Uzbekov D., Chaizhunusova N., Fujimoto N.</b> EFFECTS OF EXPOSURE TO RADIOACTIVE <sup>56</sup> MnO <sub>2</sub> POWDER ON HYALURONAN SYNTHASE 2 IN THE LUNGS OF RATS.....	120
<b>Marushchak M., Lisnianska N., Krynytska I., Chornomydz I.</b> THE MECHANISMS OF APOPTOSIS INITIATION IN RATS WITH CHRONIC ENTEROCOLITIS COMBINED WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES.....	125
<b>Ibrayeva A., Turdalieva B., Aimbetova G., Pleva L.</b> GENERAL HEALTH STATUS AMONG FIREFIGHTERS AND RESCUE OPERATIONS WORKERS.....	130
<b>Kiladze L., Todadze Kh., Balkhamishvili T., Gadelia E., Lezhava G.</b> IMPACT OF PHARMACY REFORM ON THE DYNAMICS OF THE USE OF DRUGS AND PSYCHOACTIVE SUBSTANCES ACCORDING TO THE 2013-2016 CLINICAL DATA FROM THE "CENTER FOR MENTAL HEALTH AND PREVENTION OF ADDICTION".....	136
<b>Мурджикнели К.Г., Родоная С.В., Ломтадзе Л.И., Дарсания Т.Н., Каджришвили М.А.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОЙ ДОЗЫ ОБЗОРНОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ.....	140
<b>Кварацхелия Г.Дж., Кверенчиладзе Р.Г., Булейшвили М.Л., Лобжанидзе Н.Г., Шарашенидзе Г.З., Саникидзе Т.В., Ормоцадзе Г.Л.</b> СКРИНИНГ-ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ ПО СПЕКТРУ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В НЕКОТОРЫХ ЗОНАХ ВЕРХНЕЙ ИМЕРЕТИИ (ЧИАТУРСКИЙ МУНИЦИПАЛИТЕТ).....	145

## MIXED TYPE BASAL CELL CARCINOMA OF THE AURICLE – SINGLE STAGE RECONSTRUCTION AFTER R0-RESECTION BY A MODIFIED ANTIA-BUCH FLAP (CLINICAL CASE REPORT)

<sup>1</sup>Goldman A., <sup>2</sup>Wollina U.

<sup>1</sup>*Clinica Goldman, Porto Alegre, RS, Brazil;*

<sup>2</sup>*Department of Dermatology and Allergology, Academic Teaching Hospital Dresden, Dresden, Germany*

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common neoplasia in Caucasians with a pre-dominance for the sun-exposed anatomical areas such as head-and-neck region with an annual increase of 3-7% in incidence [8,15]. In an analysis of the cases treated at our Department from January 2008 to December 2012 1,750 BCC lesions were excised from 1,380 patients. The mean age of the patients was  $74.3 \pm 11.4$  years [16].

Focusing on the auricle, squamous cell carcinoma (SCC) is the most common followed by BCC in second place. The skin of the ear is unique since it is thin, lacks subcutaneous adipose tissue, has numerous arterial-venous shunts, and is close to underlying cartilage. Lesions of the auricle seem to be more aggressive and can spread along the embryologic fusion planes of the ear, which increases the rate of R1 excision [3].

In a retrospective study BCC of the auricle and of the cheek were compared, reporting 57% as high risk on the auricle, compared with 38% on the cheek. In contrast to the entire head-and-neck region, there was a clear male pre-dominance [7]. In a meta-analysis, the risk of incomplete (R1-) resection of BCC was 2.5 higher for tumors of the auricle compared to other regions [13].

Although mortality from BCC is low, the manifestation is responsible for a considerable morbidity and sometimes deformities in different body and face region. The correct oncologic treatment and immediate reconstruction of the anatomical region can represent a challenge.

Clinical examination, dermoscopy, and histological evaluation are fundamental for the diagnosis and consequent treatment. The major treatment options are surgery and radiotherapy. Topical drugs like Imiquimod, photodynamic therapy, and systemic hedgehog inhibitors can also be considered in selected cases. Each of them has advantages and disadvantages. The treatment must be aimed at the complete removal of the lesion and periodic follow-up to detect recurrence or new lesions. The highest cure rate is by complete surgical excision [10].

*Case Report.* We present a case of basal cell carcinoma of the auricle in a 79 years old male patient without previous treatment. His medical history was positive for controlled diabetes mellitus type II and hypertension. The patient was referred with a clinical diagnosis of BCC of auricular helix (Fig. 1), by his dermatologist.

Under local anesthesia and sedation, the lesion was removed in a single piece (full-thickness) including skin and cartilage with 5 mm safety margins (Fig. 2).



Fig. 1. Partially ulcerated BCC of the auricle. The surrounding skin shows signs of chronic ultraviolet-light exposure, i.e. actinic keratosis and elastosis



Fig. 2. Demonstration of surgical excision and auricular reconstruction

Immediate reconstruction was performed using modified Antia-Buch flap. This flap was created by an incision along the helical sulcus extending through the anterior skin and cartilage, dissecting the helix from the scapha. The posterior auricular skin was elevated superficial to the perichondrium. The resulting anterior chondro-cutaneous flap was advanced into the defect (Fig. 3).



*Fig. 3: Operation situs with the creation of a modified Antia-Buch flap.*

The reconstruction was accomplished in a single stage. No complications were observed (Fig. 4).



*Fig. 4. Result one month after surgery*

The lesion was sent to histological evaluation that confirmed a mixed type BCC, with a depth of the infiltration >2 mm; Clark level: 4. There was no sign of perineural invasion. The lateral and deep surgical margins were tumor-free.

Non-melanoma skin cancer incidence is rising world-wide with BCC as the leading entity. Sun-exposure is known as a major environmental risk factor leading to a predisposition of non-melanoma skin cancer of the head-and-neck region. The auricles are the fifth most common anatomical localization affected by these tumors. In a study from California, US, the male to female ratio for non-melanoma skin cancer of the auricle was 17:1. Of the patients responding to the survey, 72.8% used sunscreen, but only 26.0% of those who used sunscreen always applied it to their ears [12]. This demonstrates the lack of knowledge among populations at risk.

We described the case of mixed type BCC of the auricle in the patient treated by surgery. In a study from Iran, BCCs of mixed type were slightly more frequent on auricle, and these tumors were often more aggressive than non-mixed type BCCs [6].

Treatment of choice is surgery. In our department, most tumors of the head-and-neck region were removed surgically by delayed Mohs technique (77.0%). The average recurrence rate of BCC was 1.6% and 0.24% among R0 resected tumors. Surgical excision remains the mainstay of treatment [16].

Reconstruction of the auricle is esthetically demanding, although the R0-removal of the tumor is a priority. Auricular reconstruction of full thickness defects after BCC surgery can be performed by different approaches. Probably the most common procedure is the wedge excision or the Trendelenburg flap - both are single-stage procedures [9]. Staged retro-auricular flap can be used from helical rim and anthelix reconstruction with good aesthetic outcome, but leaving a donor site for healing by second intention [4]. An alternative for upper anthelix reconstruction is the banner pull-through flap [1]. For smaller upper pole auricular rim defects the helical advancement flap is a convenient method [2]. The larger the defect becomes the more complex situation gets [5,11].

Here we used a single-stage procedure of a modified wedge excision that allowed preserving the height of the auricle – a modified Antia-Buch flap [14]. This technique allows the closure of small to medium sized defects after tumor excision surgery. The most common adverse event is post-operative hematoma that was not observed in the present case. The helical flap has a stable vascular supply via the posterior auricular artery branches and the consecutive perforating branches. The superior auricular artery originating from the anterior auricular artery is responsible for the blood supply to the medial part and top of the helical rim. This part is completely preserved by the Antia-Buch.

In conclusion, BCCs of the auricle are often high-risk tumors, that need a complete removal and careful reconstruction of the auricle.

## REFERENCES

1. Ali E, Nasrin N, Azin E. Aesthetic reconstruction of the upper antihelix in external ear with banner pull-through flap. *J Cutan Aesthet Surg.* 2015;8(4):218-21.
2. Al-Shaham A. Helical advancement: Pearls and pitfalls. *Can J Plast Surg.* 2012;20(2):e28–31.
3. Beecher SM, Joyce CW, Elsafty N, Jones DM, Hussey AJ, Regan PJ, Kelly JL. Skin Malignancies of the Ear. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2016;4(1):e604.
4. Cerci FB. Staged retroauricular flap for helical reconstruction after Mohs micrographic surgery. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5 suppl 1):144-7.
5. Ebrahimi A, Kazemi A, Rasouli HR, Kazemi M, Kalantar Motamedi MH. Reconstructive surgery of auricular defects: an overview. *Trauma Mon.* 2015;20(4):e28202.
6. Ghanadan A, Abbasi A, Rabet M, Abdollahi P, Abbasi M. Characteristics of mixed type basal cell carcinoma in comparison to other BCC subtypes. *Indian J Dermatol.* 2014;59(1):56-9.
7. Jarell AD, Mully TW. Basal cell carcinoma on the ear is more likely to be of an aggressive phenotype in both men and women. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(5):780-4.
8. Kolk A, Wolff KD, Smeets R, Kesting M, Hein R, Eckert AW. Melanotic and non-melanotic malignancies of the face and external ear. A review of current treatment concepts and future options. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(7):819-37.
9. Lykoudis EG, Seretis K, Demiri E. Auricular wedge excision revisited: technical refinements to avoid postoperative ear deformities. *Plast Reconstr Surg.* 2013;131(5):853e-4e.
10. Mosterd K, Krekels GA, Nieman FH, Ostertag JU, Essers BA, Dirksen CD, Steijlen PM, Vermeulen A, Neumann H, Kelleners-Smeets NW. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol.* 2008;9(12):1149-56.
11. Otto IA, Melchels FP, Zhao X, Randolph MA, Kon M, Breugem CC, Malda J. Auricular reconstruction using biofabrication-based tissue engineering strategies. *Biofabrication.* 2015;7(3):032001.
12. Ragi JM, Patel D, Masud A, Rao BK. Nonmelanoma skin cancer of the ear: frequency, patients' knowledge, and photoprotection practices. *Dermatol Surg.* 2010;36(8):1232-9.
13. Rogalski C, Kauer F, Simon JC, Paasch U. Meta-analysis of published data on incompletely excised basal cell carcinomas of the ear and nose with introduction of an innovative treatment strategy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5(2):118-26.
14. Stella C, Feintisch AM, Lee E. Helical rim reconstruction: Antia-Buch flap. *Eplasty.* 2015; 15: 55.
15. Subramaniam P, Olsen CM, Thompson BS, Whiteman DC, Neale RE; QSkin Sun and Health Study Investigators. Anatomical distributions of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma in a population-based study in Queensland, Australia. *JAMA Dermatol.* 2016; doi: 10.1001/jamadermatol.2016.4070. [Epub ahead of print]
16. Tourli I, Langner D, Haroske G, Tchernev G, Lotti T, Wollina U. Basal cell carcinoma of the head-and-neck region: a single center analysis of 1,750 tumors. *Georgian Med News.* 2016;(250):33-9.

## SUMMARY

### MIXED TYPE BASAL CELL CARCINOMA OF THE AURICLE – SINGLE STAGE RECONSTRUCTION AFTER R0-RESECTION BY A MODIFIED ANTIA-BUCH FLAP (CLINICAL CASE REPORT)

<sup>1</sup>Goldman A., <sup>2</sup>Wollina U.

<sup>1</sup>*Clinica Goldman, Porto Alegre, RS, Brazil;* <sup>2</sup>*Department of Dermatology and Allergology, Academic Teaching Hospital Dresden, Dresden, Germany*

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common neoplasia in Caucasians with a pre-dominance for the sun-exposed anatomical areas including the auricle. The treatment of choice is surgery achieving an R0-resection status. On the other hand, functional and aesthetic results are of importance. We report a case of 79-year-old Caucasian man with a BCC of the helical rim that was treated surgically using a modified Antia-Buch flap for single stage reconstruction. Article is discussing peculiarities of BCC on the auricle and options for auricular reconstruction.

**Keywords:** auricle, basal cell carcinoma, sun-exposure, surgery, modified Antia-Buch flap.

## РЕЗЮМЕ

### ОДНОЭТАПНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ УШНОЙ РАКОВИНЫ МЕТОДОМ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЛОСКУТА ANTIA-BUCH ПОСЛЕ R0-РЕЗЕКЦИИ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ СМЕШАННОГО ТИПА (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

<sup>1</sup>Голдман А., <sup>2</sup>Воллина У.

<sup>1</sup>*Клиника Голдман, Порту-Алегри, Бразилия;* <sup>2</sup>*Академический учебный госпиталь Дрезден-Фридрихштадт, департамент дерматологии и аллергологии, Дрезден, Германия*

Базально-клеточная карцинома (БКК) является наиболее распространенным опухолевым новообразованием среди населения белой расы с преобладающей локализацией в областях обнаженного кожного покрова, включая ушную раковину. Предпочтительным лечением является хирургическая операция в пределах R0-резекции. С другой стороны, важны функциональные и эстетические результаты. Авторами представлен клинический случай БКК в области завитка ушной

раковины у 79-летнего пациента белой расы, которому проведено одноэтапное реконструктивное хирургическое лечение методом модифицированного лоскута

Antia-Buch. В статье обсуждаются особенности БКК в области ушной раковины и варианты реконструкции наружного уха.

### რეზიუმე

ყურის ნიჟარის ერთეტაპიანი რეკონსტრუქცია ANTIA-BUCH-ის მოდიფიცირებული ნაფლეთის მეთოდით შერეული ტიპის ბაზალურ-უჯრედული კარცინომის R0-რეზექციის შემდეგ (კლინიკური შემთხვევა)

<sup>1</sup>ა. გოლდმანი, <sup>2</sup>უ. გოლინა

<sup>1</sup>გოლდმანის კლინიკა, პორტუ-ალეგრი, ბრაზილია; <sup>2</sup>დრეზდენ-ფრიდრიხ-შტადტის აკადემიური სასწავლო ჰოსპიტალი, დერმატოლოგიისა და ალერგოლოგიის დეპარტამენტი, დრეზდენი, გერმანია

ბაზალურ-უჯრედული კარცინომა (ბუკ), უპირატესი ლოკალიზაციით კანის გაშიშვლებულ უბნებზე, ყურის ნიჟარის ჩათვლით, წარმოადგენს ყველაზე ფართოდ გავრცელებულ სიმსივნურ ახალწარმონაქმნს თეთრკანიან მოსახლეობაში. უპირატეს მკურნალობად ითვლება ქირურგიული ოპერაცია R0-რეზექციის ფარგლებში. მეორე მხრივ, მნიშვნელოვანია ფუნქციური და ესთეტიკური შედეგებიც. ავტორების მიერ წარ-

მოდგენილია 79 წლის თეთრკანიანი პაციენტის კლინიკური შემთხვევა ბუკ-ით ყურის ნიჟარის ხევეულის მიდამოში, რომელსაც ჩაუტარდა ერთეტაპიანი რეკონსტრუქციული ქირურგიული მკურნალობა Antia-Buch-ის მოდიფიცირებული ნაფლეთის მეთოდით. სტატიაში განხილულია ყურის ნიჟარის ხევეულის მიდამოს ბუკ-ის თავისებურებები და გარეთა ყურის რეკონსტრუქციის ვარიანტები.

## PECULIARITIES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CERVICAL SQUAMOUS CANCER IN HIV INFECTION

<sup>1</sup>Lytvynenko M., <sup>2</sup>Shkolnikov V., <sup>3</sup>Bocharova T., <sup>3</sup>Sychova L., <sup>3</sup>Gargin V.

<sup>1</sup>Odessa National Medical University; <sup>2</sup>Vinnitsia National Pirogov Memorial Medical University;  
<sup>3</sup>Kharkiv National Medical University, Ukraine

Mucosal surfaces are the primary sites of most human immunodeficiency virus (HIV) transmission, and thus these tissues are a focus of attention for efforts to prevent HIV infection [20] that is important for future consequences of HIV with neoplastic processes including. Patients with HIV infection have a statistically significant increased risk of developing certain cancer, such as Kaposi's sarcoma, lymphoma, and invasive cervical cancer [8], all of which are considered to be acquired immune deficiency syndrome (AIDS) defining conditions. Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide. It represents one of the most challenging public health problems in developing countries. HIV-infected women have a higher risk of cervical cancer which is an AIDS defining cancer [3,5].

Last decade is characterized by significant search of prognostic signs and especial proliferative peculiarities for carcinoma of different localization [10,16,18,22]. Comparison of different tumours such as breast, thyroid, colon, testis and other [10,17,15,22], the current clinical

management of genitals malignancies is lagging behind in terms of utilization of clinically robust molecular tests that can identify patients that are more likely to respond to a given targeted agent, or even those in need of a more aggressive treatment approach based on well-validated molecular prognosticators [12]. One effective means to decrease cervical cancer incidence and death is an early detection of cancer, its precancerous lesions or cervical intraepithelial neoplasia [7] with detection of cellular dysregulation, that could be evidenced clinically by immunohistochemical study of some proteins, such as, p16 and Ki67 [13,23].

Named biomarkers are important for detection, prognosis, and targeted therapeutics of cervical neoplastic transformation and evaluation [2]. Understanding of the molecular events leading to the development and progression of genital malignancies, markers of detection, prognostication, and therapy prediction can be exploited in the management of cervical cancer.

The expression of the human Ki-67 protein is strictly associated with cell proliferation. During interphase, the antigen can be exclusively detected within the nucleus, whereas in mitosis most of the protein is relocated to the surface of the chromosomes. The fact that the Ki-67 protein is present during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2, and mitosis), but is absent from resting cells (G0), makes it an excellent marker for determining the so-called growth fraction of a given cell population [19].

In connection with the above, the purpose of our work was detection of proliferative activity in cervical squamous cancer in women with HIV infection with Ki-67 immunohistochemical examination.

**Material and methods.** There were investigated 24 cases of cervical carcinoma, for which biopsy was performed before the radiation treatment. Materials for the study have been selected with histologically confirmed cervical cancer in 12 patients with HIV (investigated group) and 12 patients without HIV infection (group of comparison). For obtaining relevant results, we included only cases with positive results for human papillomavirus (HPV) infection. HIV infection was determined by a serum enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with confirmation by Western blot. A CD4 lymphocyte count <100 cells/ $\mu$ L was considered "low." We used the classification of the stages of cervical cancer (FIGO, 2009). Process and extent of tumor (TNM, 2010), under which selected cases treated IIa-IIb (FIGO), T2a-T2b (TNM). Age of women in two groups ranged from 27 to 63 years and averaged 36.5 years.

The material was fixed in 10% neutral buffered formalin and Bouin's fluid for 10-12 hours, were subjected to standard proceeding and embedded in paraffin. From the prepared blocks made serial sections thick  $5 \times 10^{-6}$  m. Slides were stained with hematoxylin and eosin [1], according to van Gieson's. Immunohistochemical examination (IHC) was performed indirect immunoperoxidase reaction [4] with monoclonal antibodies (mAb) to Ki-67, p16; all used mAbs are manufactured by Thermo scientific, USA. The reaction was visualized using a set of UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific, USA).

Histological study was performed with microscope «Olympus BX41» followed by morphometric study using "Olympus DP-soft 3.12" program. Staining was scored independently by two observers and a high level of concordance (90%) was achieved. All slides were independently reviewed twice and intra-observer disagreements (<10%) were reviewed a third time followed by a

conclusive judgment. Evaluation of expression was performed using a quantitative scale.

Positive Ki-67 expression was diagnosed with nuclear stain in the intermediate and superficial cells. Ki67 staining in basal or parabasal cell was considered as negative. Positive p16 expression was interpreted with a diffuse staining in both nuclear and cytoplasm of basal, parabasal, with or without superficial cells. Unstained, focal or sporadic epithelial staining was considered as negative. Negative control was performed in the same tissue without primary antibodies [7].

Counting of number of investigated structures was performed per  $1 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup> area of the tissue with coincident points  $\times 100$ /number total of points on the grid. All values are expressed as means, standard deviation (SD) and standard error of the mean (SEM) for statistical analysis. Statistical comparison was performed using Mann-Whitney test for statistical analysis. Spearman's rank correlation coefficient (r) was counted for measure of the strength of relationship between paired data [11]. The accepted level of significance was  $p \leq 0.05$ .

The procedure was done strictly in compliance with the Helsinki Declaration after approval from the Regional Ethical Review Board at Odessa National Medical University, protocol 3, 17<sup>th</sup> October 2011.

**Results and their discussion.** As we wrote above age of women in two groups ranged from 27 to 63 years and averaged 36.5 years, but separation of women age in group with/without HIV realized in significant differences. So, averaged age was 32.7 years in group with HIV infection, and 38.2 years in group without HIV infection.

The 24 cases were histopathological diagnosed as follows: well-differentiated keratinizing squamous cell carcinoma (7 cases), moderately differentiated nonkeratinizing squamous cell carcinoma (13 cases) and poor differentiated nonkeratinizing squamous cell carcinoma (4 cases). The distribution of histological variants of cervical cancer by the studied groups is presented in the Table 1.

As a result of IHC it was detected that positive Ki-67 expression and positive p16 expression have been revealed in 100% and 95.2% cases respectively, but percentage of cell with positive staining was uneven in investigated groups. So, percentage of cell with positive staining Ki67 was ranged from 11.32 to 85.4 % (averaging 48.8%) in group without HIV. But it was ranged from 27.41 to 93.4 (averaging 62.5%) in HIV group (Table 2). It should be noted that dysplastic cells have been revealed with positively responding nuclei to Ki-67 in all cases, mostly outside, layers of the epithelium, the intensity of

Table 1. Distribution of histological variants of cervical cancer

Histological types	Cervical cancer without HIV	Cervical cancer with HIV
well-differentiated squamous cell carcinoma	5	2
moderately differentiated squamous cell carcinoma	6	7
poor differentiated squamous cell carcinoma	1	3

Table 2. Evaluation of expression for immunohistochemical staining (% of positive cells)

Histological types	Ki-67		p16	
	No HIV (n=12)	HIV (n=12)	No HIV (n=12)	HIV (n=12)
Well-differentiated squamous cell carcinoma	21.3±2.4	34.7±3.8*	49.2±4.7	64.7±4.3*
Moderately differentiated squamous cell carcinoma	45.8±4.2	63.7±4.3*	69.7±5.8	68.9±6.1
Poor differentiated squamous cell carcinoma	79.4±3.7	89.2±5.1*	68.4±5.8	61.7±7.3
Averaging level	48.8±5.2	62.5±5.6*	62.4±4.3	65.1±8.4

\* -  $p < 0.05$  significant between groups with and without HIV

the reaction was moderate and high in peritumoral tissue. In some cases of group without HIV, the cells of the basal layer were Ki-67-negative. At the same time, as we move into the tumor, cells with positive nuclear reaction for Ki-67 detected as primarily high intensity in all layers of the cervical epithelial layer. Almost all cell nuclei were Ki-67-positive reactions with high intensity in areas that are suspicious as microinvasion in both groups.

IHC localization and intensity of response to Ki-67 have been depending of invasive growth varies on the degree of differentiation. Thus, in poor differentiated squamous cell carcinoma positive nuclear reaction for Ki-67 was detected in the majority of cells without a particular pattern, whereas in the stratum cancer, in the central parts Ki-67 - positive cells interspersed with Ki-67 - negative. But comparison of same level differentiation case resulted in more active proliferative process in all subgroups - well-, moderately- and poor differentiated squamous cell carcinoma.

As we wrote above p16 expression has been revealed in 95.2% cases, due to presence of 3 cases from HIV group with unclear pale nuclear and cytoplasmic staining, that we recognize as negative expression. Percentage of cell with positive p16 staining was uneven in investigated groups as and Ki-67 expression (Table 2).

The p16-positive immunostain was diffuse and strong at nuclear and cytoplasmic localization, without differences regarding the intensity of reaction in different level of differentiated squamous cell carcinoma degree for first point of view. Simultaneously we observed weak intensity stain in the cytoplasm and nucleus of non-epithelial cells, such as fibroblasts, inflammatory cells, vascular endothelial cells. P16 immunostaining was present in basal and parabasal cells mainly from the lower third of the epithelium till two thirds epithelium in peritumoral tissue. The p16 reaction was observed also in few epithelial cells from the upper layers with no intensive staining.

Women with HIV infection have an increased risk of developing certain malignancies. These malignancies are commonly human papillomavirus (HPV)-related reflecting the high rate of coinfection with HPV in women with underlying HIV infection. These women also have a high incidence of premalignant HPV-related changes, such as high-grade squamous intraepithelial lesions as diagnosed on Pap smears and cervical intraepithelial

neoplasia on cervical biopsy. Screening recommendations for HIV-infected women reflect the need for vigilance in detecting and treating these lesions early. In addition, recent interest has focused on the use of cervical cancer screening, employing HPV-testing techniques, and on HPV vaccination in younger women to prevent initial infection and the subsequent development of cervical and other HPV-related cancers [8]. Risk factors for cervical cancer include sexual intercourse at an early age, multiple sexual partners, tobacco smoking, long-term oral contraceptive use, low socioeconomic status, immunosuppressive therapy, and micronutrient deficiency. Persistent infection by oncogenic, high-risk strains of HPV is strongly associated with the development of cervical cancer [9] and as all patients with HIV were observed with positive HPV so we select patients with same indicators by HPV for group of comparison. Distribution of histological variants of cervical cancer by the studied groups is approximately same with insignificant tendency to less differentiate for group with HIV.

Proliferation of appeared malignant tumor is important characteristic for prognosis. Ki-67 is a nuclear protein associated with cell proliferation and ribosomal RNA transcription. It is found in all active phases of the cell cycle and increasing the fraction Ki-67 positive tumoral cells is associated with a worsening of the prognosis for course of tumor [19]. Status of Ki-67 could be detected as an independent predictor disease free survival and presence of numerous Ki-67 positive stained cells is expected results for developed cervical carcinoma in our slides.

Level of Ki-67 is progressively increased in both investigated groups, but level of proliferation is significantly higher in group with HIV. So, averaging level for all histological types in group without HIV was 48.8±5.2% with 62.5±5.6% in group with HIV. Level of proliferation was more pronounced in group with HIV and in all histological types of cervical cancer.

The rates of p16 and Ki67 expressions were directly associated with the severity of cervical lesions but should be interpreted result with caution [7]. Therefore, p16 overexpression, identified by immunostaining or enzyme-linked immunosorbent assay, can be considered as a marker of HPV infection and of activated expression of viral oncogenes and virus-induced cell cycle deregulation [14, 21]. So, we observed significant difference between histological subgroups for Ki67, but only one subgroup



(well-differentiated squamous cell carcinoma) with significant difference for p16:  $49.2 \pm 4.7\%$  for non HIV and  $64.7 \pm 4.3\%$  for HIV ( $p < 0.05$ ). For moderately and poor differentiated squamous cell carcinoma difference of p16 expression was statistically unreliable. Such result must be evaluated carefully as there are data that meta-analysis of p16 overexpression could be associated with a favourable prognosis in patients with cervical cancer. Assessment of p16 expression could provide better prognostic information for patients with cervical cancer. Large scale, multicentre and well-matched cohort studies are warranted to clarify the prognostic effect of p16 expression on the outcome of cervical cancer [6]. Simultaneously such hesitation of p16 could be result of influence HPV infection in HIV group.

**Conclusion.** Proliferative activity in cervical squamous cancer in women with HIV infection is characterized higher level of Ki-67 with averaging level for all histological types of squamous cell carcinoma  $62.5 \pm 5.6\%$  that one and half more than in group without HIV. Depend of histological type, expression of Ki-67 increased from  $4.7 \pm 3.8\%$  in well-differentiated squamous cell carcinoma till  $89.2 \pm 5.1\%$  in poor differentiated squamous cell carcinoma for group with HIV ( $21.3 \pm 2.4\%$  till  $79.4 \pm 3.7\%$  in group without HIV accordingly).

This work should be regarded as a preliminary investigation, with promising results, which provides a strong motivation for increasing the research efforts in the quantitative analysis of the invasive squamous cell carcinoma in women with HIV.

*Conflict of Interest Statement.* The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## REFERENCES

1. Avwioro G. Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. JPCS, 2011, 1:24-34.
2. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, et al (2012). Role of Protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. J Oncol, 1-11.
3. Chirenje ZM. HIV and cancer of the cervix. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2005 Apr;19(2):269-76.
4. Dabbs D.J., Thompson L.D.R. Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications, Expert Consult: Online and Print, 4e 4th Edition, 2014, 960 p.
5. Grellier N, Quero L. [Cervical cancer: particularities in HIV patients]. Bull Cancer. 2014 Nov;101(11):1040-7. doi: 10.1684/bdc.2014.2034.
6. Huang K, Li LA, Meng YG, Fu XY. p16 expression in patients with cervical cancer and its prognostic significance: meta-analysis of published literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014 Dec;183:64-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.10.016. Epub 2014 Oct 24.
7. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(7):3201-6.
8. Krishnan A, Levine AM. Malignancies in women with HIV infection. Womens Health (Lond). 2008 Jul;4(4):357-68. doi: 10.2217/17455057.4.4.357.
9. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. Int J Cancer 2011;128:927-935.
10. Moskalenko R, Romanyuk A, Logvin A. Intrafollicular pressure of colloid thyroid gland determinate the type of folliculogenesis. Georgian Med News. 2012 Apr;(205):67-73.
11. Myers J.L.; Well A.D. (2003). Research Design and Statistical Analysis (2nd ed.). Lawrence Erlbaum. p. 508.
12. Netto GJ, Epstein JI. Theranostic and prognostic biomarkers: genomic applications in urological malignancies. Pathology. 2010 Jun;42(4):384-94. doi: 10.3109/00313021003779145.
13. Panjkovic M. Ki-67 expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix / M. Panjkovic, T. Ivkovic-Kapiclj // Arch. Oncol. – 2006. – Vol.14. – P. 23-25.
14. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, Aquino G, Pedicillo MC, Cagiano S, Campisi G, Rubini C, Papagerakis S, De Rosa G, Tornesello ML, Buonaguro FM, Staibano S, Bufo P. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. Infect Agent Cancer. 2012 Feb 29;7:4. doi: 10.1186/1750-9378-7-4.
15. Potapov S., Sidorenko R., Galata D., Stratiy N., Gargin V. Peculiarities of catenin activity in the embryonal testicular carcinoma. Georgian Med News. 2016 Dec;(261):65-70.
16. Romaniuk A., Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression. Diagnostic Pathology. 2015; 10(79).
17. Romaniuk A., Lyndin M., Moskalenko R., Kuzenko Ye., Gladchenko O., Lyndina Yu. Pathogenetic mechanisms of heavy metals effect on proapoptotic and proliferative potential of breast cancer. Interventional Medicine & Applied Science. 2015;7(2):63-67.
18. Romaniuk A., Piddubnyi A., Sikora V. Atypical progress of primary undiagnosed hepatoblastoma. Bangladesh Journal of Medical Science. 2016;15(2):292-296.
19. Scholzen T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown / T. Scholzen, J. Gerdes. – J Cell Physiol., 2000. – Mar: 182:311-22.
20. Shacklett BL, Greenblatt RM. Immune responses to HIV in the female reproductive tract, immunologic parallels with the gastrointestinal tract, and research implications. Am J Reprod Immunol. 2011 Mar;65(3):230-41. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00948.x. Epub 2011 Jan 12.
21. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. Biomed

Res Int. 2013;2013:519619. doi: 10.1155/2013/519619. Epub 2013 Dec 9.

22. Vinnik IuA, Gorbenko VN, Vas'ko AR, Kikhtenko EV, Gargin VV [Incidence of anaplastic tumor in structure of other histologic forms of the thyroid gland cancer]. Klin Khir. 2014 Jan;(1):32-4

23. Volgareva G. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells / G. Volgareva, L. Zavalishina, Y. Andreeva [et al.] // BMC Cancer. – 2004. – Vol.4, №1. – P. 51-58.

## SUMMARY

### PECULIARITIES OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CERVICAL SQUAMOUS CANCER IN HIV INFECTION

<sup>1</sup>Lytvynenko M., <sup>2</sup>Shkolnikov V., <sup>3</sup>Bocharova T., <sup>3</sup>Sychova L., <sup>3</sup>Gargin V.

<sup>1</sup>Odessa National Medical University; <sup>2</sup>Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University; <sup>3</sup>Kharkiv National Medical University, Ukraine

Patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection have a statistically significant increased risk of developing cervical cancer. The expression of the human Ki-67 protein is strictly associated with cell proliferation. The purpose of our work was detection of proliferative activity in cervical squamous cancer in women with HIV infection.

We investigated 24 cases (12 patients with HIV and 12 patients without HIV infection) of cervical carcinoma, where biopsy had been performed before the treatment. According to histopathological diagnoses, well-differentiated, moderately and poorly differentiated squamous cell carcinoma (7, 13 and 4 cases respectively) was determined. Mean age of women in the group with HIV infection was 32.7 years, and 38.2 years in the group without HIV infection. Detection of protein Ki-67 expression was performed with nuclear staining in the intermediate and superficial cells.

The results of this work show that proliferative activity of cervical squamous cancer in women with HIV infection is characterized by a higher level of Ki-67 with averaging level for all histological types of squamous cell carcinoma  $62.5 \pm 5.6\%$  that is one and half times higher than in group without HIV infection. Depending on a histological type, expression of Ki-67 has increased from  $4.7 \pm 3.8\%$  in well-differentiated squamous cell carcinoma up to  $89.2 \pm 5.1\%$  in poorly differentiated squamous cell carcinoma for group with HIV, and from  $21.3 \pm 2.4\%$  to  $79.4 \pm 3.7\%$  in group without HIV.

**Keywords:** cervical neoplasia, cancer, human immunodeficiency virus, proliferation, Ki67, p16.

## РЕЗЮМЕ

### ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup>Литвиненко М.В., <sup>2</sup>Школьников В.С., <sup>3</sup>Бочарова Т.В., <sup>3</sup>Сычева Л.В., <sup>3</sup>Гаргин В.В.

<sup>1</sup>Одесский национальный медицинский университет; <sup>2</sup>Винницкий национальный медицинский университет им. М.И. Пирогова; <sup>3</sup>Харьковский национальный медицинский университет, Украина

Пациентки, инфицированные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), имеют статистически значимый повышенный риск развития рака шейки матки. Экспрессия белка Ki-67 человека строго связана с пролиферацией клеток.

Целью исследования явилось определение пролиферативной активности у женщин с ВИЧ-инфекцией при цервикальном плоскоклеточном раке.

Наблюдались 24 женщины с карциномой шейки матки (12 - с ВИЧ и 12 - без ВИЧ-инфекции), у которых по результатам биопсии, взятой до лечения, гистопатологический диагноз соответствовал высоко, умеренно или низко дифференцированному плоскоклеточному раку (7, 13 и 4 случаев, соответственно). Средний возраст женщин составил  $32 \pm 0,7$  года в группе с ВИЧ-инфекцией и  $38 \pm 0,2$  года в группе без ВИЧ-инфекции.

Проведено иммуногистохимическое и гистологическое исследование полученного материала, определено значение показателей Ki-67.

Полученные данные обработаны с применением теста Манн-Уитни для статистического анализа, также высчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r). Уровень достоверности соответствовал  $p \leq 0,05$ .

Результаты проведенного исследования выявили пролиферативную активность при цервикальном плоскоклеточном раке у женщин с ВИЧ-инфекцией с более высоким уровнем Ki-67, средний уровень для всех гистологических типов плоскоклеточной карциномы составил  $62,5 \pm 5,6\%$ , что в полтора раза выше, чем в группе без ВИЧ. В зависимости от гистологического типа экспрессия Ki-67 увеличилась с  $4,7 \pm 3,8\%$  при высоко дифференцированной плоскоклеточной карциноме до  $89,2 \pm 5,1\%$  при низко дифференцированной плоскоклеточной карциноме для группы с ВИЧ, а в группе без ВИЧ эти показатели варьировали в пределах от  $21,3 \pm 2,4\%$  до  $79,4 \pm 3,7\%$  соответственно.

## რეზიუმე

საშვილოსნოს ყელის ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს პროლიფერაციული აქტივობის თავისებურებანი აივ-ინფექციის დროს

<sup>1</sup>მ. ლიტვინენკო, <sup>2</sup>ვ. შკოლნიკოვი, <sup>3</sup>ლ. ბოჩაროვა, <sup>3</sup>ლ. სიხოვა, <sup>3</sup>ვ. გარგინი

<sup>1</sup>ოდესის ნაციონალური სამედიცინო უნივერსიტეტი; <sup>2</sup>ვინიცის მ. პიროგოვის სახელობის ნაციონალური სამედიცინო უნივერსიტეტი; <sup>3</sup>ხარკოვის ნაციონალური სამედიცინო უნივერსიტეტი; უკრაინა

აივ-ინფიცირებულ პაციენტ ქალებს აქვთ საშვილოსნოს ყელის კიბოს განვითარების სტატისტიკურად სარწმუნოდ მომატებული რისკი. ცილა Ki-67-ის ექსპრესია მკაცრად დააკავშირებული უჯრედების პროლიფერაციასთან.

კვლევის მიზანს შეადგენდა პროლიფერაციული აქტივობის განსაზღვრა აივ-ინფექციის მქონე ქალებში ცერვიკული ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს დროს.

გამოკვლეულია 24 ქალი საშვილოსნოს ყელის კარცინომით (12 – აივ-ინფექციით, 12 – აივ-ინფექციის გარეშე), რომელთა ჰისტოპათოლოგიური დიაგნოზი, მკურნალობამდე აღებული ბიოფსიის შედეგების მიხედვით, შეესაბამებოდა

მაღალ-, საშუალო- ან დაბალდიფერენცირებულ ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს (7, 13 და 4 შემთხვევა, შესაბამისად). აივ-ინფექცირებულ ქალთა საშუალო ასაკი იყო  $32 \pm 0,7$  წელი, აივ-ინფექციის გარეშე -  $38 \pm 0,2$  წელი. მიღებული მასალა შესწავლილია იმუნოჰისტოქიმიურად და ჰისტოლოგიურად, განსაზღვრულია Ki-67-ის მაჩვენებლები. მიღებული მონაცემები სტატისტიკურად დამუშავებულია მან-უიტნის ტესტით, ასევე, გამოითვლებოდა სპირმენის კორელაციის რანჟირებული კოეფიციენტი (r). სარწმუნობის მაჩვენებელი შეადგენდა  $p \leq 0,05$ .

ჩატარებული კვლევის შედეგების საფუძველზე აივ-ინფექციის მქონე ქალებში ცერვიკული ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს დროს პროლიფერაციული აქტივობა გამოვლინდა Ki-67-ის უფრო მაღალი მაჩვენებლების შემთხვევაში; საშუალო მაჩვენებელი ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს ყველა ჰისტოლოგიური ტიპის დროს შეადგენდა  $62,5 \pm 5,6\%$ -ს, რაც ერთნახევარჯერ მეტია, ვიდრე ჯგუფში აივ-ინფექციის გარეშე. აივ-ინფიცირებულთა ჯგუფში Ki-67-ის ექსპრესია ჰისტოლოგიური ტიპის მიხედვით გაიზარდა  $4,7 \pm 3,8\%$ -დან (მაღალდიფერენცირებული ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს დროს)  $89,2 \pm 5,1\%$ -მდე (დაბალდიფერენცირებულ ბრტყელუჯრედოვანი კიბოს დროს). აივ-ინფექციის გარეშე კი ეს მაჩვენებლები ვარირებდა,  $21,3 \pm 2,4\%$ -დან  $79,4 \pm 3,7\%$ -მდე, შესაბამისად.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF APPENDIX CELL WALL INFILTRATE IN ACUTE PHLEGMONOUS APPENDICITIS

Kuyun L., Kurchenko I., Bisyuk Yu.

*Bogomolets National Medical University, Kyiv; Bukovinian State Medical University, Chernivtsi; National Medical University, Kiev, Ukraine Ukraine*

Appendicitis is a common pathological condition in surgery found in 8.9 [2] to 10 [4] patients per 10,000 people. It is associated with acute systematic and local inflammation [1,8].

Morphological examination of the appendix infiltrate in 200 patients with acute phlegmonous appendicitis has shown that lymphocytes prevail in the subserous membrane [3].

Cross-section examination of 71 patients has shown that increased active B-lymphocytes (HLA-DR+CD19) and T-lymphocytes ( $\alpha/\beta$  TCR and CD3/RA) content is a clear indicator of acute inflammation during appendicitis [5]. Another research has shown natural killer cells content in peripheral blood to be statistically lower in patients with perforation compared to those found in patients who did not have post-surgical exacerbation [6].

© GMN

Other sources lack data regarding immunohistochemical properties of the proliferative mucous infiltrate of the appendix during acute phlegmonous appendicitis, where the levels of expression of CD3, CD4, CD8, CD20, CD45, CD45R0, CD68, and Ki-67 positive cells are defined.

Objective: analyze the content of the mucous infiltrate of cells of the lamina propria of the appendix using immunohistochemical analysis in acute phlegmonous appendicitis patients.

**Materials and methods.** The research included 21 patients with acute phlegmonous appendicitis. The control group included 15 patients who did not exhibit the inflammation of the intraperitoneal cavity.

Histological samples were obtained from 21 patients in Kyiv municipal hospital #8. Appendix tissue was

placed into 10% neutral-buffered formalin for 18-24 hours. After that, tissue pieces were extracted. 3 slices 3-5 mm long were obtained by cross section in three places of the appendix: the base, the middle, and the tip. The samples were dehydrated using ethanol solutions of different concentrations and dipped in paraffin wax. Serial cross-section samples 4 mkm in width were produced using a rotatory microtome (Leica RM 2125 RT, Germany). The samples were placed on slides and colored using hematoxylin and eosinum (Merck, Germany) and on the SuperFrost Plus adhesive slides for further immunohistological research.

Primary murine monoclonal antibodies for Ki-67 (MIB-1 clone, ready to use, DAKO, Denmark), CD3 (F7.2.38 clone, ready to use, DAKO), CD4 (4B12 Clone, 1:60, DAKO), CD8 (C8/144B clone, ready to use, DAKO), CD20 (L26 clone, 1:200, DAKO), CD45 (2B11+PD7/26 clone, ready to use, DAKO), CD45R0 (UCHL1 clone, ready to use, DAKO), and CD68 (KP1 clone, ready to use, DAKO), and EnVision+ System-HRP (DAB) optical system were all used in the immunohistochemical (IHC) research.

For the purposes of IHC research, paraffin was removed from the sections by dipping the slides into two different containers with Tissue-Tek Tissue-Clear (Sakura, Japan) and three containers with 96% ethanol, consecutively. Then, washed in distilled water. Using a citrate buffer (pH 6.0), antigens were exposed to 121°C temperature for 8 minutes. The activity of endogenous peroxidase was blocked in 0.03% hydrogen peroxide solution for 6 minutes. Slides containing primary antibodies were incubated in a moisturizing camera for 30 minutes at room temperature. Concentrated primary antibodies were diluted using the Antibody Diluent (DAKO). The EnVision+ System-HRP (DAB) was used to view the histochemical reaction. The samples were additionally stained with Mayer's hematoxylin.

The Olympus BX51 (Japan) microscope was used to examine the histological samples. Quantitative evaluation of the parameters was obtained using microphotographs produced using a computer system which analyzed the images using Olympus DP-soft 3.2 at x200 resolution software for each image, a condenser aperture and intensive lighting with a completely exposed diaphragm. The images were analyzed using Image J, v.1.48 (National Institutes of Health, the USA) and Immunohistochemistry Image Analysis Toolbox and Cell Counter plug-ins.

Density of CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD45+, CD45R0+, and CD68+ cells of the mucous infiltrate of cells of the lamina propria of the appendix was measured using every histological slide and given in square mkm (Na, x1000mkm<sup>2</sup>) beyond the destruction site on 10 different fields. In order to evaluate proliferation, the index Ki-67 – percentage of Ki-67+ cells per 10 fields containing over 1000 cells.

The data obtained in the experiment was statistically processed using “Minitab 16” statistical software.

Further analysis of normality was conducted using Kolmogorov-Smirnov test to compare central tendencies of two independent samples using the U-Mann-Whitney criteria. Comparison of the two average independent samples for Student's criterion for abnormally and normally distributed samples respectively was conducted. Quantitative variables are presented as mean values and standard deviation (SD) or 95% confidence interval for normally distributed data, and the median with first (Q1) and third (Q3) quartile or 95% confidence intervals for abnormally distributed data.

Written consent was obtained from every patient and volunteer who took part in the study. The study was approved by a bioethics committee.

**Results and their discussion.** Histological changes in the appendix in patients with acute phlegmonous appendicitis are shown in Fig. 1.

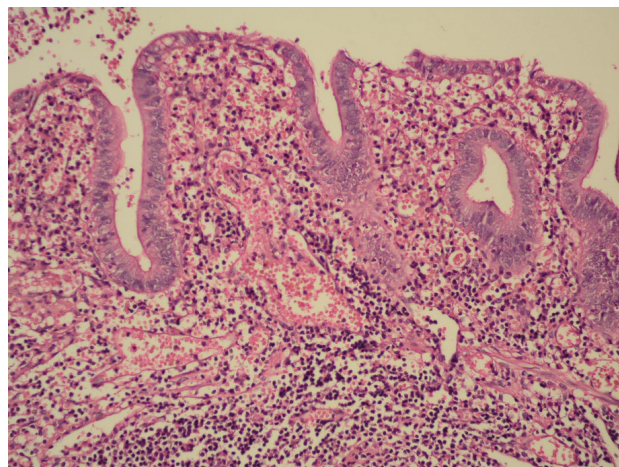


Fig. 1. Mucous membrane of cells of the lamina propria of the appendix beyond the destruction site. A. Stained with hematoxylin and eosinum (200x zoom)

Histological analysis has shown induration of appendix walls, unclear differentiation of layers of the mucous membrane highly infiltrated by mononuclear cells. The mucous membrane had erosion and ulcers. Lamina propria showed multiple small vessels obstructed by leukocytes.

Furthermore, circulation defects such as hyperemia of the vessels, stasis and sludge, local perivascular hemorrhage were observed. The indurated vessel walls contained fibrinous swelling.

Immunohistochemical characteristics of the mucous membrane of the lamina propria in the appendix are shown in Fig. 2.

Immunohistochemical research (Fig. 2) showed increased infiltration of CD3, CD4, CD8, CD20, CD45, CD68, CD45R0 positive cells in the mucous membrane of the lamina propria in the appendix. Also high proliferation level of the immune cells was confirmed through intensive staining with a Ki-67 marker.

Cell content in the inflammation infiltrate in the control group and in patients with acute phlegmonous appendicitis is shown in Table.

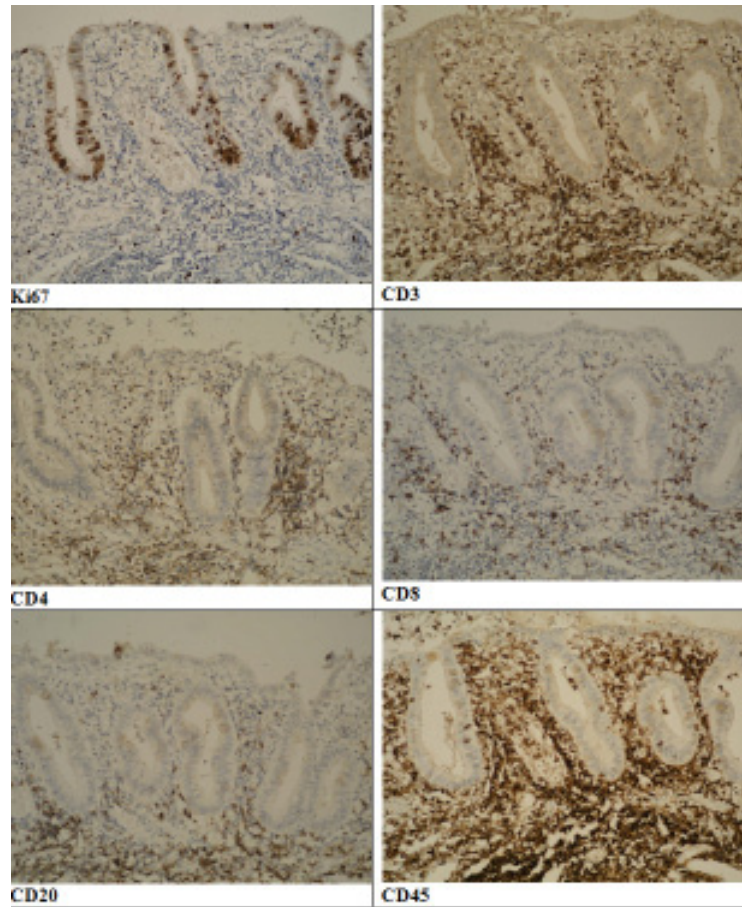


Fig. 2. Comparison immunohistochemical analysis of Ki-67, CD3, CD4, CD8, CD20, CD45, CD68, CD45R0 positive cells in patients with acute phlegmonous appendicitis. Immunoperoxidase method (200x zoom)

Table. Levels of cells of the inflammatory infiltrate of the mucous membrane of the lamina propria in the appendix and cecum (M±SD)

Parameters	Control, n=15	Peritonitis, n=21	P
Mononuclear cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	2.45±0.91	10.78±2.00	<0.001
Ki67+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	0.19±0.20	0.99±0.36	<0.001
Ki67 index (%)	1.36±0.36	8.51±2.30	<0.001
CD68+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	0.84±0.24	2.75±0.76	<0.001
CD45+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	7.92±1.50	10.45±1.76	<0.001
CD45R0+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	1.09±0.37	4.81±0.98	<0.001
CD3+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	2.07±0.29	4.20±0.85	<0.001
CD4+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	0.97±0.19	2.34±0.47	<0.001
CD8+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	0.74±0.16	1.79±0.36	<0.001
CD20+ cells (cells/1000 mkm <sup>2</sup> )	0.28±0.11	3.05±1.22	<0.001

note: P – differences in the test and control groups of patients

Statistical analysis (Table 1) points at severity of the acute inflammation on the local level. The number of the investigated cells in the inflammatory infiltrate was statistically higher ( $p < 0.001$ ) than then number of cells in the control group.

Comparative analysis of cells in the mucous membrane of the lamina propria in the appendix showed that infiltration level of B-lymphocytes (CD20+ cells) was 10.9 times higher, memory T-cells (CD45RO) was 4.4 times higher, Ki-67+ cells was 5.2 times higher, and macrophages (CD68) was 3.3 times higher than that in the control group. This group of cells showed the highest level of expression.

Comparatively lower content of T-lymphocytes infiltrated the mucous membrane of the lamina propria in the appendix. The number of T-lymphocytes (CD3) was 2 times higher, T-helper cells (CD4) was 2.4 times higher, and cytotoxic T-lymphocytes (CD8) was 2.4 times higher in compare to the control group.

The number of CD45 positive lymphocytes that infiltrated the mucous membrane was 1.3 times higher than that of the control group, and was the lowest in compare to others cells.

In a study to research the migration of T-lymphocytes from the blood into the inflammatory appendix, it was shown that memory T cells (CD45RO) had the highest selectivity for infiltration of the mucous membrane [10].

The research of B-lymphocytes has shown that CD19+DR+ and CD19+ cell level was statistically higher ( $p < 0.001$ ) in the inflamed appendix compared to their content in the peripheral blood. The content of these cells in the blood was statistically lower during appendectomy. Also this research has shown that determining B-lymphocytes content is more informative for diagnosis than the content of T-lymphocytes [7].

Similar results were obtained in another study. As the result of a comparative analysis of cellular content in both uninflamed and inflamed mucous membrane of the lamina propria in the appendix, the inflamed appendix had high content of B1-lymphocytes [9].

Our study has shown that acute local inflammation of the lamina propria in the appendix is associated with increased infiltration of the mucous membrane by B-lymphocytes, macrophages, and memory T-cells, as well as active proliferation of mononuclear cells. These findings serve as helpful diagnostic criteria for acute phlegmonous appendicitis.

#### Conclusions.

1. The study has shown that acute phlegmonous appendicitis is characterized by statistically reliable increased infiltration ( $p < 0.001$ ) by B-lymphocytes (CD20), memory T-cells (CD45RO), Ki-67+ cells, macrophages (CD68), T-lymphocytes (CD3), T-helper cells (CD4), cytotoxic T-lymphocytes (CD8), and CD45 cells of the lamina propria of the appendix when compared with the control group.
2. Development of acute phlegmonous appendicitis is characterized by enhance infiltration of the lamina propria by B-lymphocytes (CD20), macrophages (CD68), memory T-cells, and high proliferation activity of the mononuclear cells (Ki-67 index).

## REFERENCES

1. Beltrán MA. The Systemic Inflammatory Response in Patients with Appendicitis: a Progressive Phenomenon. // *Indian J Surg.* 2015;77(Suppl 3):1050-6.
2. Ceresoli M, Zucchi A, Allievi N. Acute appendicitis: Epidemiology, treatment and outcomes- analysis of 16544 consecutive cases. // *World Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2016; 8(10):693-699.
3. Ciani S, Chuaqui B. Histological features of resolving acute, non-complicated phlegmonous appendicitis. // *Pathol Res Pract.* 2000; 196(2):89-93.
4. Flum DR, Koepsell TD. The clinical and economic correlates of misdiagnosed appendicitis: nationwide analysis. // *Arch Surg.* 2002; 137:799-804.
5. Gholi Mezerji NM, Rafeie M, Shayan Z, Mosayebi G. The Diagnostic Value of Surface Markers in Acute Appendicitis; A Diagnostic Accuracy Study. // *Bull Emerg Trauma.* 2015;3(2):65-9.
6. Kuga T, Taniguchi S, Inoue T, Zempo N, Esato K. Immunocytochemical analysis of cellular infiltrates in human appendicitis. // *Surg Today.* 2000; 30(12):1083-8.
7. Mosayebi G, Alizadeh SA, Alasti A, Amouzandeh Nobaveh A, Ghazavi A, Okhovat M, Rafei M. Is CD19 an immunological diagnostic marker for acute appendicitis? // *Iran J Immunol.* 2013; 10(4):216-28.
8. de Oliveira Machado SL, Bagatini MD, da Costa P, Baldissarelli J, Reichert KP, de Oliveira LS, Lemos JG, Duarte T, Chitolina Schetinger MR, Morsch VM. Evaluation of mediators of oxidative stress and inflammation in patients with acute appendicitis. // *Biomarkers.* 2016; 21(6):530-7.
9. Somekh E, Serour F, Gorenstein A, Vohl M, Lehman D. Phenotypic pattern of B cells in the appendix: reduced intensity of CD19 expression. // *Immunobiology.* 2000; 201(3-4):461-9.
10. Soo KS, Michie CA, Baker SR, Wyllie JH, Beverley PC. Selective recruitment of lymphocyte subsets to the inflamed appendix. // *Clin Exp Immunol.* 1995; 100(1):133-8.

## SUMMARY

### IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF APPENDIX CELL WALL INFILTRATE IN ACUTE PHLEGMONOUS APPENDICITIS

Kuyun L., Kurchenko I., Bisyuk Yu.

*Bogomolets National Medical University, Kyiv; Bukovinian State Medical University, Chernivtsi; National Medical University, Kiev, Ukraine Ukraine*

The purpose of the study was to analyze the content of the mucous infiltrate of cells of the lamina propria of the appendix using immunohistochemical analysis in patients with acute phlegmonous appendicitis.

The research included 21 patients with acute phlegmonous appendicitis. The control group consisted of 15 persons lacking the inflammation of the intraperitoneal

cavity. Primary monoclonal (MC) antibodies (AB) of the mouse used in the immunohistochemical (IHC) research included the following: Ki-67, CD3, CD4, CD8, CD20, CD45, CD45R0, and CD68 (DAKO, Denmark), as well as EnVision+ System-HRP (DAB) optical system.

The research has shown that acute phlegmonous appendicitis is characterized by statistically reliable increased infiltration ( $p < 0.001$ ) by B-lymphocytes (CD20), memory T-cells (CD45R0), Ki-67+ cells, macrophages (CD68), T-lymphocytes (CD3), T-helper cells (CD4), cytotoxic T-lymphocytes (CD8), and CD45 cells of the lamina propria of the appendix when compared with the control group. Development of acute phlegmonous appendicitis is characterized by enhance infiltration of the lamina propria by B-lymphocytes (CD20), macrophages (CD68), memory T-cells, and high proliferation activity of the mononuclear cells (Ki-67 index).

**Keywords:** appendicitis, cellular infiltrate, immunohistochemistry, local immunity.

## РЕЗЮМЕ

### ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА ЧЕРВЕОБРАЗНОГО ОТРОСТКА ПРИ ОСТРОМ ФЛЕГМОНОЗНОМ АППЕНДИЦИТЕ

Куюн Л.А., Курченко И.Ф., Бисюк Ю.А.

*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев; Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы; Национальный медицинский университет, Киев Украина*

Целью исследования явился анализ клеточного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки червеобразного отростка с использованием иммуногистохимического анализа у больных острым флегмонозным аппендицитом.

Исследование проведено на материале, полученном от 21 пациента с острым флегмонозным аппендицитом. Группу контроля составили 15 больных, у которых не выявлено воспаления брюшной полости. Гистологические образцы получены от 21 больного, которые прооперированы в Киевской городской клинической больнице №8. Операционный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 18-24 часов. Исследование материала проводили после фиксации. Из фиксированной ткани удаленного аппендикса исследования проводились на образцах, взятых из трех зон: основы, верхушки и средней части аппендикса в поперечном срезе и использовались 3 образца толщиной 3-5 мм. Иммуногистохимические исследования проводили с использованием первичных моноклональных антител мыши к Ki-67.

Определяли количественную плотность CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD45, CD45R0+ и CD68+ клеток в

собственной пластинке слизистой оболочки аппендикса в единице площади образца ( $N_a$ ,  $\times 1000$  мкм<sup>2</sup>). Для оценки пролиферативной активности рассчитывали индекс Ki-67.

Все результаты подвержены статистической обработке с использованием параметрических и непараметрических методов.

В результате исследования установлено, что при остром флегмонозном аппендиците наблюдается достоверное увеличение ( $p < 0,001$ ) инфильтрации В-лимфоцитами (CD20), Т-клетками памяти (CD45R0), Ki-67+ клетками, макрофагами (CD68), общими Т-лимфоцитами (CD3), Т-хелперами (CD4), цитотоксичными Т-лимфоцитами (CD8) и CD45 клетками собственной пластинки слизистой оболочки аппендикса по сравнению с контролем.

## რეზიუმე

ფირფიტაში უჯრედოვანი ინფილტრატის ანალიზი ჰისტოქიმიური მეთოდის გამოყენებით ავადმყოფებში ფლეგმონოზური აპენდიციტით

ლ. კუიუნი, ი. კურჩენკო, იუ. ბისიუკი

ა. ბოგომოლცის სახ. ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, კიევი; ბუკოვინის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ჩერნოვცი; ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, კიევი უკრაინა

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ჭიანჭაწლავის ლორწოვანი გარსის ფირფიტის უჯრედოვანი ინფილტრატის ანალიზი ჰისტოქიმიური მეთოდის გამოყენებით ავადმყოფებში ფლეგმონოზური აპენდიციტით.

კვლევა განხორციელდა მასალაზე, რომელიც მიღებული იყო 21 ავადმყოფიდან მწვავე ფლეგმონოზური აპენდიციტით. საკონტროლო ჯგუფი შეადგინა 15 ავადმყოფმა, რომელთაც არ ჰქონდათ მუცლის ღრუს ანთება. 21 პაციენტისაგან, რომლებსაც ოპერაცია ჩატარდათ კიევის კლინიკურ საავადმყოფოში, აღებული იყო ჰისტოლოგიური სინჯები. აღებული მასალა ფიქსირებული იყო ნეიტრალური ბუფერული ფორმალინის 10% ხსნარში 18-24 საათით. მასალის გამოკვლევა ხდებოდა ფიქსაციის შემდეგ ამოკვეთილი აპენდიქსის ფიქსირებული ქსოვილიდან აღებულ ნიმუშებზე, რომლებიც აღებული იყო აპენდიქსის სამი ზონიდან (ფუძე, წვეტი და საშუალო ნაწილი) განივ კვეთში. გამოყენებული იყო 3-5 მმ სისქის ნიმუში. იმუნოჰისტოქიმიური (იჰქ) კვლევა ჩატარდა თავის პირველადი მონოკლონური ანტისხეულების Ki-67 მიმართ გამოყენებით.

განისაზღვრა CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD45, CD45R0+ და CD68+ უჯრედების რაოდენობრივი სიმკვრივე აპენდიქსის ლორწოვანი გარსის საკუთარ ფირფიტაში, ნიმუშის ფართობის ერთეულში ( $N_a$ ,  $\times 1000$  მკმ<sup>2</sup>). პროლიფერაციული

აქტივობის შეფასების მიზნით ხდებოდა Ki-67 ინდექსის გამოთვლა. შედეგები სტატისტიკურად დამუშავდა კვლევის პარამეტრული და არაპარამეტრული მეთოდების გამოყენებით.

ჩატარებული კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ მწვავე ფლემონოზური აპენდიციტის დროს აღინიშნება ჭიანჭლის ლორწოვანი

გარსის ფირფიტის ინფილტრაციის სარწმუნო მატება ( $p < 0,001$ ) B-ლიმფოციტების (CD20), მასსოვრობის T-უჯრედების (CD45R0), Ki-67+ უჯრედების, მაკროფაგების (CD68), საერთო T-ლიმფოციტების (CD3), T-ჰელპერების (CD4), ციტოტოქსიკური T-ლიმფოციტებით (CD8) და CD45 უჯრედების მეშვეობით.

---

## A NEW APPROACH TO KERATOCONUS DIAGNOSTICS USING MATRIX METALLOPROTEINASE-9 MARKER

<sup>1</sup>Zilfyan A., <sup>2</sup>Abovyan A.

<sup>1</sup>“Shengavit” Medical Center, Center of Lazer Correction of Vision and Eye Microsurgery, Yerevan;

<sup>2</sup>Yerevan State Medical University after M. Heratsi: Republic of Armenia

Keratoconus is a corneal disease pertaining to the group of ectasias. It usually begins during the second decade of life and results in the constant thinning of the stroma by degradation of collagenous fibers. The reshaping of the cornea to the conical form leads to irregular astigmatism or to myopia and lowers visual acuity [4,19]. While there is a lack of reliable information on the prevalence of keratoconus, especially in endemic regions, according to different studies, the estimated prevalence of keratoconus in the general population is from 8.8 to 54 per 100,000 [3,7,16]. In spite of numerous studies, the exact mechanism of the disease development remains unknown. Consequently, no drugs or other therapeutic methods have been identified to cure the disease. Current treatment consists of surgical methods, such as crosslinking, ICRS insertion and keratoplastics. Nowadays, keratoconus is considered to be a multifactorial disorder, caused by a combination of both genetic and environmental factors [1-3,6,8]. Some recent studies have indicated that both degenerative and inflammatory factors play active roles in pathogenesis of keratoconus. In particular, IL-6 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) take crucial part in disease development [5,10,17]. Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteins that induce the breakdown of extracellular matrixes in physiological processes, such as reproduction and tissue remodeling, as well as in pathological processes, such as arthritis and cancer [14]. MMP-9 (or gelatinase B) is an enzyme that belongs to the metalloproteinases family. It is produced by the human corneal epithelium and regulated by a series of inflammatory cytokines. The main function of MMP-9 is to break down denaturated collagen [15]. Currently, elevated levels of MMP-9 play important role in pathogenesis of dry eye syndrome and are used to diagnose it [9,11,13,18]. In addition, some studies show that elevated

levels of MMP [20] and, particularly, MMP-9, are risk factors for primary open angle glaucoma [12]. This study aims to test the association of keratoconus with elevated MMP-9 levels in lacrimal fluid. The research questions are following:

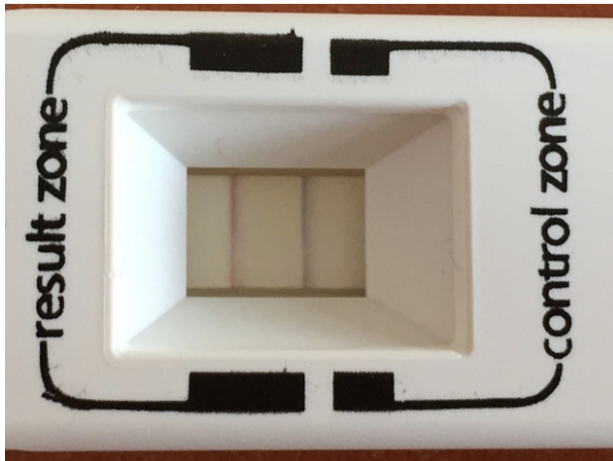
- Is there any association of elevated level of MMP-9 with the first, second, or third stages of keratoconus?

- Is there any association of elevated levels of MMP-9 with subclinical keratoconus?

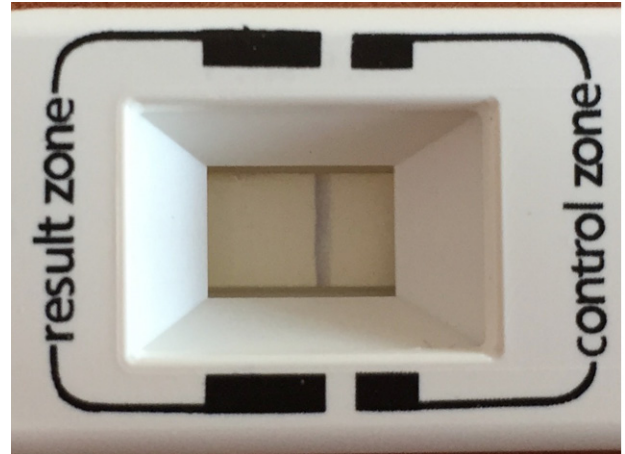
**Material and methods.** A controlled cross-sectional study was conducted from January 2016 to March 2017. It took place in the “Shengavit” Medical Center in Yerevan, Armenia. The study procedures were performed in standard examination rooms. The patients were examined as they attended the clinic; this method approximated random sampling. Neither the researcher nor the patients were aware to which group the patients belonged. All study participants were informed about the study and gave their consent. Ninety patients were examined, 60 of who suffered from keratoconus of different severities (from subclinical to the third stage) and 30 of who had no ocular pathology (control group). In total, three groups of study participants were distinguished: thirty patients without any ocular pathology, as a control group (I group); thirty patients with subclinical keratoconus (II group); thirty patients in the first, second, and third stages of keratoconus (III group)

The sample size was decided based on availability of resources and taken so that the number of patients in each group to be equal. The inclusion criterion for the I (control) group was absence of any eye disease, based on the results of posterior corneal topography (back elevation  $< 10$ ), anterior corneal topography (anterior curvature  $\leq 43$ ) and pachymetry (corneal thickness  $\geq 520$ ). The reason for exclusion was, respectively, a diagnosis of any ocu-





Pic. 1. Positive result



Pic. 2. Negative result

lar disease. The inclusion criterion for II group was the diagnosis of subclinical keratoconus based on posterior corneal topography where the back elevation was 15-18, anterior corneal topography (anterior curvature 44-45), and pachymetry (corneal thickness 410-455). The exclusion criteria in the second group were clinically evident keratoconus (back elevation >20 and corneal thickness <400 micron) or presence of any other eye disease. The inclusion criterion for III group was the diagnosis of keratoconus in the first, second, or third stages based on posterior corneal topography where the back elevation was more than 20, anterior corneal topography (anterior curvature  $\geq 46$ ), and pachymetry where the corneal thickness was less than 430 micron. The exclusion criteria for this group were the diagnosis of subclinical keratoconus or any other eye disease. The study was carried out using an immunochromatographic test, which consists of a simple in-vitro diagnostic kit for detecting an antigen in a sample solution, utilizing a specific reactivity of an antibody. No any eye drops were used before the test. The test is performed with the help of a small linear applicator with a filter paper on its tip, which is used to touch the lower palpebral conjunctiva in six to eight different places. This is how a sample tear is collected. The linear applicator is placed on the second component with its tip dipped in a buffer solution for 20 seconds. The results are visible after 10 minutes. This test is easy to perform, fast, cheap, and sensitive, even

in the early stages of keratoconus. In addition, it does not require a qualified medical education to perform it, nor is it an invasive procedure. Nevertheless, the approval of the country's Research Ethics Committee (REC) has been obtained prior to the study's implementation. Blue control line tells that the test is performed correctly. Presence of the other line (from pink to red) indicates a high level of MMP-9 (Picture 1), while its absence shows it is within normal range (Picture 2). The test is performed while the patient is sitting without any invasive interventions. The procedure is painless and, therefore, carried out without any anesthetics. Besides the above-mentioned test, a Schirmer's test was performed on all patients.

**Results and their discussion.** In the I group, only one eye had an elevated level of MMP-9, while in the remaining 29 eyes, the MMP-9 test was negative (3.33% and 96.67%, respectively). The Schirmer's test in the control group was positive in 4 eyes and negative in 26 (13.33% and 86.67%, respectively). In the II group, positive results were registered in 25 eyes, while negative results were found in 5 (83.33% and 16.67%, respectively). The Schirmer's test was positive in 7 eyes and negative in 23 (23.33% and 76.67%, respectively). In the III group, positive results were found in 27 eyes and negative results were observed in 3 (90% and 10%, respectively). The Schirmer's test was positive in 21 eyes and negative in 9 (70% and 30%, respectively).

Table. Parameters of cornea in the first, second and third groups of patients

Study groups	Indices		
	Anterior curvature	Back elevation	Pachymetry
I group (control group)	41.8 +/- 0.95	5.1+/-2.88	540.4+/-14.01
II group (group with sub-clinical keratoconus)	44.5+/-0.36 $0.01 > P_1 > 0.005$	16.7+/-1.18 $0.005 > P_1 > 0.0005$	431.2+/-22.8 $P_1 < 0.0005$
III group (group with obvious keratoconus)	48.95+/-1.98 $0.005 > P_1 > 0.0005$ $0.025 > P_2 > 0.01$	38.5+/-9.42 $0.005 > P_1 > 0.0005$ $0.025 > P_2 > 0.01$	396.3+/-35.8 $0.005 > P_1 > 0.0005$ $0.25 > P_2 > 0.1$

note:  $P_1$  – ratio of II and III groups indices to the index of the I group;

$P_2$  – ratio of III group index to the index of the I group

Structural parameters of cornea are presented in Table. The table shows that the patients with subclinical keratoconus (II group) and obvious keratoconus (III group) have relatively high numbers of anterior curvature as compared to the control group (I group). Similar patterns are observed after measurement of corneal back elevation. The patients with subclinical keratoconus (II group) have 3.3 times higher indices of back elevation in comparison with control group (I group) and the patients with obvious keratoconus (III group) have the highest indices of back elevation (7.5 times higher than I group and 2.3 times higher than II group). The results of pachymetry of II and III groups are close to each other. They show that corneas are relatively thinner in patients from II and III groups in comparison to the first group.

**Conclusion.** Very few studies were focused on association of keratoconus with MMP-9 level [8,12]. However, none of them considered different stages of keratoconus. This study is unique, because it tested the association of both obvious and subclinical keratoconus with elevated MMP-9 level. The results of this study demonstrate that the tear fluids in patients with the first to third stages of keratoconus and subclinical keratoconus contain elevated levels of MMP-9, as compared to the control group. Consequently, the detection of MMP-9 in tear fluid can be a new possible method of keratoconus diagnosis.

**Acknowledgements.** We would like to thank Shengavit Medical Center for the financial support of the study. We also express our gratitude to Zilfyan A.V. and Avakyan S. A. for their help with statistical analysis.

## REFERENCES

1. Abu-Amero K, Al-Muammar A, Kondkar A. Genetics of keratoconus // *J Ophthalmol*. 2014; 641-708.
2. Bawazeer A, Hodge W, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis // *Br J Ophthalmol* 2000; 84:834-836.
3. Dorota M, Nowak and Marzena Gajicka, The Genetics of Keratoconus // *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2011 Jan-Mar; 18(1): 2-6.
4. Espandar L, Meyer J, Keratoconus: Overview and Update on Treatment // *Middle East Afr J Ophthalmol*. - 2010 Jan-Mar; 17(1): 15-20.
5. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: An Inflammatory Disorder. // *Eye* 2015; 29(7):843-859.
6. Ghazaryan E. Elevation of matrix metalloproteinase-9 ferment in tear films of keratoconus patients // *Вопросы теоретической и клинической медицины. Научно-практический журнал*. - 2016. - Том 19, N 4 (107).
7. Gokhale N. Epidemiology of keratoconus. *Indian journal of ophthalmology*, 2013 - ncbi.nlm.nih.gov
8. Karolak J, Gajicka M. Genomic strategies to understand causes of keratoconus // *Mol Genet Genomics*, 2016 Dec 28.
9. Kaufman H., The practical detection of MMP-9 diagnoses ocular surface disease and may help prevent its complications // *CORNEA*. – 2013. - No 2, Vol. 32.
10. Lema I, Sobrino T, Durán J, Brea D, Díez-Feijoo E.

Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears*, 2009 - bjo.bmj.com

11. Luo L, Li D, Doshi A, Farley W, Corrales R, Pflugfelder S. Experimental Dry Eye Stimulates Production of Inflammatory Cytokines and MMP-9 and Activates MAPK Signaling Pathways on the Ocular Surface // *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004, Vol.45, 4293-4301.
12. Markiewicz L, Pytel D, Mucha B, Szymanek K, Szaflik J, Szaflik J, Majsterek I. Altered Expression Levels of MMP1, MMP9, MMP12, TIMP1, and IL-1 as a Risk Factor for the Elevated IOP and Optic Nerve Head Damage in the Primary Open-Angle Glaucoma Patients // *BioMed Research International*. 2015 Article ID 812503, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/812503>
13. Messmer E, von Lindenfels V, Garbe A, Kampik A. Matrix Metalloproteinase 9 Testing in Dry Eye Disease Using a Commercially Available Point-of-Care Immunoassay // *Ophthalmology* 2016; 123(11): 2300-2308.
14. MMP9 matrix metalloproteinase 9 [*Homo sapiens* (human)] Gene ID: 4318, updated on 19-Jan-2017, NCBI.
15. Nelidova D, Sherwin T. Keratoconus Layer by Layer – Pathology and Matrix Metalloproteinases, Dr Shimon Rumelt (Ed.), 2012. InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books>
16. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn J. Keratoconus: A review. *British Contact Lens Association*. Elsevier Ltd.: 2010.
17. Shetty R, Ghosh A, Lim R, Subramani M, Mihir K, Reshma A, Ranganath A, Nagaraj S, Nuijts R, Beuerman R, Shetty R, Das D, Chaurasia S, Sinha-Roy A, Ghosh A. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56(2):738-50.
18. Stevenson W, Chauhan S, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder // *Arch Ophthalmol*. 2012 Jan; 130(1): 90-100.
19. Vazirani J, Basu S. Keratoconus: current perspectives // *Clin Ophthalmol*. - 2013; 7: 2019-2030. Published online 2013 Oct 14.
20. Yan X, Tezel G, Wax M. et al Matrix Metalloproteinases and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Glaucomatous Optic Nerve Head // *Arch Ophthalmol*. 2000; 118(5):666-673.

## SUMMARY

### A NEW APPROACH TO KERATOCONUS DIAGNOSTICS USING MATRIX METALLOPROTEINASE-9 MARKER

<sup>1</sup>Zilfyan A., <sup>2</sup>Abovyan A.

<sup>1</sup>“Shengavit” Medical Center, Center of Lazer Correction of Vision and Eye Microsurgery, Yerevan; <sup>2</sup>Yerevan State Medical University after M. Heratsi: Republic of Armenia

In spite of numerous studies, the exact mechanism of the keratoconus development remains unknown. Nowa-

days, it is considered to be a multifactorial disorder, caused by a combination of both genetic and environmental factors. Some recent studies have indicated that IL-6 and matrix metalloproteinase-9 take crucial part in disease development. The study aims to test the association of keratoconus with elevated Matrix Metalloproteinase-9 levels in the lacrimal fluid of patients. In controlled, cross-sectional, double-masked study, the patients were examined as they attended the clinic; this method approximated random sampling. The study took place in "Shengavit" Medical Center (Yerevan). The study procedures were carried out in a standard examination room. The level of Matrix Metalloproteinase-9 was assessed using immunochromatographic analyses. In addition, a Shirmer's test was performed on all patients. In total, 90 patients (one eye of every patient) were examined. Three groups were distinguished: I (control) group - patients without any ocular pathology (n=30); II - patients with subclinical keratoconus (n=30); III - patients in the first, second, and third stages of keratoconus (n=30). In the third group (patients with obvious keratoconus), elevated levels of Matrix Metalloproteinase-9 were observed in 27 out of 30 eyes (90%). In the second group (patients with subclinical keratoconus), high levels of Matrix Metalloproteinase-9 were observed in 25 out of 30 eyes (83.33%). In the control group, only one eye out of 30 had an elevated level of Matrix Metalloproteinase-9 (3.33%). The results of the study demonstrate that the tear fluids of patients in the first to third stages of keratoconus or with subclinical keratoconus contain elevated levels of Matrix Metalloproteinase-9 as compared to the control group. Consequently, the detection of Matrix Metalloproteinase-9 in tear fluid can be used in the diagnostics of keratoconus.

**Keywords:** Matrix Metalloproteinase-9; keratoconus diagnostics; MMP-9 in keratoconus diagnostics.

## РЕЗЮМЕ

### НОВЫЙ ПОДХОД В ДИАГНОСТИКЕ КЕРАТОКОНУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9

Абовян А.А., Зильфян А.А.

*Медицинский центр «Шенгавит», Центр лазерной коррекции зрения и микрохирургии глаза, Ереван, Республика Армения*

Целью данного исследования явилось определение взаимосвязи наличия кератоконуса с повышенным содержанием матриксной металлопротеиназы-9 в слезной жидкости.

В период дважды замаскированного перекрестного исследования при наличии контрольной группы пациенты обследовались по мере обращения в клинику (данный метод выборки приближается к случайной). Исследование проводилось в медицинском

центре «Шенгавит» (Ереван). Процедура обследования пациентов проводилась в стандартном смотровом кабинете. Уровень матриксной металлопротеиназы-9 определен посредством иммунохроматографического анализа. Кроме того, всем пациентам поставлен тест Ширмера. Обследованы 90 пациентов (один глаз каждого пациента), которые были распределены в 3 группы: I (контрольная) группа - пациенты без какой-либо глазной патологии (n=30); II - пациенты с субклинической формой кератоконуса (n=30); III - пациенты с первой, второй и третьей стадией кератоконуса (n=30).

У пациентов III группы высокий уровень матриксной металлопротеиназы-9 выявлен у 27 (90%) из 30 пациентов; во II группе - у 25 (83,33%); в контрольной группе только один (3,33%) пациент из 30 имел повышенное содержание матриксной металлопротеиназы-9 в слезной жидкости.

Результаты исследования показали, что слезная жидкость у пациентов с первой по третью стадию кератоконуса, а также с субклиническим кератоконусом содержит повышенный уровень матриксной металлопротеиназы-9 в сравнении с контрольной группой. Следовательно, определение матриксной металлопротеиназы-9 в слезной жидкости может быть включено в методический арсенал для диагностики кератоконуса.

## რეზიუმე

ახალი მიდგომა კერატოკონუსის დიაგნოსტიკაში მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის გამოყენებით

ა. აბოვიანი, ა. ზილფიანი

სამედიცინო ცენტრი "შენგავიტი", მხედველობის ლაზერული კორექციისა და თვალის მიკროქირურგიის ცენტრი, ერევანი, სომხეთის რესპუბლიკა

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა კერატოკონუსის კავშირის შეფასება მატრიქსული მეტალო-პროტეინაზა-9-ის შემცველობასთან საცრემლე სითხეში.

ორმაგი ბრმა ჯვარდინი კვლევით, საკონტროლო ჯგუფის არსებობის პარალელურად, გამოკვლეულია პაციენტები მათი მომართვის შესაბამისად (შერჩევის ასეთი ჯგუფი უახლოვდება შემთხვევითს). კვლევა ტარდებოდა სამედიცინო ცენტრში "შენგავიტი" (ერევანი). პაციენტების გამოკვლევა მიმდინარეობდა სტანდარტულ დასათვალისწინებელ კაბინეტში. მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის დონე განისაზღვრებოდა იმუნოქრომატოგრაფიული ანალიზის მეთოდით. ამას გარდა, ყველა პაციენტს ჩატარდა შირმერის ტესტი. სულ გამოკვლეულია 90 პაციენტი (თითოეული პაციენტის ერთი თვალი), რომლებიც დაიყო სამ ჯგუფად: I - 30

პაციენტი თვალის რაიმე პათოლოგიის გარეშე (საკონტროლო ჯგუფი), II - 30 პაციენტი კერატოკონუსის სუბკლინიკური ფორმით, III - 30 პაციენტი კერატოკონუსის I,II და III სტადიით.

III ჯგუფში (გამოხატული კერატოკონუსით) მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის მაღალი დონე დაუდგინდა 27 (90%) პაციენტს. II ჯგუფში (სუბკლინიკური კერატოკონუსით) მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის მაღალი დონე დაუდგინდა 25 (83,3%) პაციენტს. საკონტროლო ჯგუფში მხოლოდ ერთ (3,3%) პაციენტს

ჰქონდა მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის მომატებული მაჩვენებელი.

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ პაციენტებში კერატოკონუსის I-III სტადიით, ასევე, სუბკლინიკური კერატოკონუსით, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, მომატებულია მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის დონე საცრემლე სითხეში. შესაბამისად, საცრემლე სითხეში მატრიქსული მეტალოპროტეინაზა-9-ის განსაზღვრა შესაძლოა ჩართულ იქნას კერატოკონუსის სადიაგნოსტიკო მეთოდთა არსენალში.

## ANALYSIS OF THE LONG-TERM CLINICAL RESULTS OF USING 940 $\mu\text{m}$ DIODE LASER IN PATIENTS WITH GENERALIZED MODERATE CHRONIC PERIODONTITIS

Cherepynska Yu., Volkova O., Riabokon E., Baglyk T.

*Kharkiv National Medical University, Ukraine*

Etiology of infectious periodontitis caused by strains of periodontopathogenic bacteria that included in subgingival biofilm was described in detail by numerous studies [17]. Anti-infective periodontal therapy is based on two aspects: 1) thorough removal of microbial associations on periodontal pockets surfaces and creating optimal conditioning for healing of periodontal wound [7-9]. Numerous studies have evidenced that mechanical and electro-mechanical destruction of biofilm does not eliminate the periodontopathogenic bacteria, since bacteria can survive both in depth of root cement, in surrounding soft tissues, and into dentinal tubules, which in some cases leads to recurrence of disease. Nowadays, a growing number of international reports evidences resistance of bacterial strains was becoming progressively to frequent doses of antibiotics, wherein incidence of fungal infection has increased significantly in recent years, and there is a tendency will be aggravated [19]. Tissue affected by biofilm unable to progress from granulation stage, seeking healing, to remodeling stage [10]. Thus, such tissue area is represented by chronic wound filled with biofilm [13], which will be advanced without treatment forming lesions of destruction and making systemic effects on the patient's health. Diode laser does not interact with hard tooth tissues; this fact makes it convenient for various medical manipulations in soft tissues surrounding the teeth, and makes diode exposure as safe as possible for hard tooth tissues [11]. Laser treatment simultaneously can provide multiple therapeutic effect: *photobactericidal* [1,15,18,20] and *photothermal disinfection* [14,16] of the periodontal pocket walls, *photobiostimulation* [3,12] effect on healing process; also it allows to implement a number of additional manipulations; de-epithelialization, degranulation, gingi-

vectomy, gingivoplasty and frenectomy. Laser energy helps to seal the capillaries and lymphatic vessels, reduce edema in the treatment site, often minimize postoperative patient discomfort [2], and stimulate healing at the cellular level [6]. In others studies also concluded that effect of diode laser promotes healing of periodontal pockets [4]. Studies of molecular-biological analysis by Gojkov-Vukelic et al. point to a more prolonged reduction of periodontopathogenic bacteria with additional use of diode laser compared to the control group [5]. The above provisions encourage to study of diode laser effects on periodontal tissue as an additional method of treatment in patients with chronic generalized periodontitis for the simple reason that conventional methods of non-surgical periodontal therapy are limited with mechanical and pharmacological (drug) effects on periodontal tissues. Additional use of diode laser technologies in such pathology treatment allows spreading the range of effect on the affected soft tissue areas, to reduce significantly drug burden, and to create optimal conditions of periodontal pocket healing.

The aim of this study is clinical research of level in clinical attachment loss (CAL), probing of periodontal pockets depths (PPD) and bleeding index (BoP) during combine therapy of patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity when using a diode laser at 940  $\mu\text{m}$ .

**Material and methods.** The study was conducted at the University Dental Center of Kharkiv National Medical University during period from 2013 to 2016, and involved 30 patients from them 17 men (56,6 %), and 13 women (43,4 %) aged 35-44 (mean age 40.3 years old) with diagnosed generalized moderate chronic periodontitis (GMCP); the subjects were divided into three equal

Table 1. Baseline demographic parameters

Group Contingent		Control group (CG)	1 <sup>st</sup> study group (SG1)	2 <sup>nd</sup> study group (SG2)
N		n=10	n=10	n=10
Sex	Male	5	6	6
	Female	5	4	4
Age (medium)		40.3	39.8	40.7

Table 2. Anatomical groups and number of teeth

Group of teeth Group	Incisors and canines		Premolars		Molars	
CG (n=286)	120		79		87	
SG1 (n=285)	120	360	76	235	89	262
SG2 (n=286)	120		80		86	
<b>Total</b>	<b>857</b>					

study groups: control group (CG, n=10) of conventional periodontal therapy, 1-st study group (SG1, n=10), which also used an additional diode laser therapy, and 2-nd study group (SG2, n=10), where the treatment plan was consistent with the SG1 group, excepting the use of antiseptic agents (Table 1).

Before treatment onset, it was scheduled a periodontal screening record (PSR) showing level of inflammatory process, namely level of clinical attachment loss (CAL) correlating with periodontal pocket depth (PPD), and recession (R) measured at six points around the tooth, presence of debris (Pl) on the four tooth surfaces, and degree of gingival bleeding (BoP), defined at four points. Local patient entry criteria for carrying out the active phase of periodontal therapy were included: index of hygiene, R1 (O'Leary, 1972)  $\geq 25\%$ , bleeding index BoP (Ainamo, Bay, 1975)  $\geq 40\%$ , periodontal pocket depth (PPD  $\geq 4$  mm  $\leq 6$  mm). General entry criteria of patients were excluded: administration of antibiotics and oral antiseptics during last three months, pregnancy, and presence of systemic diseases affecting the clinical study outcomes. The study did not included patients having less than 24 natural teeth inclusive of latest molars. All patients included in the research had the body mass index (BMI) 25–30 kg/m<sup>2</sup>, were light-skinned and non-smoking within the last year.

As object to study were n=857 teeth (5142 sites); in the CG and the SG2 n=286 teeth were studied, in the SG1 n=285 (Table 2).

*Therapeutic protocol.* Before planning of therapeutic interventions, it was conducted professional hygiene of oral cavity and training in individual hygiene. The stages of treatment based on etiopathogenic, integrated and personalized principles, consisted of three main phases; the first was active anti-inflammatory, the second was reconstructive, and the third was supportive.

Active anti-inflammatory periodontal therapy in

control group were provided conventional thorough debridement of teeth surfaces from dental plaque and application of 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solution, 0.2% chlorhexidine CHX) solution, and final application of 0.5% CHX gel for chemical decontamination of periodontal wound.

In addition to the control group protocol before the cleansing of teeth surfaces from dental plaque, in the first study group were conducted laser decontamination of periodontal pockets using indium-gallium-aluminum-phosphate (In-Ga-Al-PO<sub>4</sub>) diode laser (940  $\mu$ m, unactivated waveguide  $\varnothing$  300  $\mu$ m, 0,5 W/CW 10 sec. on the one surface), and laser coagulation of soft tissues in periodontal pocket and epithelial debridement of interdental gingiva (940  $\mu$ m, active waveguide  $\varnothing$  300  $\mu$ m, 1W/CW, 15 sec. on the one surface), subsequent to subgingival scaling and root planning. In second study group, the treatment was carried out as in first study group, but completely excluded antiseptic drug administration during the treatment.

Supportive periodontal therapy was conducted after 6 weeks, 3, 6 and 12 months on the basis of updated data of periodontal card and repeated the initial treatment protocol in respective groups. Protocol of periodontal supportive therapy in the control group included: subgingival irrigation with 3% solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.2% CHX; electro-mechanical removal of dental plaque, mechanical subgingival scaling and root planning; final application with CHX gel 0.5%.

In addition to the control group protocol, before the electro-mechanical removal of dental plaque, in the SG1 were conducted laser decontamination of periodontal pockets (940  $\mu$ m, unactivated waveguide  $\varnothing$  300  $\mu$ m, 0,5 W/CW 10 sec. on the one surface), and laser coagulation of soft tissues in periodontal pocket and epithelial debridement of interdental gingiva (940  $\mu$ m, active waveguide  $\varnothing$  300  $\mu$ m, 1W/CW, 15 sec. on the one surface), subsequent to subgingival scaling and root planning (Fig. 1).



Fig. 1. Clinical example in the phase of the active anti-inflammatory periodontal therapy (SG2). Irradiation of periodontal pockets - unin. Ø 300 µm, 0.5 W/CW, 10 sec. Coagulation and de-epithelization – in. Ø 300 µm, 1 W/CW, 15 sec.

Table 3. Treatment protocols of study groups

Step	Name of group Name of procedure	Control group (CG)	1st study group (SG1)	2nd study group (SG2)
1	Preliminary antiseptic treatment	3% hydrogen peroxide sol., 0.2% chlorhexidine bigluconate sol.	3% hydrogen peroxide sol., 0.2% chlorhexidine bigluconate sol.	-
2	Laser decontamination	-	Ø 300 µm non-in 0,5 W/CW, 10 sec.	Ø 300 µm non-in. 0,5W/CW, 10 sec.
3	Subgingival scaling and root planing	+	+	+
4	Final antiseptic treatment	0.5% chlorhexidine bigluconate gel.	0.5% chlorhexidine bigluconate gel.	-
5	Laser coagulating and deepitiation	-	Ø 300 µm in, 1W/CW, 15 sec.	Ø 300 µm in, 1W/CW, 15 sec.

Treatment protocol of patients in the SG2 was similar to the one of SG1, but without antiseptics use. All patients were given standard recommendations on oral care, warning against additional irritants of treated periodontal wounds (Table 3).

Data were entered and processed with the help of statistical package IBM Statistics 6.1. To check the distribution of the test match quantitative indicators of normal in groups used the Kolmogorov-Smirnov's consent. Since the law of distribution of all studied the amounts different from normal methods were used in the calculation of non-parametric statistics. In this case, the statistical significance of the differences was verified using the Kruskal-Wallis criterion (in the case of multiple independent populations) and the Wilcoxon W-test for dependent populations (dynamics of the data under study).

**Results and their discussion.** Analyzing of the results investigated clinical periodontological parameters of the whole oral cavity (mean ± standard deviation) between

the initial and time measurements. In the next observation period - 6 weeks and 3 months later, at 6 and 12 months in the control group and in the study groups, we observed a positive dynamics in all groups. The results of treatment are shown in Table 4 - Table 7. In all groups, all clinical parameters showed a statistically significant decrease in all time intervals compared to baseline ( $p < 0.05$ ). The mean PPD at baseline was  $4.3 \pm 0.2$  in the control group,  $4.33 \pm 0.19$  in SG1, and  $4.3 \pm 0.15$  SG2 (Table 4).

At 12 months after treatment, there was a decrease in the CG parameters PPD to  $2.91 \pm 0.1$ , and in SG1 to  $2.59 \pm 0.11$ , and in SG2 to  $2.58 \pm 0.11$ . The change in PPD in the study groups (SG1 and SG2) both in early-term and in the long-term period of observation was higher than in the CG ( $p < 0.05$ ).

The change in CAL in the study groups (SG1 and SG2) was also higher in early-term and in the long-term period of observation than in the control group ( $p < 0.05$ ) (Table 5).

Table 4. Changing the parameters of depth of the periodontal pocket (PPD)

Group	Before treatment	After 6 weeks	In 3 months	In 6 months	In 12 months
CG	4,3 ± 0,2	2,81 ± 0,12	2,61 ± 0,22	2,95 ± 0,12	2,91 ± 0,1
SG1	4,33 ± 0,19	2,63 ± 0,11	2,59 ± 0,1	2,53 ± 0,11	2,59 ± 0,11
SG2	4,3 ± 0,15	2,62 ± 0,15	2,51 ± 0,15	2,51 ± 0,19	2,58 ± 0,11

Table 5. Change in parameters of the level of clinical attachment loss (CAL)

Group	Before treatment	After 6 weeks	In 3 months	In 6 months	In 12 months
CG	4,89 ± 0,12	4,1 ± 0,12	3,96 ± 0,13	3,93 ± 0,12	3,92 ± 0,11
SG1	4,91 ± 0,15	3,99 ± 0,11	3,87 ± 0,1	3,83 ± 0,11	3,81 ± 0,15
SG2	4,9 ± 0,23	3,98 ± 0,21	3,88 ± 0,23	3,82 ± 0,21	3,79 ± 0,13

Table 6. Changing parameters of bleeding degree (BoP)

Group	Before treatment	After 6 weeks	In 3 months	In 6 months	In 12 months
CG	76,1 ± 0,12	17,6 ± 0,02	17,8 ± 0,11	18,6 ± 0,02	22,9 ± 0,12
SG1	75,2 ± 0,13	12,8 ± 0,02	13,9 ± 0,12	11,8 ± 0,02	17,2 ± 0,11
SG2	75,3 ± 0,11	13,1 ± 0,13	13,8 ± 0,14	13,1 ± 0,13	17,1 ± 0,13

Table 7. Changing of the parameters of hygiene index (PI)

Group	Before treatment	After 6 weeks	In 3 months	In 6 months	In 12 months
CG	46,5 ± 0,13	20,4 ± 0,11	21,1 ± 0,11	19,4 ± 0,11	29,1 ± 0,1
SG1	46,8 ± 0,12	20,3 ± 0,13	20,7 ± 0,15	19,3 ± 0,13	28,2 ± 0,13
SG2	46,7 ± 0,11	19,81 ± 0,13	21,2 ± 0,13	20,1 ± 0,2	30,2 ± 0,3

The mean CAL at the baseline was 4.89±0.12 in the control group, 4.91±0.15 in the SG1, and 4.9±0.23 SG2. 12 months after treatment, the CAL parameters in CG decreased to 3.92±0.11, and in SG1 to 3.81±0.15, and in SG2 to 3.79±0.13.

Table 6 shows that mean value of BoP at baseline is 76.1±0.12 in the control group, 75.2 ± 0.13 in SG1 and 75.3±0.11 in SG2.

At 12 months after treatment, the BoP parameters in the CG decreased to 22.9±0.12, in SG1 to 17.2±0.11 and in SG2 to 17.1±0.13. The change in BoP in the study groups (SG1 and SG2) was also higher in early-term and in the long-term

period of observation than in the control group ( $p < 0.05$ ).

The mean PI at baseline was 46.5±0.13 in the control group, 46.8±0.12 in SG1 and 46.7±0.11 in SG2. At 12 months after treatment, the PI parameters in the CG decreased to 29.1±0.1, in SG1 to 28.2±0.13 and in SG2 to 30.2±0.3. Comparison of PI in all three groups (SG1, SG2 and CG) both in early-term and in the long-term period of observation were similar ( $p < 0.05$ ) (Table 7).

A cumulative comparison of the results of BoP, CAL and PPD between SG1, SG2 and CG in the near and long term leads to a higher decrease in SG1 and SG2 in comparison with CG with statistical significance ( $p < 0.001$ ).



a



b

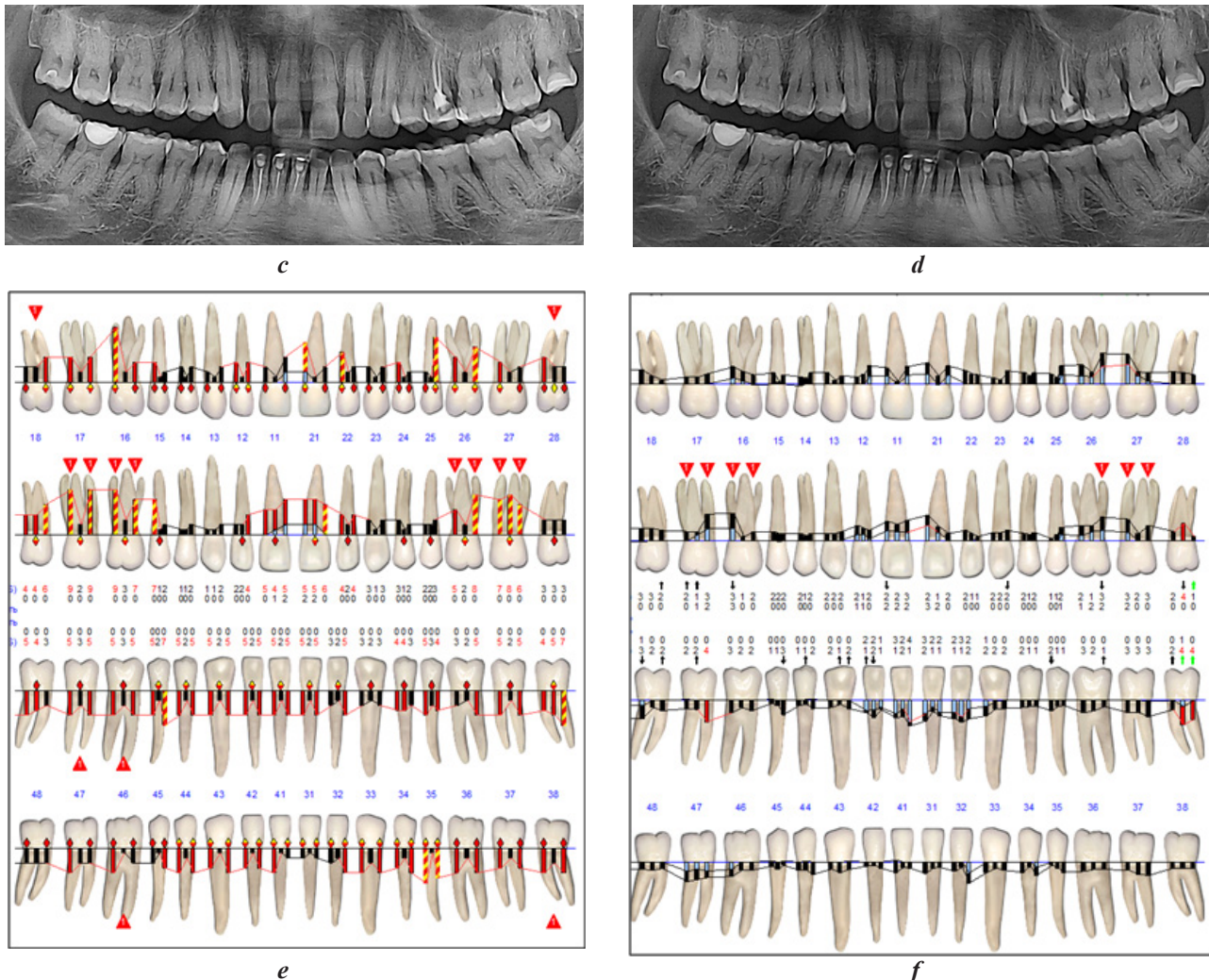


Fig. 2. Clinical example of periodontal therapy in the study group 2 (SG2). Patient 44-years old with GMCP.  
a - before treatment; b - in 12 months after treatment; c - orthopantomogram before treatment;  
d - orthopantomogram in 12 months; e - graphic periodontal card before treatment;  
f - graphic periodontal card in 12 months

Based on the study of graphic periodontal cards and the obtained CAL, PPD in the study groups and the control group, it is noted that the additional use of a diode laser contributes to a change in topography and an increase in the number of sites with a parodontal pocket depth  $\leq 4$  mm, which, according to most authors, has a leading role in the impact on the structure and virulence of the biofilm, which improves the basic clinical parameters leading to prolonged remission (Fig. 2).

**Conclusions.** The distant results of parameters CAL, PPD and BoP in the study groups indicate that the additional use of diode laser emission in the treatment of moderate chronic generalized periodontitis contributes to more stable clinical situation in 6 and 12 months after treatment, comparing with the control group ( $p > 0,05$ ) and allows a greater reduction of the degree of surgical procedures volume.

The absence of statistically significant differences in the study groups in terms of early and long-term observations suggests there is no need to use antiseptic agents in

the application of diode laser emission, thus reducing the impact on the patient's medication. Laser energy can be used as additional therapeutic and surgical method in the treatment of different phases: in the phase of the active anti-inflammatory, in the reconstructive and supporting periodontal therapy.

Until social level of education among the population will be higher, and associated with the cause of periodontal disease and the lack of positive experience of treatment, the prevalence of periodontal disease will continue to have a tendency to increase. Laser therapy is an improvement in traditional medical procedures. It is less invasive and more effective, reduces the amount of time spent on treatment, and reduces the amount of surgical intervention. Both scientific and clinical studies point too many aspects related to the development of treatment methods to ensure more successful prevention and recovery of patients with periodontal disease.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.



## REFERENCES

1. Aykol G., Baser U., Maden I., Kazak Z., Onan U., Tanrikulu-Kucuk S., Ademoglu E., Issever H., Yalcin F. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment // *J. Periodontol.*- 2011.- 82(3):481–488.
2. Bahareh Nazemisalman, Mahya Farsadeghi, Mehdi Sokhansanj. Types of Lasers and Their Applications in Pediatric Dentistry // *J. Lasers Med. Sci.*- 2015.- 6(3): 96-101.
3. Cobb C.M., Low S.B., Coluzzi D.J. Lasers and the treatment of chronic periodontitis // *Dent Clin. North. Am.*- 2010; 54(1): 35-53.
4. Gokhale S.R., Padhye A.M., Byakod G., Jain S.A., Padbidri V., Shivaswamy S. A comparative evaluation of the efficacy of diode laser as an adjunct to mechanical debridement versus conventional mechanical debridement in periodontal flap surgery: a clinical and microbiological study // *Photomedicine Laser Surg.*- 2012.- 30(10):598–603.
5. Gojkov-Vukelic M., Hadzic S., Dedic A., Konjhodzic R., Beslagic E. Application of a diode laser in the reduction of targeted periodontal pathogens // *Acta Inform. Med.*- 2013.- 21(4):237-40.
6. Hakki S.S., Bozkurt S.B. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts // *Lasers Med. Sci.*- 2012.- 27(2):325–331.
7. Herrera D., Matesanz P., Bascones-Martínez A., Sanz M. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics // *The Journal of Evidence-based Dental Practice.*- 2012.- 12(3 Suppl):50-60.
8. Hung H.C., Douglass C.W. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss // *J. Clin. Periodontol* 2002.-29(11): 975-86.
9. Ioannou I., Dimitriadis N., Papadimitriou K. et al. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial // *J. Clin. Periodontol.*- 2009.- (36).- p.132-141.
10. James G.A., Swogger E., Wolcott R. et al. Biofilms in chronic wounds // *Wounds Repair Regen.*- 2008.-16, p. 37–44.
11. Juhi Uttamani, Imaad Shaikh, Varun Kulkarni. Use of Lasers in Nonsurgical Periodontal Therapy.-*International journal of experimental dental science.*- January-June.-2013; 2 (1).- p. 29-32.
12. Lin J., Bi L., Wang L. et al. Gingival curettage study comparing a laser treatment to hand instruments // *Lasers Med Sci.*- 2011;26(1):7-11.
13. Metcalf D.G., Bowler P.G. Biofilm delays wound healing: a review of the evidence // *Burns Trauma.*- 2013,1.- p.5-12.
14. Mohammed M. Jawad, Sarah T. AbdulQader, B.B. Zaidan, et al. An Overview: Laser Applications in Dentistry // *International Journal of Pharmacology.* - 2011, 7:189-197.
15. Nimit Garg, Sunil Verma, Minni Chadha, Pavitra Rastogi. Use of carbon dioxide laser in oral soft tissue procedures // *Natl. J. Maxillofac. Surg.*- 2015.- Jan-Jun. 6(1): 84–88.
16. Pesevska S., Nakova M., Gjorgoski I. et al. Effect of laser on TNF-alpha expression in inflamed human gingival tissue // *Lasers Med. Sci.*- 2012; 27(2): 377-381.
17. Ruijie Huang, Mingyun Li, Richard L. Gregory.- Bacterial interactions in dental biofilm // *Virulence.* - 2011, 2(5): 435–444.
18. Saffarpour A., Fekrazad R., Heibati M.N. et al. Bactericidal Effect of Erbium-Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser and Photodynamic Therapy on Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Biofilm on Implant Surface // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*- 2016.- May-Jun;31(3):e71-8.
19. Zaura E., Brandt B.W., Teixeira de Mattos M.J. Same exposure but two radically different responses to antibiotics: resilience of the salivary microbiome versus long-term microbial shifts in feces // *MBio.*- 2015.- 10;6(6):e01693-15.
20. Zingale J., Harpenau L., Lundergan W., Chambers D. Effectiveness of root planning with diode laser curettage for the treatment of periodontitis // *J. Calif. Dent. Assoc.*-2012, 40(10).- p.786-793.

## SUMMARY

### ANALYSIS OF THE LONG-TERM CLINICAL RESULTS OF USING 940 μm DIODE LASER IN PATIENTS WITH GENERALIZED MODERATE CHRONIC PERIODONTITIS

Cherepynska Yu., Volkova O., Riabokon E., Baglyk T.

*Kharkiv National Medical University, Ukraine*

The experience of using a diode laser with a wavelength of 940 μm in the treatment of patients with generalized periodontitis of moderate severity of chronic course is presented. 30 patients were examined, including 17 men (56.6%), and 13 women (43.4%) aged 35-44 with chronic generalized periodontitis of moderate severity. It is concluded that the use of diode laser of 940 μm in the complex therapy of patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity is clinically justified and an effective auxiliary method of treatment. The long-term results of the clinical study indicate that the additional use of a diode laser allows for more stable remission and a greater reduction in the volume of surgical interventions compared with control group.

**Keywords:** diode laser, chronic periodontitis, non-surgical treatment, clinical parameters of periodontitis.

## РЕЗЮМЕ

### АНАЛИЗ ОТДАЛЕННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕНЕНИЯ ДИОДНОГО ЛАЗЕРА 940 $\mu\text{m}$ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Черепинская Ю.А., Волкова О.С., Рябоконт Е.Н., Баглык Т.В.

*Харьковский национальный медицинский университет, Украина*

Приведен опыт применения диодного лазера длиной волны 940  $\mu\text{m}$  при лечении пациентов с генерализованным пародонтитом средней тяжести хронического течения. Исследовано 30 пациентов, из них 17 (56,6%) мужчин и 13 (43,4%) женщин в возрасте 35-44 лет с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Делается вывод, что применение диодного лазера 940  $\mu\text{m}$  в комплексной терапии пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести является клинически оправданным и эффективным вспомогательным методом лечения. Отдаленные результаты клинического исследования свидетельствуют о том, что дополнительное применение диодного лазера позволяет достичь более стойкой ремиссии и в большей степени сократить объем хирургических вмешательств по сравнению с контрольной группой.

## რეზიუმე

940  $\mu\text{m}$  დიოდური ლაზერის გამოყენების მოგვიანებითი კლინიკური შედეგები პაციენტებში საშუალო სიმძიმის ქრონიკული გენერალიზებული პაროდონტიტით

ი. ჩერეპინსკა, ო. ვოლკოვა, ე. რიაბოკონი, ტ. ბაგლიკი

*ხარკოვის ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, უკრაინა*

მოცემულია 940  $\mu\text{m}$  სიგრძის ტალღის ლაზერის გამოყენების შედეგები საშუალო სიმძიმის ქრონიკული გენერალიზებული პაროდონტიტის მკურნალობისათვის. დაკვირვების ქვეშ იმყოფებოდა 30 პაციენტი, 17 (56,6%) მამაკაცი და 13 (43,3,%) ქალი, 34-44 წწ. ასაკის, საშუალო სიმძიმის ქრონიკული გენერალიზებული პაროდონტიტით.

გამოტანილია დასკვნა, რომ 940  $\mu\text{m}$  სიგრძის ტალღის დიოდური ლაზერის კომპლექსურ მკურნალობაში გამოყენება წარმოადგენს კლინიკურად ეფექტურ დამხმარე მეთოდს აღნიშნული დაავადების მკურნალობაში. კლინიკური გამოცდის შორეული შედეგები ადასტურებს, რომ დიოდური ლაზერის დამატებითი შეყვანა მკურნალობაში იძლევა უფრო მდგრადი რემისიის მიღწევის შესაძლებლობას და საკმარისად ამცირებს ქირურგიული ჩარევების რიცხვს საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით.

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ

<sup>1</sup>Койшибаева Л.М., <sup>1</sup>Тургунов Е.М., <sup>2</sup>Сандлум Г., <sup>1</sup>Телеуов М.К., <sup>1</sup>Баймуратова М.Г.

<sup>1</sup>*Карагандинский государственный медицинский университет;*

<sup>2</sup>*Госпиталь Каролинского университета, отделение хирургии, Стокгольм, Швеция*

Исследование качества жизни (КЖ) пациентов по сей день является одним из приоритетных направлений в медицине. Актуальность этой проблемы не вызывает никаких сомнений, поскольку исследование КЖ открывает возможность комплексного анализа состояния здоровья пациента.

Прогресс развития медицинской науки, изменение структуры заболеваемости населения и акцент на уважение прав пациента как личности привели к созданию новой парадигмы понимания болезни и определения эффективности методов лечения. Когда врачи стали все больше сознавать, что объективное уменьшение патологических изменений не всегда

сопровождается улучшением самочувствия больного и результатом лечения должен быть удовлетворен больной, в медицине возник интерес к качеству жизни пациента [2]. КЖ в медицине отражает степень адаптации человека к болезни и возможность выполнения им привычных функций, соответствующих его социально-экономическому положению.

Результаты хирургического лечения чаще изучают посредством таких статистических показателей, как летальность, продолжительность пребывания в стационаре, количество послеоперационных осложнений [4]. Возникновение осложнений после консервативного или хирургического лечения ставит перед врачом за-

дачу четко определить критерии целесообразности консервативного и хирургического лечения. Значительную роль в решении данных задач играет определение КЖ пациента.

Исследование КЖ - общепринятый, высокоинформативный, надежный, чувствительный и экономичный метод оценки благополучия как на индивидуальном, так и на групповом уровне, дающий интегральную характеристику физического, психологического, эмоционального и социального функционирования человека. Хирургическое вмешательство оказывает значительное влияние на послеоперационное КЖ пациентов [10]. Ежедневно по всему миру выполняется огромное количество холецистэктомий (ХЭ), однако послеоперационное КЖ таких пациентов изучено недостаточно. Поэтому в последнее время исследователи уделяют все большее внимание оценке показателей КЖ как в аспекте удовлетворенности жизнью в психоэмоциональном и социальном планах, так и изучения эффективности тех или иных методов лечения.

Для определения КЖ больных желчнокаменной болезнью (ЖКБ) и после ХЭ используют различные виды опросников как специализированные, так и общие. Одним из чаще используемых опросников для оценки КЖ пациентов является SF-36. Имеется достаточное количество исследований с применением данного опросника, а также его комбинаций с другими.

Так, в 2008 году М.А. Сердюков [9] проводил оценку КЖ 58 пациентов после лапароскопической холецистэктомии (ЛХЭ) в сроки от 1 года до 5 лет. Опрос пациентов проводил с помощью опросника SF-36. В своем проспективном когортном исследовании К.Р. Finan и соавт. [17] для определения динамики гастроинтестинальных симптомов и КЖ наблюдали 55 больных, перенесших ЛХЭ, КЖ оценивали посредством опросника SF-36. Lirici M.M. и соавт. [23] в 2011 г. сравнивали КЖ и послеоперационные результаты после однопортовой лапароскопической операции и стандартной ЛХЭ. В своем исследовании авторы использовали опросник SF-36. Осмонбекова Н.С. [5] в 2014 году изучала послеоперационное КЖ 776 больных в зависимости от вида оперативного вмешательства – традиционной холецистэктомии (ТХЭ) и ЛХЭ или из минилапаротомного доступа. В своем исследовании автор использовала опросник SF-36. Факторы, влияющие на КЖ после ХЭ изучал Rydbeck D. [29] также посредством опросника SF-36.

В некоторых исследованиях применяют SF-36 и его комбинацию со специализированными опросниками [1,6,11,16]. Так, в своей работе Орлов С.В. [3] изучал КЖ 326 пациентов с калькулезным холециститом, оперированных ТХЭ и ЛХЭ. Для оценки КЖ применяли общий опросник SF-36, специфический GSRS и визуально-аналоговую шкалу Euro QoL. В 2012 г. Семерикова Н.А. [8] при оценке КЖ у 37 больных желчнокаменной болезнью после "открытой" холецистэктомии (ОХЭ), мини-холецистэктомии (МХЭ)

и лапароскопической холецистэктомии (ЛХЭ) использовала опросник SF-36 и шкалу Visick.

Barthelsson С. и соавт. [28] в 2015 г. исследовали эффект внутрибрюшного введения изотонического раствора на боль и восстановление, а также КЖ пациентов после ЛХЭ. В исследовании использовали опросник SF-36 и Визуальную Аналоговую Шкалу (ВАШ) [12]. Существует специальный опросник при симптомном холелитиазе после ХЭ - Gallstone Impact Checklist (GIC). Опросник включает 41 утверждение, сгруппированное в 4 субшкалы (боль, диспепсия, эмоции и питание). Его валидация в России проведена в 2005 году [6]. Однако применение GIC во многих странах ограничено в связи с трудностью воспроизведения некоторых психометрических аспектов и перевода на другие языки [13].

Одним из популярных и широко используемых опросников является международный специализированный опросник Gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI), который разработан в 1993 г. в Германии под руководством профессора Ernst Eypasch [15]. Во многих исследованиях GIQLI используют для оценки КЖ после хирургического лечения больных. Валидация данного опросника проводилась во многих странах, таких как Франция [33], Швеция [30], Испания [27], Китай [33] и Тайвань [22]. В настоящее время GIQLI широко используется во многих клиниках США и Европы для оценки результатов хирургического лечения [18-21,24-26,31].

По данным множества авторов данный опросник позволяет установить признаки недиагностированных нарушений желудочно-кишечного тракта и дает возможность своевременно диагностировать и проводить коррекцию послеоперационных осложнений, что позволяет значительно улучшить показатели хирургического лечения пациентов с калькулезным холециститом.

Цель настоящего исследования – оценка индекса качества жизни у пациентов с калькулезным холециститом после холецистэктомии.

**Материал и методы.** В ходе исследования изучено КЖ 259 пациентов с калькулезным холециститом, перенесших операцию в промежутке с 2013 по 2015 гг. в различных регионах Казахстана (Карагандинская, Акмолинская, Актюбинская, Алматинская, Атырауская, Западно-Казахстанская, Жамбылская, Карагандинская, Костанайская, Кызылординская, Мангистауская, Южно-Казахстанская, Северо-Казахстанская, Павлодарская и Южно-Казахстанская). Из 259 пациентов большую часть составили женщины - 183 (70,7%), мужчин было 76 (29,3%). Распределение пациентов по возрастным категориям представлено в таблице 1.

Большую часть больных составила средняя возрастная группа - второй период n=151 (58,2%), 76 (29,3%) лиц составили пожилую возрастную группу. Опрос пациентов проводился ретроспективно. Сроки от момента операции до анкетирования варьировали в пределах от 0,7 до 4,1 лет. Количество пациентов, перенесших операцию «менее 2 лет» назад, составило 149 (57,5%), «более 2 лет» - 110 (42,5%). Распреде-

Таблица 1. Возрастные категории пациентов

Возраст в годах	Число больных	
	абсолютное	%
20-25	5	1,9
26-30	13	5,0
31-35	14	5,4
36-40	23	8,9
41-45	34	13,1
46-50	34	13,1
51-55	26	10,0
56-60	34	13,1
61-64	22	8,5
Старше 64	54	20,8

ние больных в зависимости от изменений желчного пузыря было следующим: хронический калькулезный холецистит (ХКХ) - 44 (17,0%), острый калькулезный холецистит (ОКХ) - 215 (83,0%). Экстренный случай госпитализации отмечался в 176 (68,0%) случаях, плановый - в 83 (32,0%). ЛХЭ перенесли 145 (56,0%), МХЭ - 114 (44%) пациентов. Нахождение пациентов в стационаре составило менее 5 суток - 35 (13,5%), от 5 до 7 суток - 131 (50,6%), от 8 до 10 суток - 54 (20,9%) и свыше 10 суток - 39 (15,0%). Пациенты были поделены также с учетом наличия или отсутствия активности: передвигается по квартире - 18 (7%) и передвигается в городе - 241 (93,0%). Распределение больных проводили и по семейному статусу - в браке состояли 207 (79,9%), не в браке - 23 (8,9%), другое - 29 (11,2%). Все пациенты получали конверт с вложенной анкетой и сопроводительным письмом, в котором пояснялась значимость работы и анкетирования, а также конверт с марками для ответа. Пациентам предварительно звонили и объясняли цель исследования и, с их информированного согласия, отправляли анкету по почте; при желании пациента, проводили опрос посредством интервьюирования по телефону, затем подсчитывали баллы для каждого пациента в отдельности.

Инструментом исследования послужил международный опросник GIQLI, разработанный E. Eyrash [14]. В 2016 году нами был осуществлен перевод опросника GIQLI на русский и казахский языки с последующей валидацией для оценки КЖ пациентов после ХЭ на территории Республики Казахстан [7]. Было получено официальное разрешение от MAPI Research Trust - международной организации по координации научных исследований в области пациент-ориентированной оценки клинических результатов. GIQLI включает 36 вопросов с пятью вариантами ответов на

каждый вопрос. Шкала ответов от 0 до 4, возможная суммарная оценка от 0 до 144 баллов. Опросник GIQLI делится на 5 компонентов: 1. Symptom (19 вопросов); 2. Physical Function (7 вопросов); 3. Emotion (5 вопросов); 4. Social Function (4 вопроса); 5. Medical Treatment (1 вопрос). Также возможен подсчет баллов для каждого компонента опросника.

Показатели рассчитывали не только по стандартному расчету GIQLI, но и по модифицированной методике, предложенной G. Sandblom, [30] в которой автор предложил разделить GIQLI на следующие компоненты: 1. Компонент Physical role (11 вопросов); 2. Компонент Large bowel function (6 вопросов); 3. Компонент Emotional role (8 вопросов); 4. Компонент Upper GIT function (8 вопросов); 5. Компонент Meteorism (3 вопроса).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы SPSS «Statistics» 20.0 (IBM). Для каждого показателя рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение (SD). Оценка различий в группах проводилась посредством дисперсионного анализа ANOVA, корреляционный анализ посредством расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты и их обсуждение.** Общее количество пациентов, перенесших холецистэктомию в период 2013-2015 гг. составило 259 больных, из них 76 (29,3%) мужчин и 183 (70,7%) женщин.

Среднее значение суммарного индекса КЖ (Overall GIQLI) составило  $M=120,89$  ( $SD=22,40$ ), т.е. уровень КЖ у пациентов после ХЭ составил 83,9% от максимально возможного, при этом максимальное увеличение КЖ наблюдалось в компоненте «Симптом»  $M=64,01$  ( $SD=11,10$ ), а минимальный результат в компоненте «Социальная функция» ( $M=14,09$ ;  $SD=2,49$ ). Минимальное и максимальное значения индекса

КЖ (Overall GIQLI) составило  $M=44,0$  ( $SD=22,40$ ) и  $M=144,0$  ( $SD=22,40$ ), соответственно. Если рассматривать КЖ по модификации, предложенной G. Sandblom, максимальное среднее значение индекса КЖ составило в компоненте «Физическая функция» -  $M=37,92$  ( $SD=7,26$ ), минимальное значение - в компоненте «Функция толстого кишечника» -  $M=21,56$  ( $SD=3,01$ ).

Анализ показателей КЖ в зависимости от пола выявил, что у мужчин отмечается незначительное увеличение показателей КЖ во всех компонентах GIQLI, статистически значимое увеличение показателей КЖ проявилось в эмоциональной ( $M=17,09$ ;  $SD=2,58$  и  $M=15,61$ ;  $SD=4,13$ ;  $F=8,41$ ;  $p=0,001$ ) и физической сфере ( $M=24,54$ ;  $SD=4,69$  и  $M=22,44$ ;  $SD=6,35$ ; соответственно,  $F=6,78$ ;  $p=0,01$ ) Суммарный индекс КЖ (Overall GIQLI) составил  $M=125,64$ ;  $SD=18,01$  и  $M=118,91$ ;  $SD=23,75$  соответственно;  $F=4,93$ ;  $p=0,03$ . Согласно модификации G. Sandblom, показатели у мужчин во всех компонентах незначительно выше, чем у женщин. Из них статистически значимое увеличение показателей наблюдается в эмоциональной сфере ( $M=27,30$ ;  $SD=4,48$  и  $M=24,98$ ;  $SD=6,66$ ; соответственно,  $F=7,75$ ;  $p=0,01$ ) и в работе верхнего желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) ( $M=26,95$ ;  $SD=4,37$  и  $M=25,23$ ;  $SD=5,62$ ; соответственно,  $F=5,68$ ;  $p=0,02$ ).

Значительное различие в КЖ наблюдается в зависимости от характера изменений в желчном пузыре. При хроническом холецистите КЖ выше по всем компонентам, что статистически значимо по всем показателям. Средние значения суммарного индекса GIQLI составили при хроническом процессе  $M=132,36$  ( $SD=10,35$ ), при остром  $M=118,54$  ( $SD=23,46$ ); ( $F=14,65$ ;  $p=0,0002$ ). Особо примечательны показатели КЖ в компоненте «Симптом» ( $M=69,70$ ;  $SD=5,86$  и  $M=62,85$ ;  $SD=11,56$ ; соответственно,  $F=14,68$ ;  $p=0,0002$ ) и «Социальная функция» ( $M=15,41$ ;  $SD=0,95$  и  $M=13,82$ ;  $SD=2,62$ ;  $F=15,68$ ;  $p=0,0001$ ). По модификации G. Sandblom примечательны показатели физической функции ( $M=41,64$ ;  $SD=3,08$  и  $M=37,16$ ;  $SD=7,63$ ;  $F=14,59$ ;  $p=0,0002$ ) и функции верхних отделов желудочно-кишечного тракта ( $M=28,41$ ;  $SD=2,94$  и  $M=25,19$ ;  $SD=5,55$ ; соответственно,  $F=14,02$ ;  $p=0,0002$ ) (Рис. 1).

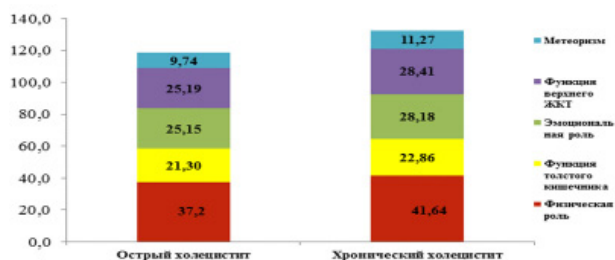


Рис. 1. Средние значения показателей компонентов КЖ по модификации G. Sandblom в зависимости от характера изменений в желчном пузыре.

На КЖ пациентов оказывает влияние вид хирургического доступа: после ЛХЭ отмечается уменьшение симптомов заболевания в сравнении с ХЭ из мини доступа ( $M=65,17$ ;  $SD=10,18$  и  $M=62,54$ ;  $SD=12,05$ ;  $F=3,64$ ;  $p=0,06$ ) и повышение показателей КЖ в социальной сфере ( $M=14,34$ ;  $SD=2,41$  и  $M=13,78$ ;  $SD=2,56$ ; соответственно,  $F=3,23$ ;  $p=0,07$ ). В модификации индекса GIQLI, статистически значимые различия наблюдаются в компоненте «Метеоризм» ( $M=10,35$ ;  $SD=2,22$  и  $M=9,56$ ;  $SD=2,91$ ;  $F=6,15$ ;  $p=0,01$ ).

В результате исследования выяснилось, что на индекс КЖ большое влияние оказывает тип госпитализации. При плановой ХЭ индекс КЖ пациентов по всем компонентам выше, чем при экстренной ХЭ ( $M=130,71$ ;  $SD=13,57$  и  $M=116,26$ ;  $SD=24,21$ ; соответственно,  $F=25,75$ ;  $p=0,000001$ ). Значительные различия наблюдаются в компоненте «Симптом» ( $M=69,10$ ;  $SD=6,78$  и  $M=61,61$ ;  $SD=11,92$ ;  $F=28,35$ ;  $p=0,0000001$ ). По модификации G. Sandblom, показатели госпитализации в плановом порядке по всем компонентам выше, чем при экстренной, прежде всего, за счет улучшения в физической и эмоциональной сфере, работы верхнего ЖКТ (Рис. 2).

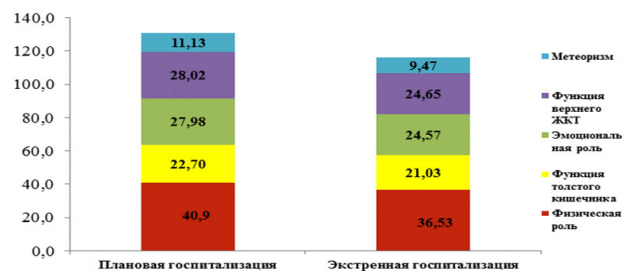


Рис. 2. Средние значения показателей КЖ по модификации G. Sandblom в зависимости от типа госпитализации

У пациентов, имеющих семью, показатели GIQLI во всех компонентах были значительно выше, чем у пациентов, не состоящих в браке (Таблица 2)

Так суммарный индекс КЖ пациентов, состоящих в браке, составил  $M=124,38$  ( $SD=20,17$ ), а не имеющих семьи  $M=102,22$  ( $SD=28,05$ ) ( $F=14,90$ ;  $p=0,0000008$ ) Особо значимая разница в показателях КЖ выявлена в компоненте «Физическая функция» ( $M=23,94$ ;  $SD=5,43$  и  $M=17,35$ ;  $SD=7,23$ ;  $F=15,68$ ;  $p=0,0000004$ ), а в модификации G. Sandblom также в физической ( $M=39,04$ ;  $SD=6,50$  и  $M=31,39$ ;  $SD=8,93$ ;  $F=15,43$ ;  $p=0,0000005$ ) и эмоциональной сферах ( $M=26,64$ ;  $SD=5,54$  и  $M=20,35$ ;  $SD=7,55$ ;  $F=15,57$ ;  $p=0,0000004$ , соответственно).

Рассматривая индексы GIQLI в зависимости от степени активности больного, значимых различий не выявлено, однако при этом КЖ пациентов, которые передвигаются в пределах квартиры, по всем компонентам выше кроме социальной сферы ( $M=13,56$ ;  $SD=2,45$  и  $M=14,13$ ;  $SD=2,49$ ), чем у пациентов, передвигающихся в пределах города. Согласно модификации G. Sandblom,

Таблица 2. Индекс GIQLI в зависимости от семейного статуса

Компонент	Не в браке, n=23		В браке, n=207		Другое, n=29		ANOVA		
	M	SD	M	SD	M	SD	k	F	p
Физическая роль (модиф.)	31,39	8,93	39,04	6,50	35,14	7,76	2	15,43	0,0000005
Функция толстого кишечника (модиф.)	20,00	3,10	21,90	2,87	20,41	3,30	2	6,80	0,0013206
Эмоциональная роль (модиф.)	20,35	7,55	26,64	5,54	22,90	6,63	2	15,57	0,0000004
Функция верхних отделов ЖКТ» (модиф.)	22,22	7,51	26,48	4,82	23,17	5,04	2	11,22	0,0000214
Метеоризм (модиф.)	8,26	3,41	10,31	2,41	9,17	2,24	2	8,81	0,0001988
Симптом	56,17	14,42	65,65	10,08	58,52	11,06	2	12,59	0,0000061
Эмоции	13,00	4,73	16,62	3,36	14,38	4,35	2	13,82	0,0000020
Физическая функция	17,35	7,23	23,94	5,43	21,24	5,98	2	15,68	0,0000004
Социальная функция	12,57	2,83	14,40	2,30	13,10	2,85	2	8,70	0,0002205
Медицинское лечение	3,13	0,87	3,76	0,65	3,55	0,74	2	9,51	0,0001036
Overall GIQLI	102,22	28,05	124,38	20,17	110,79	23,00	2	14,90	0,0000008
Сред. Симпт.	2,96	0,76	3,46	0,53	3,08	0,58	2	12,59	0,0000061
Сред. Эмоц.	2,60	0,95	3,32	0,67	2,88	0,87	2	13,82	0,0000020
Сред. Физ.	2,48	1,03	3,42	0,78	3,03	0,85	2	15,68	0,0000004
Сред. Соц.	3,17	0,83	3,70	0,64	3,41	0,87	2	7,45	0,0007168
Взвеш. Итог	11,18	3,19	13,80	2,32	12,27	2,76	2	15,21	0,0000006

показатели КЖ выше у пациентов, передвигающихся в пределах квартиры, кроме компонента «Метеоризм» (M=9,94; SD=2,13 и M=10,01; SD=2,60).

Статистически значимых различий индекса КЖ пациентов в зависимости от продолжительности госпитализации не выявлено, однако при этом показатели КЖ пациентов, находившихся в стационаре менее 5 суток и более 10 были выше, чем у пациентов, находившихся в стационаре от 5 до 10 суток. Их средние значения суммарного индекса GIQLI составили: менее 5 суток M=123,66 (SD=20,54), более 10 суток M=122,44 (SD=19,64), а от 5 до 7 суток M=120,53 (SD=22,98), от 8 до 10 суток M=118,85 (SD=24,23).

Значимое влияние на КЖ пациентов оказывает срок, прошедший после проведенной операции: выявлены статистически значимые различия по всем компонентам между пациентами, перенесшими операцию менее 2 лет назад и два и более года назад (Рис. 3).

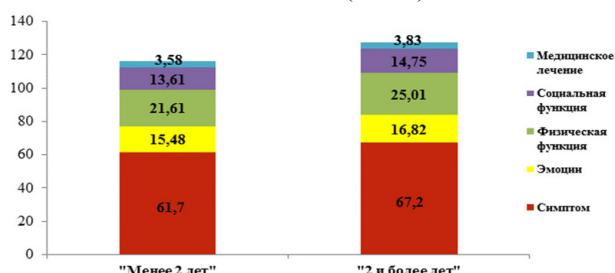


Рис. 3. Средние значения показателей по компонентам GIQLI в зависимости от сроков после операции

Из рисунка 3 явствует, что общий суммарный показатель в группе «2 и более лет» больше, чем в группе «менее 2 лет», в основном, за счет компонента «Симптом» и «Физическая функция».

Общий средний показатель КЖ у пациентов в группе «менее 2 лет» составил M=115,97 (SD=22,34; F=18,01; p=0,000031) и в группе «2 и более лет» M=127,55 (SD=20,78; F=18,01; p=0,000031) (Рис. 4).

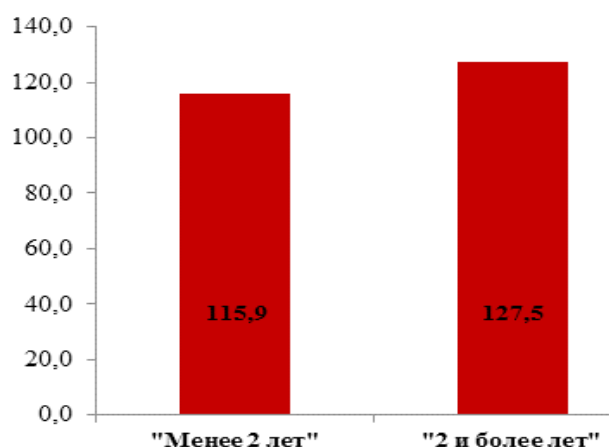


Рис. 4. Среднее значение показателей КЖ (Overall GIQLI) в зависимости от сроков после операции

Особенно значимые различия выявлены в показателях физической функции (F=22,09; p=0,000004) - группа «менее 2 лет» (M=21,61; SD=6,05) и группа «2

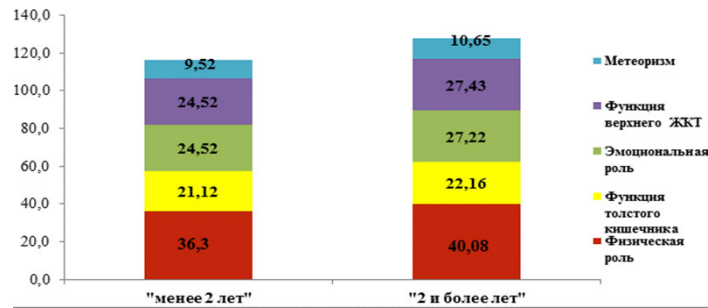


Рис. 5. Средние значения показателей компонентов КЖ согласно модификации G. Sandblom в зависимости от сроков после операции

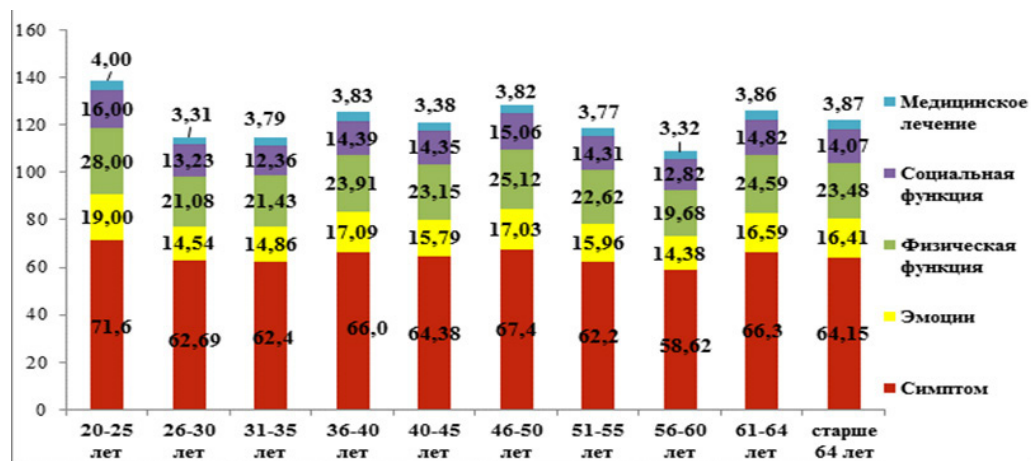


Рис. 6. Показатели КЖ с учетом возраста

и более лет» ( $M=25,01$ ;  $SD=5,32$ ). В расчетах согласно G. Sandblom, общий средний суммарный показатель КЖ выше у пациентов, перенесших операцию 2 и более года назад, в основном, в физическом и эмоциональном плане, а также за счет улучшения работы верхнего ЖКТ (Рис. 5).

На КЖ пациентов оказывает влияние возраст больного: в результате исследования статистически значимые различия выявлены в возрастном промежутке от 20 до 25 лет. Индекс GIQLI в этом возрасте по всем компонентам был выше, чем в других возрастных группах, из них статистически значимые показатели КЖ были в эмоциональной, физической, социальной сферах и в результатах медицинского лечения.

Согласно модификации G. Sandblom, индекс КЖ был достоверно выше в компоненте «Физическая функция», «Функция толстого кишечника», «Эмоциональная роль» и «Функция верхних отделов ЖКТ» (Рис. 6).

Примечательно, что показатели КЖ у пациентов в возрасте от 61-64 лет и старше 64 лет незначительно отличались от средней возрастной группы (от 36 до 60 лет).

Так, средние значения суммарного индекса GIQLI в старшей возрастной группе ( $F=2,49$ ;  $p=0,010$ ) составили 61-64 лет  $M=126,14$  ( $SD=18,68$ ), старше 64 лет  $M=121,98$  ( $SD=16,40$ ) и в средней возрастной группе 36-40 лет  $M=125,22$  ( $SD=28,44$ ), 41-45 лет  $M=121,06$  ( $SD=23,52$ ), 46-50 лет  $M=128,47$  ( $SD=15,98$ ), 51-55 лет  $M=118,88$  ( $SD=17,74$ ). Среди этих возрастных групп можно выделить группу 51-55 лет, в которой показате-

ли КЖ почти по всем компонентам уступают группам 61-64 лет и старше 64 лет, кроме социальной сферы ( $M=14,31$ ;  $SD=1,62$ ;  $M=14,82$ ;  $SD=1,79$  и  $M=14,07$ ;  $SD=2,01$  соответственно).

**Заключение.** 1. Суммарный индекс КЖ пациентов, перенесших холецистэктомию менее 2 лет назад, меньше в сравнении с пациентами, перенесшими операцию в сроки от 2 и более лет -  $M=115,97$  ( $SD=22,34$ ) и  $M=127,55$  ( $SD=20,78$ ), соответственно.

2. Плановый тип госпитализации положительно влияет на показатели КЖ пациентов. Общий средний показатель КЖ при плановой госпитализации составил  $M=130,71$  ( $SD=13,57$ ), при экстренной  $M=116,26$  ( $SD=24,21$ ).

3. Гастроинтестинальный индекс КЖ выше у пациентов, перенесших ХЭ лапароскопическим методом  $M=122,90$  ( $SD=21,35$ ), в сравнении с ХЭ из мини доступа  $M=118,32$  ( $SD=23,50$ ).

4. При хроническом холецистите показатели КЖ выше  $M=132,36$  ( $SD=10,35$ ), чем при остром холецистите  $M=118,54$  ( $SD=23,46$ ).

5. Положительное влияние на индекс КЖ (Overall GIQLI) оказывают возраст и семейный статус. Лица, состоящие в браке, имеют более высокие показатели КЖ ( $M=124,38$ ;  $SD=20,17$ ), чем пациенты не имеющие семьи ( $M=102,22$ ;  $SD=28,05$ ). Более высокие показатели КЖ наблюдались в возрастном промежутке от 20 до 25 лет.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьева И.Н., Романова Т.И. Качество жизни пациентов с холелитиазом в отдаленный период после холецистэктомии // Экспер. Клинич. Гастроэнтер.— 2010.— №9.— С. 38—43.
2. Евсина О.В. Качество жизни в медицине - важный показатель состояния здоровья пациента. (обзор литературы) // Личность в меняющемся мире: здоровье, адаптация, развитие. - 2013. - №1. - С. 119-133.
3. Орлов С.В. Сравнительный анализ качества жизни у больных калькулезным холециститом, оперированных традиционным и лапароскопическим методами. // Автореф. дисс. канд. мед. наук. - М. - 2008.
4. Осипенко М.Ф. Последствия оперативного лечения желчнокаменной болезни / М.Ф. Осипенко, Н.Б. Волошина, Н.В.Литвинова // Гастроэнтерология. -2012. -№3. - С. 33-36.
5. Осмонбекова Н.С. Качество жизни после различных способов холецистэктомии: Дис. ...канд. мед. наук: 14.01.17 / Российский Университет Дружбы Народов. — М., 2014.
6. Романова Т.И. Качество жизни у больных желчнокаменной болезнью (ЖКБ) и его ассоциация с основными факторами риска и полиморфизмом гена аполипопротеина Е: Дис. ...канд. мед. наук: 14.00.05 / РАМН Сиб. о-ние ГК НИИ терапии.— Новосибирск, 2005.— 134 с.
7. Свидетельство о государственной регистрации прав на предмет авторского права под названием «Валидация опросника Gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI) в Казахстане» (произведение науки) №006802 от 12 декабря 2016 год // Тургунов Е.М., Телеуов М.К., Абатов Н.Т., Койшибаева Л.М., Койшибаев Ж.М., Балыкбаева А.М.
8. Семерикова Н.А. Динамика изменений качества жизни пациентов в отдаленные сроки после холецистэктомии. // «Здоровье семьи -21-й век» : электр. период. изд.-е.-2012.- №1.-URL:[http:// fh-21. Perm/ru/download/ 2012-1-18/pdf](http://fh-21.perm.ru/download/2012-1-18/pdf)(дата обращения :16.06.2012).
9. Сердюков М.А. Результаты лапароскопической холецистэктомии по материалам клиники и качество жизни оперированных больных / М.А. Сердюков // Вестник новых медицинских технологий. -2008.-Т.15.- №1.-С.107.
10. Сурмач М.Ю. Качество жизни, связанное со здоровьем, как предмет изучения социологии медицины // Социология. -2011. -№2.-С. 100-104.
11. Филистович А.В. Сравнительный анализ показателей качества жизни у больных, перенесших холецистэктомию. / А.В. Филистович, Д.В. Черданцев, В.Г. Филистович // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.-2011.- №4.-С. 110-111.
12. Barthelsson C. Effects of Intra-abdominally Instilled Isotonic Saline on Pain, Recovery, and Health-Related Quality-of-Life Following Laparoscopic Cholecystectomy: A Randomized Prospective Double-Blind Controlled Study/ C. Barthelsson, G. Sandblom, S. Ljesevic-Nikoletic et al. // World J Surg.- 2015.-Vol.39.-№6.-P. 1413-20.
13. Carraro A., Mazloun D.E., Bihl F. Health-related quality of life outcomes after cholecystectomy // World J. Gastroenterol. —2011.— Vol. 17 (45).— P. 4945—4951.
14. Eypasch E., Wood-Dauphinee S., Williams J.I. et al. The Gastrointestinal Quality of Life Index: a clinical index for measuring patient status in gastroenterologic surgery / E. Eypasch, S. Wood - Dauphinee, J.Williams et al. // Chirug.— 1993.— Vol. 64.— Pp. 264—274.
15. Eypasch E., Williams J., Wood - Dauphinee S. et al. Gastrointestinal Quality of life index: development, validation and application of a new instrument // Br .J. Surg. - 1995.- Vol. 82., No. 2. - P. 216-222.
16. Feldman L.S. Validation of a physical activity questionnaire (CHAMPS) as an indicator of postoperative recovery after laparoscopic cholecystectomy/ L.S. Feldman, P. Kaneva, S. Demyttenaere et al. // Surgery.- 2009.- Vol.146.-№1.-P. 31-9.
17. Finan K.R., Leeth R.R., Whitley B.M. et al. Improvement in gastrointestinal symptoms and quality of life after cholecystectomy // Am. J. Surg.— 2006.— Vol. 192.— P. 196—202.
18. Hsueh L.N., Shi H.Y., Wang T.F. et al. Health-related quality of life in patients undergoing cholecystectomy // Kaohsiung J. Med. Sci.— 2011.— Vol. 27 (7).— P. 280—288.
19. Kirk G., Kennedy R., McKie L. et al. Preoperative symptoms of irritable bowel syndrome predict poor outcome after laparoscopic cholecystectomy // Surg Endosc.— 2011.— Vol. 25.-№10.— P. 3379—3384.
20. Lamberts M.P. Patient-reported outcomes of symptomatic cholelithiasis patients following cholecystectomy after at least 5 years of follow-up: a long-term prospective cohort study / M.P. Lamberts, B.L. Den Oudsten, F.Keus et al. // Surg Endosc.- 2014.- Vol.28.-№12. P. 3443-3450.
21. Lamberts M.P. Prospective multicentre cohort study of patient-reported outcomes after cholecystectomy for uncomplicated symptomatic cholecystolithiasis / M.P. Lamberts, B.L. Den Oudsten, J.J. Gerritsen et al. // Br J Surg.- 2015.-Vol.102.-№11.-P. 1402-1409.
22. Lien H-H. Validation Assessment of the Chinese (Taiwan) Version of the Gastrointestinal Quality of Life Index for patients with symptomatic Gallstone disease / H-H. Lien, C-C. Huang, P-C. Wang et al. // Journal of laparoscopic & advanced surgical techniques.-2007.-Vol.17.- №4.-P. 429-434.
23. Lirici M.M. Laparo-endoscopic single site cholecystectomy versus standard laparoscopic cholecystectomy: results of a pilot randomized trial/ [ M.M. Lirici, A.D. Califano, P. Angelini et al. // Am J Surg.- 2011.-Vol.202.-№1. P. 45-52.
24. Liu F. Comparative quality of life study between endoscopic sphincterotomy and surgical choledochotomy / F. Liu, X. Bai, G.F.Duan et al. // World J Gastroenterol.- 2014. -Vol.20. -№25. -P. 8237-8243.



25. Matovic E., Hasukic S., Ljuca F., Halilovic H. Quality of life in patients after laparoscopic and open cholecystectomy // *Med. Arh.* — 2012. — Vol. 66 (2).— P. 97—100.
26. Quintana J.M. Translation and validation of the gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI) / J.M. Quintana, J. Cabriada, I. López de Tejada et al. // *Rev Esp Enferm Dig.* -2001.-Vol.93. -№11.-P. 693-706.
27. Quintana J.M., Cabriada J., Arostegui I. et al. Quality of life outcomes with laparoscopic vs open cholecystectomy // *Surg. Endosc.* - 2003.-Vol. 17.- P. 1129—1134.
28. Russell M.L. Disease-specific quality of life: the Gallstone Impact Checklist / M.L. Russell, R. M. Preshaw, R. F. Brant et al. // *Clin. Invest Med.*- 1996.- Vol.19.- №6.-P. 453-60.
29. Rydbeck D. Health-Related Quality-of-Life in a cohort undergoing cholecystectomy / D. Rydbeck, B. Anesten, T. Barje et al. // *Ann Med Surg (Lond).*- 2015.- Vol.4.- №1.-P. 22-5.
30. Sandblom G. Validation of Gastrointestinal Quality of Life Index in Swedish for assessing the impact of gallstones on health-related quality of life / G. Sandblom, P. Videhult, B.M. Karlson et al. // *Value Health.* -2009.-Vol.12.-№1.-P. 181-184.
31. Shi H.Y., Lee K.T., Lee H.H. et al. Postcholecystectomy quality of life: a prospective multicenter cohort study of its associations with preoperative functional status and patient demographics // *J. Gastrointest. Surg.*— 2009.— Vol. 13.— P. 1651—1658.
32. Slim K. First validation of the French version of the Gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI) / K.Slim, J. Bousquet, F. Kwiatkowski et al. // *Gastroenterol Clin Biol.*- 1999/-Vol.23.-№1.-P. 25-31.
33. Yeung SM. Translation and validation of the Chinese version of the Gastrointestinal Quality of Life Index in patients with gastric tumor / SM Yeung, ATY Shiu, CR Marti, K-M. Chu // *Journal of Psychosomatic Research.* -2006.-Vol.61.-№4.-P. 469-477.

## SUMMARY

### ASSESSMENT OF THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS AFTER CHOLECYSTECTOMY

<sup>1</sup>Koishibayeva L., <sup>1</sup>Turgunov Ye., <sup>2</sup>Sandblom G., <sup>1</sup>Teleuov M., <sup>1</sup>Baimuratova M.

<sup>1</sup>Karaganda State Medical University, Kazakhstan; <sup>2</sup>Department of Surgery, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

Assessment of the quality of life (QOL) in modern medicine takes an important role, and can also provide a comprehensive evaluation of the patient's health status. The article presents the data of our own research evaluating the QOL of patients after cholecystectomy for a period of

0.7 to 4.1 years. The patients were interviewed using the international questionnaire - Gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI).

QOLs were evaluated depending on factors such as postoperative time, type of hospitalization, sex, age, marital status, changes in the gallbladder structure, activity, duration of hospitalization, and the type of surgical access. As a result of the research, it was determined that the increase in the QOL index correlates with the period elapsed since the surgery. Positive effects on QOL were influenced by such factors as patients' staying with the family, the planned of cholecystectomy (vs. urgent surgery), laparotomic surgical access, age and sex. QOL also proved to be higher in patients with chronic changes in the gallbladder.

**Keywords:** quality of life, cholelithiasis, cholecystectomy, GIQLI.

## РЕЗЮМЕ

### ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ

<sup>1</sup>Койшибаева Л.М., <sup>1</sup>Тургунов Е.М., <sup>2</sup>Сандблум Г., <sup>1</sup>Телеуов М.К., <sup>1</sup>Баймуратова М.Г.

<sup>1</sup>Карагандинский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Госпиталь Каролинского университета, отделение хирургии, Стокгольм, Швеция

Оценка качества жизни (КЖ) на сегодняшний день играет значимую роль, так как позволяет оценить не только эффективность различных методов лечения, но и дать комплексную оценку состояния здоровья пациента. В статье представлены данные собственных исследований по оценке КЖ пациентов, перенесших холецистэктомию. Сроки от момента операции до анкетирования варьировали в пределах от 0,7 до 4,1 лет. Опрос пациентов осуществлялся при помощи международного опросника Gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI).

КЖ оценивали в зависимости от влияния таких факторов как время, прошедшее после операции, тип госпитализации, пол, возраст, семейный статус, изменения в желчном пузыре, активность пациента, сроки нахождения в стационаре, а также вид хирургического доступа. В результате исследования выявлено, что увеличение индекса КЖ коррелирует с периодом, прошедшим с момента операции. Положительное влияние на КЖ оказывают такие факторы, как проживание пациентов в семье, плановый характер холецистэктомии, лапаротомный хирургический доступ, возраст, пол. Установлено, что при хроническом холецистите показатели КЖ выше  $M=132,36$  ( $SD=10,35$ ), чем при остром холецистите.

რეზიუმე

ცხოვრების ხარისხის შეფასება პაციენტებში ხოლმეცისტეკტომიის შემდეგ

<sup>1</sup>ლ. კოიშიბაევა, <sup>1</sup>ე. ტურგუნოვი, <sup>2</sup>გ. სანდბლომი, <sup>1</sup>მ. ტელეულოვი, <sup>1</sup>მ. ბაიმურატოვა

<sup>1</sup>ყარაგანდის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი; <sup>2</sup>კაროლონის უნივერსიტეტის პოსტიპიტალი, ქირურგიის განყოფილება, სტოკჰოლმი, შვედეთი

ცხოვრების ხარისხის (ცხ) შეფასებას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება, ვინაიდან შესაძლებელი ხდება შეფასდეს სხვადასხვა სამკურნალო მეთოდების ეფექტურობა და ამავდროულად პაციენტის ჯანმრთელობის საერთო მდგომარეობა.

სტატიაში მოყვანილია საკუთარი კვლევის

შედეგები იმ პაციენტების ცხ შეფასების შესახებ, რომლებსაც ჩაუტარდათ ხოლმეცისტეკტომია 0,7-4,1 წლის წინ.

პაციენტების გამოკითხვა მიმდინარეობდა სპეციალური კითხვარების გამოყენებით (საერთაშორისო კითხვარი). ჩხოვრების ხარისხი შეფასდა ისეთი ფაქტორების გათვალისწინებით, როგორცაა ოპერაციის შესრულებიდან გასული დრო, პოსტიპიტალი-ზაციის ტიპი, პაციენტების სქესი, ასაკი, ოჯახური სტატუსი, ნაღვლის ბუშტში ცვლილებები, სტაციონარში ყოფნის ვადები ქირურგიული მიდგომის ტიპი.

კვლევის შედეგად გამოვლინდა, რომ ცხ-ის ინდექსის მატება დამოკიდებულია ოპერაციის მომენტიდან გასულ პერიოდზე. ცხ-ზე დადებით გავლენას ახდენს შემდეგი ფაქტორები: ხოლმეცისტეკტომიის გეგმიური ხასიათი, ლაპორტომიული ქირურგიული მიდგომა, ასაკი, სქესი, ოჯახთან ერთად ცხოვრება.

## ПОПУЛЯЦИОННО-КЛАСТЕРНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ ЖЕНЩИН

Гулзода М.К., Халимова Ф.Т., Шукуров Ф.А., Гулин А.В.

*Таджикский государственный медицинский университет имени Абуали ибни Сино (Авиценны),  
Душанбе, Республика Таджикистан*

Репродуктивное здоровье выделяется своей общественно-политической значимостью; охрана репродуктивного здоровья женщин фертильного возраста является одной из основных медико-социальных проблем, поскольку именно женское население является основным потенциалом страны, ее демографическим ресурсом, без которого невозможен ни экономический, ни социальный рост государства [2,4,15].

Последние десятилетия ушедшего столетия характеризуются значительными достижениями в области диагностики и лечения различных форм нарушения фертильности [1,21]. Особое значение имеет связь нарушений репродуктивной функции женского организма с его расовыми и этническими признаками, климато-географическими, социально-экономическими и экологическими условиями, в которых проживает женщина [14,22].

Адекватное приспособление организма женщины к окружающей среде, в основном, обеспечивается влиянием половых гормонов, изменение концентрации которых приводит к существенному различию в гуморальной регуляции функций организма [3,7,17,20].

Нарушения репродуктивной функции у женщин (бесплодие, невынашивание беременности, мертворождение) в большинстве случаев связаны с эндокринной патологией. В структуре бесплодного брака на долю эндокринного женского бесплодия приходится около 30-40% [5].

Новые перспективные направления по оценке здоровья населения перед современной медицинской наукой открывает популяционная генетика человека [6,8,10]. Число проводимых в этом направлении исследований по сей день невелико, не получили должного освещения вопросы влияния генетических характеристик на состояние репродуктивного здоровья женщин, а имеющиеся данные часто носят противоречивый характер [9].

Особенно актуальными считаются вопросы иммуногенетики, основанные на HLA-генотипировании, которые уже сегодня приносят результаты, активно внедряемые в клиническую практику [12,13,16].

Вышеуказанные проблемы, несмотря на активное их изучение, имеют множество «белых пятен», при этом наибольшую актуальность сохраняют вопросы,

связанные с наличием рисков нарушений женского репродуктивного здоровья, позволяющих прогнозировать их развитие.

Несмотря на достигнутые успехи, вопросы прогнозирования гормональных и иммунных нарушений, угрожающих репродуктивному здоровью, особенно на уровне широкомасштабных скрининговых исследований, находятся еще на стадии обсуждения.

С этой точки зрения особого внимания заслуживают попытки перейти на количественный уровень оценки отдельных факторов риска нарушений репродуктивной функции у женщин путем внедрения шкал, интегрирующих наиболее информативные факторы риска. Первые попытки в этом направлении осуществлены английскими учеными по оценке патогенетического значения антифосфолипидного синдрома в нарушении женского репродуктивного здоровья [11,18,19].

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилось определение возможности использования популяционного подхода к оценке рисков нарушений репродуктивного здоровья у женщин фертильного возраста.

**Материал и методы.** Работа выполнена в рамках Международных научных исследований СНГ, проводимых Липецким государственным педагогическим университетом на кафедре медико-биологических дисциплин (Россия) и Таджикским государственным медицинским университетом (Республика Таджикистан).

Под наблюдением находились 240 клинически здоровых женщин в возрасте от 20 до 43 лет, 120 (50%) из них проживали на территории Среднечерноземного региона России, 120 - на территории Таджикистана.

В ходе исследования определялись популяционные различия у женщин с различной этнической принадлежностью и разными регионами проживания с учетом генетических, гормональных, иммунных признаков.

У всех женщин проводился забор венозной крови с целью HLA-типирования методом молекулярно-генетического анализа и определения диапазона нормативных значений показателей гормонального и иммунного статусов, признаков антифосфолипидной реакции в каждой популяции.

Образцы ДНК получали из лимфоцитов периферической крови, используя наборы реагентов и протокол для выделения ДНК из различного биологического материала (фирма «DLAtom™ DNAPrep 100», Россия).

Определение полиморфных аллелей локусов HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 проводили с использованием набора реагентов фирмы «ДНК-Технология» (Россия) в соответствии с инструкцией по применению, рекомендуемой фирмой-изготовителем.

Молекулярно-генетический анализ проводили на термоциклере производства ООО «НПО ДНК-технология» (Россия) ДТпрайм с использованием

программного обеспечения, поддерживающего автоматическую обработку данных.

Гормональный статус изучали по показателям гипоталамо-гипофизарно-яичниковой, тиреоидной, кортикостероидной систем у женщин различных этнических групп с учетом климато-географических условий проживания. Изучали концентрацию гонадотропинов - фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), пролактина, эстрадиола, прогестерона, 17-ОН-прогестерона (17-ОП); тиреоидных гормонов - тиреотропного гормона (ТТГ), общего трийодтиронина (Т3), общего тироксина (Т4); андрогенов - тестостерона, дигидроэпиандростерона (ДГЭА-С); стероидного гормона - кортизола.

С целью исключения вариабельности данных обследование проводилось на 3-5 дни менструального цикла: ЛГ, ФСГ, эстрадиол (Е<sub>2</sub>), пролактин (ПРЛ), тестостерон (Т) и на 20-22-ой день цикла прогестерон (П).

Уровни гормонов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя наборы иммобилизованных моноклональных антител и других реагентов производства DRG (Германия) и комплекта аппаратуры (планшетный фотометр «OPSYS MR» (ридер) фирма «Dynex Technologies, США», планшетный вошер ПП2-428 фирмы «ИММЕДТЕХ», Россия, принтер «EPSON») в соответствии с инструкциями по применению приборов и реагентов. Обработку результатов проводили в автоматическом режиме с помощью прибора DRGELIZAMAT с его компьютерным обеспечением DRG Regression Program.

Определение числа В1-лимфоцитов крови проводилось в отдельной пробе крови; в каждом случае использовался комплект из двух моноклональных антител: меченные PE-Cy5 anti-CD19 МКАТ (IOTest, Beckman Coulter, США) и меченные PE anti-CD5 МКАТ (IOTest, Beckman Coulter, США). Исследование проводилось в полном соответствии с инструкцией по использованию приборов и моноклональных антител.

При оценке роли аутоиммунного компонента в нарушении репродуктивного здоровья изучались уровни аутоантител к тиреоглобулину, тиреопероксидазе.

Для определения степени информативности изучаемых факторов и количественных показателей проводился дисперсионный анализ с вычислением стандартизированного канонического коэффициента дискриминантной функции (СККДФ).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программ SPSS и включала дискриптивную и сравнительную непараметрическую статистику, дискриминантный, регрессионный анализ, однофакторный дисперсионный анализ, расчет 95% доверительных интервалов, построение ROC-кривых.

**Результаты и их обсуждение.** Проведен анализ 30 лабораторных показателей, из них высокоинформативными оказались только 9. Ранжирование последних по степени информативности представлено в таблице 1.

Таблица 1. Стандартизированные канонические коэффициенты дискриминантной функции информативных показателей крови у женщин, принадлежащих разным популяциям

Показатели крови	[СККДФ]
Уровень кортизола (нмоль/л)	7,750
Уровень прогестерона (нмоль/л)	4,098
Уровень аутоантител к тиреоглобулину (МЕ/мл)	3,220
Уровень эстрадиола (пмоль/л)	2,942
Уровень общего тироксина Т4 (нмоль/л)	1,893
Уровень аутоантител к тиреопероксидазе (МЕ/мл)	1,319
Число В-лимфоцитов, CD19+ (%)	0,727
Число цитотоксических Т-лимфоцитов, CD3+CD8+ (%)	0,630
Число естественных киллеров, CD16+CD56+ (%)	0,564

Из таблицы 1 следует, что наиболее информативным показателем при выявлении популяционных различий у российских и таджикских женщин служит уровень кортизола. Довольно высоким рангом в разграничении показателей обладают уровни таких половых гормонов как прогестерон и эстрадиол, а также гормон щитовидной железы - Т4. Высокая информативная значимость присуща уровню аутоантител к факторам щитовидной железы - тиреопероксидазе. Завершают список информативных показателей количественного содержания отдельных лимфоцитов в крови В-клетки,

цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), естественные киллеры (ЕК).

Для определения характера наблюдаемых различий по выявленным информативным показателям у представителей наблюдаемых этнических групп проведено сравнение количественных данных, результаты представлены в таблице 2 и на рис. 1. Для сопоставимости и наглядности выявленных различий по результатам исследования на рисунке показаны проценты отклонения показателей у таджикских женщин от таковых у представительниц российской популяции.

Таблица 2. Информативные показатели крови у женщин, принадлежащих разным популяциям

Показатели крови	Медиана показателя [минимум, максимум]		Р
	российские женщины, n = 120	таджикские женщины, n = 120	
Прогестерон (нмоль/л)	40,8 [19,1; 60,0]	34,6 [16,3; 40,3]	0,011
Эстрадиол (пмоль/л)	266,8 [227,9; 310,0]	249,2 [226,5; 254,2]	0,014
Общий тироксин Т4 (нмоль/л)	104,6 [82,7; 129,9]	99,7 [78,0; 120,0]	0,001
Кортизол (нмоль/л)	264,6 [207,4; 350,0]	251,0 [246,5; 350,0]	0,001
Аутоантитела к тиреоглобулину (МЕ/мл)	91,6 [82,4; 98,6]	54,7 [51,2; 85,2]	< 0,001
Аутоантитела к тиреопероксидазе (МЕ/мл)	45,0 [38,8; 52,0]	24,4 [21,6; 47,0]	< 0,001
В-лимфоциты, CD19+ (%)	7,1 [4,2; 13,6]	13,3 [9,5; 19,9]	< 0,001
ЦТЛ, CD3+CD8+ (%)	18,7 [16,1; 28,3]	21,5 [13,2; 24,3]	< 0,001
ЕК, CD16+CD56+ (%)	12,5 [10,0; 20,4]	10,6 [3,2; 22,9]	< 0,001

примечание: n - число женщин в группе; p - вероятность различий показателей в группах сравнения; серым цветом обозначена достоверность различий по критерию Манна-Уитни при  $p < 0,005$

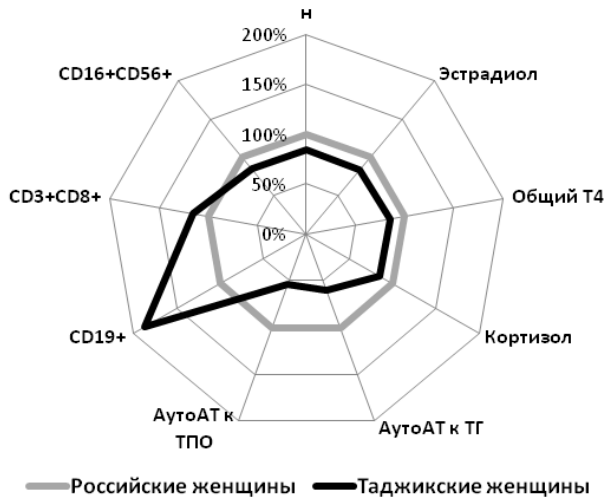


Рис. 1. Процент отклонения информативных показателей у таджикских женщин от таковых у российских женщин

Полученные результаты в полной мере подтвердили информативность отобранных показателей, поскольку все они показали достоверность межгрупповых различий. Характер этих различий наиболее отчетливо представлен на рисунке. Все информативные гормональные показатели, особенно уровень аутоантител к факторам щитовидной железы у женщин, принадлежащих к таджикской популяции, достоверно ниже. Число В-лимфоцитов в крови таджичек было в 1,9 раз выше, чем у россиянок. Незначительно выше в таджикской популяции был показатель цитотоксических Т-лимфоцитов, а содержание естественных киллеров в крови было достоверно ниже.

Известно, что основным источником аутоантител служит  $V_1$ -субпопуляция лимфоцитов. Содержание  $V_1$ -лимфоцитов в крови женщин различной популяционной принадлежности показано на рис. 2. Как следует из рисунка, содержание  $V_1$ -лимфоцитов в крови таджикских женщин почти в 2 раза выше, чем у представительниц российской популяции.

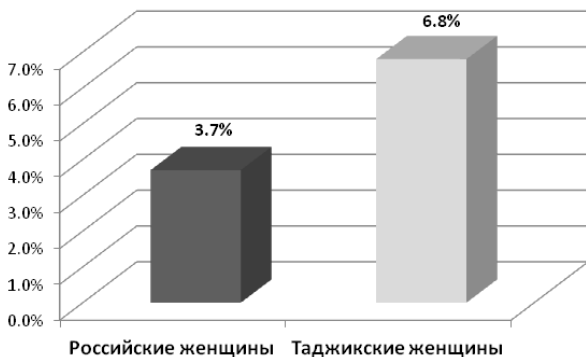


Рис. 2. Содержание  $V_1$ -лимфоцитов в крови женщин различной популяционной принадлежности

Отдельную категорию популяционных исследований составляет масштабный анализ особенностей

изучаемых категорий женщин на генетическом уровне. Исследование включало определение аллельных вариантов по трем локусам генов - HLA-D (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1), контролирующих иммунный ответ. Полученные результаты отражены на рис. 3-5.

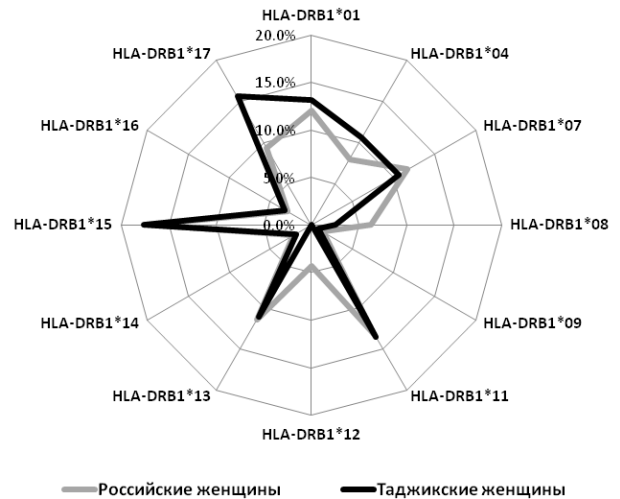


Рис. 3. Частота встречаемости различных аллелей локуса HLA-DRB1 у женщин российской и таджикской популяций

На рис. 3 показано, что существуют определенные популяционные различия по локусу гена HLA-DRB1. В популяции российских женщин чаще встречаются аллели HLA-DRB1\*08 и HLA-DRB1\*12, а в популяции таджикских женщин достоверно чаще регистрируются аллели HLA-DRB1\*04 и HLA-DRB1\*17, при чем аллель HLA-DRB1\*04 ассоциирована с более высокой частотой невынашивания беременности.

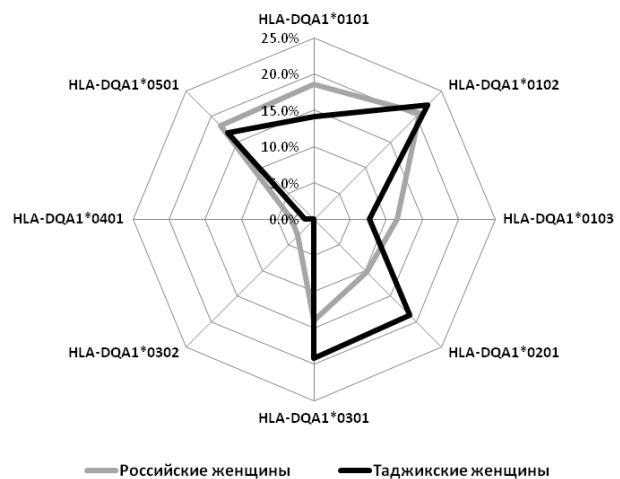


Рис. 4. Частота встречаемости различных аллелей локуса HLA-DQA1 у женщин российской и таджикской популяций

Из рисунка 4 следует наличие популяционных особенностей по локусу гена HLA-DQA1. В группе женщин российской популяции достоверно выше

частота встречаемости аллелей HLA-DQA1\*0101 и HLA-DQA1\*0103, из них первая ассоциирована с протективными свойствами в отношении патологии репродукции, а вторая, наоборот, с невынашиванием беременности. В сравниваемой с ними популяции таджикских женщин достоверно чаще отмечены аллели HLA-DQA1\*0201 и HLA-DQA1\*0301. Как и в предыдущем случае, для аллели HLA-DQA1\*0201 нарушения репродуктивного здоровья не характерны, а в случае аллели HLA-DQA1\*0301 они сопутствуют ей.

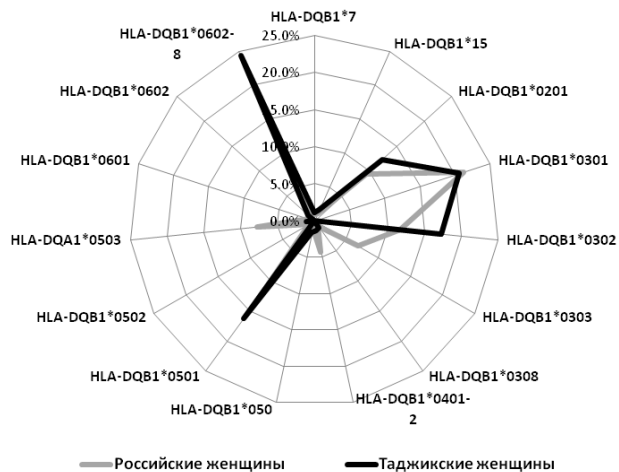


Рис. 5. Частота встречаемости различных аллелей локуса HLA-DQB1 у женщин российской и таджикской популяций

Выявленные отличия между популяциями по локусу гена HLA-DQB1 (рисунок 5) включают более высокую встречаемость у российских женщин аллелей HLA-DQB1\*0303 и HLA-DQB1\*0503. В популяции таджикских женщин с весьма высокой и достоверно отличающейся частотой регистрировались аллели HLA-DQB1\*0302 и HLA-DQB1\*0602-8, первая из которых считается неблагоприятной по ассоциации с нарушением репродуктивной функции.

**Выводы.** Популяционный подход, основанный на использовании дискриминантного анализа, является высокоэффективным способом группировки женщин в соответствии с состоянием их репродуктивного здоровья и факторами риска, обусловившими нарушение репродукции.

Факторы риска, обусловившие нарушение репродукции, различны по сочетанию и проявлению в популяциях российских и таджикских женщин, за исключением неблагоприятных аллельных вариантов генов HLA-DRB1\*04 и HLA-DQA1\*0103, одинаковых в обеих популяциях.

Таким образом, установлено, что между популяциями российских и таджикских женщин существуют различия по ряду параметров гормонального и иммунного статусов, а также на уровне аллельных вариантов генов, контролируемых иммунный ответ. При этом благоприятные и неблагоприятные с точки зрения нарушений репродукции аллели встречаются примерно с одинаковой

частотой. Полученные данные показали, что в разных популяциях при оценке репродуктивного здоровья необходим дифференцированный подход как к установлению физиологических норм по данным категориям параметров, так и к оценке репродуктивного здоровья женщин.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова, Е.М. Влияние этнических особенностей на адаптационные процессы женского организма в репродуктивном периоде [Текст] / Е.М.Александрова, Т.Л.Боташева, Н.В.Ермолова, А.В.Хлопонина, Е.В.Плигина // Медицинский вестник Юга России, 2013. - № 4. - С. 5-8.
2. Аполихин, О.И. Современная демографическая ситуация и проблемы улучшения репродуктивного здоровья населения России [Текст] / О.И.Аполихин, Н.Г.Москалева, В.А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология, 2015. - № 4. - С. 4-14.
3. Борисова, О.И. Сравнительная эколого-физиологическая характеристика зависимости репродуктивной функции женщин от уровня показателя антропотехногенной нагрузки [Текст] / О.И.Борисова // Вестник Авиценны, 2008. - № 2 (35). - С. 22-25.
4. Данишевский, К.Д. Репродуктивное здоровье: Глобальные цели развития и экономический потенциал России / К.Д.Данишевский // Медицина, 2013. - N 2. - С. 13-28.
5. Елифанов, А.В. Уровень гонадотропных и половых гормонов при некоторых формах эндокринного бесплодия у женщин / А.В.Елифанов, О.Н.Лепунова // Вестник Тюменского государственного университета, 2014. - № 6. - С. 114-122.
6. Иванов, В.П. Формирование чувашской диаспоры [Текст] / В.П.Иванов // В кн: Расы и народы: современные этнические и расовые проблемы. – М.: Наука, 2003. – Вып. 29., - С. 105-124.
7. Захряпина, Л.В. Этнические особенности течения беременности и исходы родов у женщин, проживающих в условиях агропромышленного региона [Текст] / Л.В.Захряпина // Сборник научных трудов аспирантов и соискателей. Липецк: ЛГПУ, 2009. - Вып. 6, часть 1. - С. 107-108.
8. Коновалова, С.Г. Экологическая морфология фетоплацентарной системы (обзор литературы) [Текст] / С.Г.Коновалова, Н.А.Контеева // Экология человека, 2005. - № 2. - С. 17-24.
9. Пахомов, С.П. Региональные особенности репродуктивного здоровья женщин и факторы, способствующие их формированию [Текст] / С.П.Пахомов // Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Москва, 2006. - 41 с.
10. Чурносков М.И. Генетико-демографическая структура и распространенность мультифакториальных признаков в популяции курской области [Текст] / М.И.Чурносков // Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Курск, 1997. - 39 с.
11. Bertolaccini, M.L. Recent advances in understanding antiphospholipid syndrome [Text] / M.L.Bertolaccini, G.Sanna // F1000Res, 2016. - Vol. 5. - P. 2908-2923.
12. Chen S., Liu Y., Sytwu H. Immunologic regulation in

pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation [Text] / S.Chen, Y.Liu, H.Sytwu // *Clin Develop Immunol*, 2012. – Vol. 2012. – P. 1-10.

13. Choudhury, S.R. Human reproductive failure II immunological factors [Text] / S.R.Choudhury, L.A.Knapp // *Hum. Reprod. Update*. – 2000. – Vol. 7(2). – P. 135-160.

14. Dadvand, P. Inequality, green spaces, and pregnant women: roles of ethnicity and individual and neighbourhood socioeconomic status [Text] / P.Dadvand, J.Wright, D.Martinez et al. // *Environ Int*, 2014. – Vol. 71. – P. 101-108.

15. Lassi, Z.S. Strategies for improving health care seeking for maternal and newborn illnesses in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis [Text] / Z.S.Lassi, P.F.Middleton, Z.A.Bhutta, C.Crowther // *Glob Health Action*, 2016. – Vol. 9, N 1. – P. 31408.

16. Martin, J.M. HLA class I, II, III antigen sharing. Is not found in couples with unexplained infertility? J.M.Martin, J.Vicario, I.Luque // *J Fertil Menopausal study*, 1993. – Vol. 38, N 5. – P. 280-288.

17. Muller, A.F. Consequences of autoimmune thyroiditis before, during and after pregnancy / A.F.Muller, A.Berghout // *Minerva Endocrinol*, 2003. – Vol. 28, N 3. – P. 247-54.

18. Otomo, K. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events [Text] / K.Otomo, T.Atsumi, O.Amengual et al. // *Arthritis Rheum*, 2012. – Vol. 64, N 2. – P. 504-512.

19. Sciascia, S. Risk Scale for the diagnosis of antiphospholipid syndrome [Text] / S.Sciascia, D.Cosseddu, B.Montaruli et al. // *Ann Rheum Dis*, 2011. – Vol. 70, N 8. – P. 1517-1518.

20. Shatavi, S.Y. Association of unexplained infertility with gonadotropin and ovarian antibodies S.Shatavi, B.Lianes, J.L.Luborsky // *Am J Reprod Immunol*, 2000. – Vol. 56, N 5-6. – P. 286-291.

21. Sletner, L. Ethnic differences in neonatal body composition in a multi-ethnic population and the impact of parental factors: a population-based cohort study [Text] / L.Sletner, B.Nakstad, C.S.Yajnik et al. // *PLoS One*, 2013. – Vol. 8, N 8. – P. 730-758.

22. Wakeel, F. Racial and ethnic disparities in personal capital during pregnancy: findings from the 2007 Los Angeles mommy and baby (LAMB) study [Text] / F.Wakeel, W.P.Witt, L.E.Wisk et al. // *Matter child health J*. – 2014. – Vol. 18(1). – P. 209-222.

## SUMMARY

### POPULATION AND CLUSTER APPROACH TO ASSESSMENT OF REPRODUCTIVE HEALTH OF WOMEN

**Gulzoda M., Khalimova F., Shukurov F., Gulin A.**

*Avicenna Tajik State Medical University, Dushanbe*

The purpose of this study was to explore the possibility of using a population approach to assessing the risk of

reproductive health disorders in women of childbearing age.

We observed 240 clinically healthy women aged 20 to 43 years, half of them lived in the Middle Black Earth region of Russia, and 120 women lived in Tajikistan. The study identified population differences in women with different ethnic backgrounds and regions of residence according to a set of genetic, hormonal, and immune signs.

All women underwent venous blood sampling for the purpose of HLA typing by molecular genetic analysis and determining the range of normative values of hormonal and immune status parameters. DNA samples were obtained from peripheral blood lymphocytes using reagent kits and a protocol for isolating DNA from various biological materials from DLA<sup>TM</sup> DNAPrep 100 (Russia).

Hormonal status was studied in terms of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, estradiol, progesterone, 17-OH-progesterone; Thyroid hormones - thyroid-stimulating hormone, total triiodothyronine, total thyroxine; Androgens - testosterone, dihydroepiandrosterone; Steroid hormone-cortisol.

In order to exclude the variability of the data, the examination was carried out on the 3-5th days of the menstrual cycle: luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol, prolactin, testosterone and on the 20-22nd Day of the progesterone cycle.

Statistical data processing was carried out on the basis of SPSS programs and included descriptive and comparative nonparametric statistics, discriminant, regression analysis, one - factorial analysis of variance, calculation of 95% confidence intervals, construction of ROC curves.

The study included the determination of allelic variants at the three loci of the HLA-D genes (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) controlling the immune response. Population differences in the locus of the HLA-DRB1 gene were determined. The HLA-DRB1 \* 08 and HLA-DRB1 \* 12 alleles are found in the Russian women's population, and the HLA-DRB1 \* 04 and HLA-DRB1 \* 17 alleles are more reliably detected in the Tajik women's population, while the HLA-DRB1 \* 04 allele is associated with a higher incidence of miscarriage. The population characteristics of the HLA-DQA1 gene locus were also established. In the group of women of the Russian population, the incidence of HLA-DQA1 \* 0101 and HLA-DQA1 \* 0103 alleles is significantly higher, of which the former is associated with protective properties for reproductive pathology, and the latter, on the contrary, with miscarriage. At the same time, the alleles HLA-DQA1 \* 0201 and HLA-DQA1 \* 0301 were significantly more often detected in the compared with the population of Tajik women. As in the previous case, for the HLA-DQA1 \* 0201 allele reproductive health disorders are not characteristic, and in the case of the HLA-DQA1 \* 0301 allele they accompany it.

Our studies have revealed that there are differences between the populations of Russian and Tajik women in a number of parameters of the hormonal and immune status, as well as at the level of allelic variants of genes that control the immune response. The population approach, based on the use of discriminant analysis, is a highly effective way of grouping women according to their reproductive health status and the risk factors that caused reproductive damage. The risk factors that caused the reproductive failure are different in combination and manifestation in the populations of Russian and Tajik women, except for the adverse allelic variants of the HLA-DRB1 \* 04 and HLA-DQA1 \* 0103 genes, which are the same in both populations. The obtained data also show that in different populations in the evaluation of reproductive health a differentiated approach is needed both to establish physiological norms in these categories of parameters and to assess the reproductive health of women.

**Keywords:** population, reproductive health, risk factor, gene locus, hormonal status.

## РЕЗЮМЕ

### ПОПУЛЯЦИОННО-КЛАСТЕРНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ ЖЕНЩИН

Гулзода М.К., Халимова Ф.Т., Шукуров Ф.А., Гулин А.В.

*Таджикский государственный медицинский университет имени Абуали ибни Сино (Авиценны), Душанбе, Республика Таджикистан*

Целью данного исследования явилось определить возможности использования популяционного подхода к оценке рисков нарушений репродуктивного здоровья у женщин фертильного возраста.

Под наблюдением находились 240 клинически здоровых женщин в возрасте от 20 до 43 лет, 120 из них проживали на территории Средне-черноземного региона России, 120 женщин - на территории Таджикистана. У женщин с различной этнической принадлежностью и регионами проживания определялись популяционные различия с учетом генетических, гормональных, иммунных признаков.

Проводился забор венозной крови с целью HLA-типирования методом молекулярно-генетического анализа, определялся диапазон нормативных значений показателей гормонального и иммунного статуса. Образцы ДНК получали из лимфоцитов периферической крови, используя наборы реагентов фирмы «DLAtom™DNAPrep 100» (Россия) и протокол для выделения ДНК из различного биологического материала.

Гормональный статус изучали по показателям фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, пролактина, эстрадиола, прогестерона,

17-ОН-прогестерона; тиреоидных гормонов - тиреотропного гормона, общего трийодтиронина, общего тироксина; андрогенов - тестостерона, дигидроэпиандростерона; стероидного гормона - кортизола.

С целью исключения variability данных обследование проводилось на 3-5 дни менструального цикла: лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон, эстрадиол, пролактин, тестостерон на 20-22-ой день цикла прогестерон.

Статистическая обработка данных проводилась на основе программ SPSS и включала дискриптивную и сравнительную непараметрическую статистику, дискриминантный, регрессионный анализ, однофакторный дисперсионный анализ, расчет 95% доверительных интервалов, построение ROC-кривых.

Отдельную категорию популяционных исследований составлял анализ особенностей изучаемых категорий женщин на генетическом уровне. Исследование включало определение аллельных вариантов по трем локусам генов HLA-D (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1), контролирующих иммунный ответ.

Проведенные исследования позволили установить, что между популяциями российских и таджикских женщин существуют различия по ряду параметров гормонального и иммунного статуса, а также на уровне аллельных вариантов генов, контролирующих иммунный ответ. Популяционный подход, основанный на использовании дискриминантного анализа, является высокоэффективным способом группировки женщин в соответствии с состоянием их репродуктивного здоровья и факторами риска, обусловившими нарушение репродукции. Факторы риска, обусловившие нарушение репродукции, различны по сочетанию и проявлению в популяциях российских и таджикских женщин, за исключением неблагоприятных аллельных вариантов генов HLA-DRB1\*04 и HLA-DQA1\*0103, одинаковых в обеих популяциях. Полученные данные показывают также, что в разных популяциях при оценке репродуктивного здоровья необходим дифференцированный подход как к установлению физиологических норм по данным категориям параметров, так и к оценке репродуктивного здоровья женщин.

## რეზიუმე

პოპულაციურ-კლასტერული მიდგომა ქალების რეპროდუქციული ჯანმრთელობის შეფასებისადმი

მ. გულდოზა, ფ. ხალიმოვა, ფ. შუკუროვი, ა. გულინი

ტაჯიკეთის აბუალი იბნ სინას სახ. სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, დუშანბე, ტაჯიკეთი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა პოპულაციური მიდგომის გამოყენების შესაძლებლობის შეფასება ფერტილური ასაკის ქალების



რეპროდუქციული ჯანმრთელობის დარღვევების რისკის განსაზღვრისათვის.

დაკვირვების ქვეშ ომყოფებოდა 20-43 წლის ასაკის კლინიკურად ჯანმრთელი 240 ქალი, რომელთა ნახევარი ცხოვრობდა რუსეთის შუა-შავშიწა რეგიონში, ნახევარი კი – ტაჯიკეთის ტერიტორიაზე. კვლევის დროს გენეტიკური, ჰორმონული და იმუნური ნიშნებით განისაზღვრებოდა პოპულაციური განსხვავებანი სხვადასხვა ეთნიკური კუთვნილების და სხვადასხვა რეგიონში მცხოვრებ ქალთა შორის.

ყველა ქალის ორგანიზმიდან მიღებული ვენური სისხლის მასალაზე მოლეკულურ-გენეტიკური ანალიზის მეთოდით ტარდებოდა HLA-გენოტიპირება და განისაზღვრებოდა ჰორმონული და იმუნური სტატუსის ნორმატიული მაჩვენებლების დიაპაზონი. დნმ-ის ნიმუშები მიიღებოდა პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებიდან ფირმა “DLAtom™ DNAPrep 100”-ის რეაგენტების ნაკრებების გამოყენებით და სხვადასხვა ბიომასალიდან დნმ-ის გამოსაყოფად დადგენილი პროტოკოლის შესაბამისად.

ჰორმონული სტატუსი ფასდებოდა ფოლიკულმასტიმულირებელი ჰორმონის, ლუთეინური ჰორმონის (ლჰ), პროლაქტინის, ესტრადიოლის, პროგესტერონის, 17-OH-პროგესტერონის, თირეოტროპული ჰორმონის, საერთო ტრიოდთირონინის, საერთო თიროქსინის, ტესტოსტერონის, დიჰიდროეპიანდროსტერონის და კორტიზოლის მაჩვენებლების განსაზღვრით მყარი იმუნოფერმენტული ანალიზის მეთოდით.

მაჩვენებლების ვარიაბელობის გამორიცხვის მიზნით ლჰ, ფჰჰ, ესტრადიოლი, პროლაქტინი და ტესტოსტერონი განისაზღვრებოდა ოვარიულ-მენსტრუალური ციკლის მე-3-5 დღეს, პროგესტერონი კი – 20-22 დღეს.

გენეტიკური პროფილი ფასდებოდა იმუნური პასუხის მაკონტროლებელი გენების - HLA-D სამი ლოკუსის (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) ალელური ვარიანტების განსაზღვრით. დადგენილია პოპულაციური განსხვავებანი ლოკუსში HLA-DRB1. მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება ხორციელდებოდა პროგრამით SPSS და მოიცავდა დისკრიპციულ და შედარებით არაპარამეტრულ სტატისტიკას, დისკრიმინაციულ რეგრესიულ ანალიზს, ერთფაქტორიან დისპერსიულ ანალიზს, სარწმუნო ინტერვალების 95%-ის გამოთვლას, ROC-მრუდების აგებას.

ჩატარებული კვლევით დადგენილია, რომ რუსეთის და ტაჯიკეთის ქალთა პოპულაციებს შორის მნიშვნელოვანი განსხვავებაა ჰორმონული და იმუნოლოგიური სტატუსის რიგი პარამეტრების თვალსაზრისით, ასევე, იმუნური პასუხის მაკონტროლებელი გენების ალელური ვარიანტების დონეზე. დისკრიმინაციული ანალიზის გამოყენებაზე დაფუძნებული პოპულაციური მიდგომა წარმოადგენს მაღალეფექტურ საშუალებას ქალების დაჯგუფებისათვის მათი რეპროდუქციული ჯანმრთელობის მდგომარეობის და რეპროდუქციის დარღვევის გამომწვევი რისკ-ფაქტორების შესაბამისად. ასეთი რისკ-ფაქტორები, შერწყმისა და გამოვლინების თვალსაზრისით, რუსეთის და ტაჯიკეთის ქალთა პოპულაციაში განსხვავებულია, გარდა გენების ალელური ვარიანტებისა HLA-DRB1\*04 და HLA-DQA1\*0103, რომელიც ერთნაირია ორივე პოპულაციაში.

მიღებული შედეგები ადასტურებს, რომ სხვადასხვა პოპულაციაში რეპროდუქციული ჯანმრთელობის განსაზღვრისას დიფერენციული მიდგომა აუცილებელია როგორც ზემოაღნიშნული კატეგორიის პარამეტრების ფიზიოლოგიური ნორმების დადგენისას, ასევე, ქალთა რეპროდუქციული ჯანმრთელობის შეფასების დროს.

## INSULIN LIKE GROWTH FACTOR 1 POSSIBLE DEPENDENCE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME OF NODULAR PATHOLOGY OF THE THYROID GLAND

<sup>1</sup>Rekvava M., <sup>1</sup>Dundua T., <sup>1</sup>Kobulia M., <sup>1</sup>Javashvili L., <sup>2</sup>Giorgadze E.

<sup>1</sup>Cortex Clinic Ltd, Tbilisi, Georgia; <sup>2</sup>National Institute of Endocrinology, Tbilisi, Georgia

Metabolic syndrome and nodular pathology of the thyroid gland is a widespread problem nowadays.

The number of patients with metabolic syndrome increases on daily basis. According to the data of International Diabetes Federation (IDF):

A quarter of adult population in the world suffers from metabolic syndrome. Back in the year 2006 the spreading of metabolic syndrome in Georgia comprised 23,16% [8].

Patients with metabolic syndrome have 5 times more risk of developing diabetes T2, 3 times more risk of developing cardiac diseases, and twice more risk of lethality, in comparison to those who do not suffer with metabolic syndrome. Out of 200 million people with diabetes, over 80 % die of systemic complications of cardiac diseases. These data prove that metabolic syndrome and diabetes T2 prevail over other diseases in lethality index (IDF.org).

Obesity, alongside with insulin resistance/hyperinsulinemia forms basis for the development of metabolic syndrome. Obesity is a problem of population worldwide. The number of obese people increases daily, 66% of adult population in the USA are diagnosed as obese or overweight. The increase in metabolic syndrome is associated with the increase in the percentage of obesity. Apart from metabolic syndrome, obesity is related to diseases like diabetes of type 2, arterial hypertension, ischemic cardiac disease, dislipidemie, atherosclerosis, cancer [14].

Recently there has been a notable coincidence between metabolic syndrome and nodular pathology of thyroid gland. Hence, it is interesting to reveal the connection between these two diseases.

Metabolic syndrome is a unity of various metabolic disorders, which represents of risk factor for diabetes of type 2 and cardiovascular diseases. Its main components are:

- Abdominal/visceral obesity;
- Insulin Resistance and hyperinsulinemia;
- Dislipidemie (especially hypertriglyceridemia);
- Arterial hypertension;
- Disorder of hemostasis (hypercoagulation) [2].

The chief component of metabolic syndrome is insulin resistance /hyperinsulinemia. The cells react to the activity of insulin by means of special insulin receptors. Insulin receptors belong to the family of tyrosine kinase receptors, which also includes insulin-like growth factor 1 (IGF1) receptor and insulin receptor related receptor (IRR).  $\alpha$  and  $\beta$  subunits complex, coded by IGF1 receptor gene, dimerizes not only with itself, in order to form IGF1 receptor, but also with  $\alpha$  and  $\beta$  subunits complex of insulin receptor via generating hybrid receptors. IGF1, insulin, and

hybrid receptors bind insulin and IGF1 with different affinity. Insulin regulates metabolism, while IGF1 influences the growth and proliferation. In the case of the metabolic syndrome, the activation of both hybrid and IGF1 receptors, followed by activation of cells proliferation process, results from hyperinsulinemia [17].

Insulin influences cell growth but the role of insulin-like growth factor system (IGF System) in the process of cell proliferation and growth is even more important. IGF System consists of IGF 1 and IGF 2, as well as their own cell receptors- IGF 1R and - IGF 2R, hybrid receptors -IR/IGF1R and 6 binding proteins IGFBP 1-6. Insulin-like growth factors are autocrine and paracrine regulators involved in mitogenesis, tissue and cellular differentiation, angiogenesis, etc. Both IGF 1 and IGF 2 are involved in the cell proliferation process, but it should be noted that IGF 2 is more active during embryogenesis, whereas in postnatal period the involvement of IGF 1 in cell growth and development is essential [7,13,15].

IGF 1 synthesis in the liver is intensified by the influence of somatotrophic hormone and insulin. Elevation of insulin level via hypoglycemic mechanism enhances the synthesis of somatotrophic hormone that has counter insulin action. Somatotrophic hormone, in turn, stimulates the release of IGF-1 that changes hyperglycemic effect of growth hormone [6]. The production of IGF 1 by the liver depends on both hormonal factors and eating behavior. In most type 2 diabetes patients who are overweight and hyperinsulinemia is presented, IGF 1 stimulates process evolutionary developed as a regulator of cell proliferation relative to alimentation factor. Insulin plays a key role in the synthesis of IGF 1. It regulates the production of IGF 1 by having an effect on growth hormone receptors and post receptor mechanisms [10]. In the normal condition, when the level of insulin and sensitivity of tissues towards insulin is within a normal range, somatotrophic hormone stimulates IGF 1 gene expression. Hypoglycemia stimulates the synthesis of counter-insulin hormones including somatotrophic hormone. In type 2 diabetes patients hyperinsulinemia does not have a stimulating effect on somatotrophic hormone expression, as insulin resistance causes elevation of glucose level in blood. Besides, IGF 1 itself, with its high level in type 2 diabetes patients, triggers reciprocal suppression of synthesis of somatotrophic hormone. This hormonal background in patients with type 2 diabetes together with other factors results in accumulation of fat in depots.

On the other hand G. A. Aguirre et al. [3] in the review “ insulin like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome” focused on the metabolic effects of IGF-1 and discussing whether IGF-1 replacement therapy.

In review we found data from multiple studies (in vitro and in vivo) demonstrate the association between IGF-1 deficit and deregulated lipid metabolism, cardiovascular disease (CVD), diabetes, and altered metabolic profile of diabetic patients.

Because IGF-1 is normally found at low levels in metabolic syndrome and T2D, maybe because of insulin cessation to inhibit IGFBP-1 production by the liver and because of decreased liver IGF-1 secretion by insulin stimulation, as insulin resistance prevails in the liver. Nevertheless, the mechanism of this possible inverse relationship between metabolic syndrome and free IGF-1 levels remains unclear [3].

There is a connection between the IGF1 - concentration and frequency of cancer. The growth hormone and IGF stimulates vascular endothelial cell proliferation, the angiogenesis on the whole, reparation of neural tissue, and glucose utilization by brain cells. The higher the probability of cancer development is, the higher cell proliferative activity and the lower the activity of cellular immunity, macrophages and reparation system are [1]. The risk of development of oncological diseases is higher in patients with metabolic syndrome, obesity and type 2 diabetes mellitus. It is established that individuals with diabetes have a higher risk of malignancies such as the liver, pancreas, colorectal and uterine cancer [12]. Thyroid cancer is most common with acromegalic patients. In the incidence of acromegaly the IGF 1 concentration is much higher compared to the normal range [9].

As it was mentioned above, IGF system governs cell proliferation. IGF 1 receptor and IGFBP are found in thyroid gland tissue [18]. The studies conducted on animals showed that this molecule stimulates the proliferation of thyroid epithelium [4,16]. A high level of IGF 1 receptor expression in the thyroid gland was confirmed in patients with Graves's disease and cancer [5,11].

Therefore, there emerged the opinion that the IGF 1- may have some effect on the thyroid cells, and consequently, on the development of thyroid nodular disease. So it is interesting to ascertain the relation between the concentration of IGF 1 and occurrence of thyroid nodules in patients with metabolic syndrome.

**Material and methods.** We have investigated 71 patients (59 women, 12 men) that have addressed clinic Cortex in 2015-2017 yy, age range was 18-82 y. Exclusion criterias were: diabetes mellitus, glyated hemoglobin levels > 7%, subjects receiving metformin either due to diabetes mellitus or metabolic syndrome.

Study had three groups: Group 1 – n=27 (5 male, 22 female) subjects with thyroid nodular disease, with the nodule size 4-18 mm (iso-, hypo- and hyper-echoic), and metabolic syndrome.

Group 2 – n=31 (4 male, 27 female) subjects with thyroid nodular disease and without metabolic syndrome. With nodule size 3-33mm (iso-, hypo- and hyper-echoic).

Group 3 – n=13 (3 male, 10 female) Subjects with metabolic syndrome and no thyroid pathology.

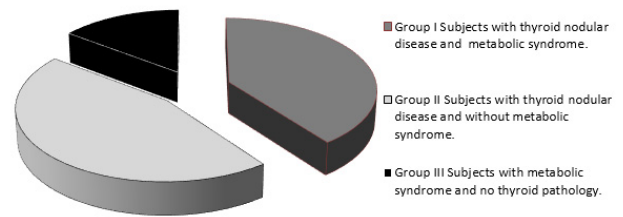


Fig. Visual image of groups

Height and weight assessment was performed with standard methods and techniques. Body mass index calculated as  $\text{weight(kg)} / \text{height}^2(\text{m}^2)$ .

Insulin sensitivity and resistance index were calculated with the new, improved, Homeostasis Model Assessment 2, Homa2-IR index in venous blood, after 8 hours of fasting.

Thyroid hormones - thyroid-stimulating hormone, free-T<sub>4</sub> and anti-thyroid antibodies - anti-TPO, anti-TG, were measured with ELISA method on semi-automatic analyzer DAS, as well as C-peptide and IGF1. HbA<sub>1c</sub> (glycated hemoglobin) was measured on automatic analyzer Smart 700/340, blood glucose measured with biochemical method on DiaSys StarDust Mc15.

Thyroid ultrasounds were performed with GE logiq Ultrasound, in several cases followed by US guided fine-needle aspiration biopsy.

**Results and their discussion.** Group 1 – n=27 nodular pathology and metabolic syndrome combination: every patient presented with high BMI (range 27-44)

C-Peptide (ref. 0,7-1,9 ng/ml) was elevated in 92,6% (n=25) and normal in 7,4% (n=2).

Glucose (ref. 4 -5,6 mmol/l) was in the normal range in 70,4% (n=19) and elevated in 29,6% (n=8).

HbA<sub>1c</sub> (ref. 4-6%) was in the reference range in 55,5% (n=15), slightly elevated (6,1%-6,7%) in 44,4% (n=12).

TSH (ref. 0,34-3,5  $\mu\text{IU/ml}$ ) normal in 74,1% (n=20), elevated in 25,9% (n=7).

FT<sub>4</sub> (ref. 0,8-2,0 ng/dl) in the normal range in 92,6% (n=25), elevated in 7,4% (n=2)

Antibodies (anti TG -ref. <125 IU/ml, anti TPO – ref. < 40 IU/ml) in the reference range in 81,5% (n=22), elevated in 18,5% (n=5)

IGF1 (age specific ref. : 19-39 y - 139-353 ng/ml, 40- 59 y - 111-257 ng/ml, 60-80 y -86-214 ng/ml) normal in 70,4 % (n=19), decreased in 29,6 % (n=8)

Group 2 – n=31 thyroid nodular pathology without metabolic syndrome: BMI was normal in 67,7% (n=21), elevated in 32,3 % (n=10). BMI elevation range was 27-34.

In the following group the parameters of carbohydrate metabolism (glucose, C-peptide, HbA<sub>1c</sub>) were in the normal range.

TSH (ref. 0,34-3,5  $\mu\text{IU/ml}$ ) normal in 83,9% (n=26), elevated in 9,7% (n=3), decreased in 6,4% (n=2).

FT<sub>4</sub> (ref. 0,8-2,0 ng/dl) in the normal range in 96,8 % (n=30) elevated in 3,2% (n=1).

Table 1. Nodular pathology and metabolic syndrome combination

	GRUP I – (n=27) nodular pathology and metabolic syndrome combination		
	normal	increased	decreased
BMI	-	27 (100%)	-
C-peptide	2 (7.4%)	25 (92.6%)	-
Glucose	19 (70.4%)	8 (29.6%)	-
HbA1c	15 (55.6%)	12 (44.4%)	-
TSH	20 (74.1%)	7 (25.9%)	-
FT <sub>4</sub>	25 (92.6%)	2 (7.4%)	-
Anti-TG; Anti-TPO	22 (81.5%)	5 (18.5%)	-
IGF1	19 (70.4%)	-	8 (29.6%)

Table 2. Thyroid nodular pathology without metabolic syndrome

	GRUP II – (n=31) Thyroid nodular pathology without metabolic syndrome		
	normal	Increased	decreased
BMI	21 (67.7%)	10 (32.3%)	-
C-peptide	31 (100%)	-	-
Glucose	31 (100%)	-	-
HbA1c	31 (100%)	-	-
TSH	26 (83.9%)	3 (9.7%)	2 (6.4%)
FT <sub>4</sub>	30 (96.8%)	1 (3.2%)	-
Anti-TG; Anti-TPO	20 (64.5%)	11 (35.5%)	-
IGF1	24 (77.4%)	-	7 (22.6%)

Table 3. Metabolic syndrome without thyroid nodular pathology

	GRUP III (n=13) metabolic syndrome without thyroid nodular pathology		
	normal	increased	decreased
BMI	-	13 (100%)	-
C-peptide	-	13 (100%)	-
Glucose	9 (69.2%)	4 (30.8%)	-
HbA1c	5 (38.5%)	8 (61.5%)	-
TSH	10 (76.9%)	3 (23.1%)	-
FT <sub>4</sub>	13 (100%)	-	-
Anti-TG; Anti-TPO	13 (100%)	-	-
IGF1	10 (76.9%)	-	3 (23.1%)

Antibodies (anti TG -ref. <125 IU/ml ,anti TPO – ref. < 40 IU/ml) in the reference range in 64,5 % (n=20), elevated in 35,5% (n=11).

IGF1 (age specific ref.: 19-39 y - 139-353 ng/ml, 40- 59 y - 111-257 ng/ml, 60-80 y -86-214 ng/ml) normal in 77,4 % (n=24), decreased in 22,6 % (n=7).

Group 3 – n-13 metabolic syndrome without thyroid nodular pathology: BMI was >30 in all patients (n=13).

C-Peptide (ref. 0,7-1,9 ng/ml) was elevated in all patients (n =13).

Glucose (ref. 4 -5,6 mmol/l) was in the normal

range in 69,2% (n=9) and elevated in 30,8% (n=4).

HbA<sub>1c</sub> (ref. 4-6%) was in the reference range in 38,5% (n=5), elevated (6,1%-6,7%) in 61,5 % (n=8).

TSH (ref. 0,34-3,5 μIU/ml) normal in 76,9% (n=10), elevated in 23,1% (n=3).

FT<sub>4</sub> (ref. 0,8-2,0 ng/dl) and antibodies (anti TG -ref. <125 IU/ml ,anti TPO – ref. < 40 IU/ml) in the reference range in 100% (n=13).

IGF1 (age specific ref. : 19-39 y - 139-353 ng/ml, 40- 59 y - 111-257 ng/ml, 60-80 y -86-214 ng/ml) normal in 76,9 % (n=10), decreased in 23,1 % (n=3).

**Conclusion.** In the majority of subjects with hyperinsulinemia, in the first, second and the third groups, the concentration of IGF1 was in the normal range. In the smaller group IGF1 levels were reduced.

Statistically significant connection between IGF1 and thyroid nodules was not revealed. For the further investigation of this connection we plan to measure IGF1 in the thyroid histological samples in the future studies.

## REFERENCES

1. Геннадиник А. Г, Неласва АА. Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процессах старения. Ожирение и Метаболизм. – 2010. - 2. – с.10-14.
2. Дедов ИИ, Мельниченко ГА, Фадеев ВВ. Эндокринология. Издание второе, 2008:265-272, 414-415.
3. Aguirre GA, De Ita JR, de la Garza RG, Castilla-Cortazar I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of Translational Medicine*. 2016 Jan 6;14:3.
4. Bechtner G, Schopohl D, Rafferteder M, Gartner R, Welsch U. Stimulation of thyroid cell proliferation by epidermal growth factor is different from cell growth induced by thyrotropin or insulin-like growth factor I. // *Eur J Endocrinol*. 1996;134:639–48.
5. Chakravarty G, Santillan AA, Galer C, et al. Phosphorylated insulin like growth factor-I receptor expression and its clinico-pathological significance in histologic subtypes of human thyroid cancer // *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234:372–86.
6. Clemmons David R., The relative roles of growth hormone and IGF-1 in controlling insulin sensitivity // *J Clin Invest*. 2004 Jan 1; 113(1): 25–27.
7. Fritz Marc A. Speroff Leon. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, eight edition, Lippincott Williams & Wilkins: 2011.
8. Giorgadze ER, Goderidze TN, Asatiani KA. Intensity of metabolic syndrome in patients with different degrees of obesity // *Georgian Med News*. 2006;6 (135):99-101.
9. Gullu BE, Celik O, Gazioglu N, Kadioglu P. Thyroid cancer is the most common cancer associated with acromegaly.// *Pituitary*. 2010;13:242–8.
10. Holly J.M.P., Amiel S.A., Sandhu R.R. et al. The role of growth hormone in diabetes mellitus // *Journal of Endocrinology*, 1988; 118: 353–364.
11. Hsiao PJ, Tsai JH. Increased insulin-like growth factor-1 receptors in thyroid tissues of Graves' disease // *J Formos Med Assoc*. 1994;93:925–32.
12. Janket SJ, Manson JE, Sesso H, et al. A prospective study of sugar intake and risk of type 2 diabetes in women // *Diabetes Care*, 2003; 26: 1008–1015.
13. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions // *Endocr Rev*. 1995;16:3–34.
14. Larry JJ. *Harrisons Endocrinology*, second edition, 2010.
15. LeRoith D., Zumkeller Walter, Baxter Robert C. *Insulin Like Growth Factors*. Kluwer academic/Plenum Publ.: 2003.
16. Nakahashi K, Kitahori Y, Konishi N, Ohnishi T, Sugimura M, Hiasa Y. Establishment of a rat thyroid carcinoma cell line in vitro demonstrating high DNA synthesis in response to insulin-like growth factor I. // *Cancer Letters*. 1996;101:247–55.
17. Rexford S. Ahima. *Metabolic Basis of Obesity*. Springer Science+Business Media. 2011, Chapter 10.
18. Van der Laan BF, Freeman JL, Asa SL. Expression of growth factors and growth factor receptors in normal and tumorous human thyroid tissues. // *Thyroid*. 1995;5:67–73.

## SUMMARY

### INSULIN LIKE GROWTH FACTOR 1 POSSIBLE DEPENDENCE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME OF NODULAR PATHOLOGY OF THE THYROID GLAND

<sup>1</sup>Rekvava M., <sup>1</sup>Dundua T., <sup>1</sup>Kobulia M., <sup>1</sup>Javashvili L., <sup>2</sup>Giorgadze E.

<sup>1</sup>Cortex Clinic Ltd, Tbilisi, Georgia; <sup>2</sup>National Institute of Endocrinology, Tbilisi, Georgia

Metabolic syndrome and nodular pathology of the thyroid gland is a widespread problem nowadays. Recently there has been a notable coincidence between metabolic syndrome and nodular pathology of thyroid gland. Hence, it is interesting to reveal the connection between these two diseases. It is possible that insulin-like growth factor system (IGF), namely IGF 1 is connecting link between metabolic syndrome and nodular pathology of thyroid gland, because IGF1 stimulates growth and proliferation of cells in the body. We have investigated 18-82 years of age 71 patients. group 1 n27- subjects with thyroid nodular disease, and metabolic syndrome, group 2 n31- subjects with thyroid nodular disease and without metabolic syndrome. group 3 n13 - subjects with metabolic syndrome and no thyroid pathology. In all groups were assessed thyroid structural data, defined parameters of carbohydrate metabolism, thyroid function and blood concentration of IGF1. In patients with hyperinsulinemia IGF 1 was noted in normal or reduced concentration. In I group IGF1 was normal in 70,4% (n=19), decreased in 29,6% (n=8), In II group was normal in 77,4 % (n=24), decreased in 22,6% (n=7) and in III group was normal in 76,9% (n=10), decreased in 23,1% (n=3). Increase of IGF 1 in patients with thyroid nodular disease patients was not noted. Statistically significant connection between IGF1 and thyroid nodules was not revealed. For the further investigation of this connection we plan to measure IGF1 in the thyroid histological samples in the future studies.

**Keywords:** metabolic syndrome, thyroid nodular disease, insulin-like growth factor 1 (IGF1).

## РЕЗЮМЕ

### ВОЗМОЖНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 ОТ УЗЛОВОЙ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

<sup>1</sup>Реквава М.П., <sup>1</sup>Дундуа Т.Т., <sup>1</sup>Кобулия М.В.,  
<sup>1</sup>Джавашвили Л.В., <sup>2</sup>Гиоргадзе Е.Р.

<sup>1</sup>Клиника Кортекс; <sup>2</sup>Национальный институт эндокринологии, Тбилиси, Грузия

Узловая болезнь щитовидной железы и метаболический синдром по сей день являются широко распространенной проблемой. В последнее время особенно часто встречается сочетание узловой патологии щитовидной железы и метаболического синдрома, что и послужило поводом для выявления взаимосвязи между двумя этими заболеваниями. Возможно, что инсулиноподобная система фактора роста (IGF), в частности, IGF1, является связывающим звеном между этими болезнями, так как именно IGF1 содействует росту клеток и стимуляции пролиферации в организме.

Обследован 71 пациент в возрасте 18-82 лет. Пациенты были разделены на три группы: I группа (n=27) - комбинация узловой патологии щитовидной железы и метаболического синдрома; II группа (n=31) - узловая патология щитовидной железы без метаболического синдрома; III группа (n=13) - метаболический синдром без узловой патологии щитовидной железы.

Во всех группах оценены структурные данные щитовидной железы, определены параметры углеводного обмена, функция щитовидной железы и концентрация IGF1 в крови. Среди пациентов с гиперинсулинемией показатель IGF1 оказался в пределах нормы или понижен. В I группе IGF1 был в пределах нормы у 19 (70,4%) пациентов, понижен - у 8 (29,6%), во II группе в пределах нормы - у 24 (77,4%), понижен - у 7 (22,6%), в III группе в пределах нормы - у 10 (76,9%), понижен - у 3 (23,1%). Повышение концентрации IGF1 у пациентов с узловой патологией щитовидной железы не зафиксировано.

Статистически значимой связи между инсулиноподобным фактором роста и заболеванием щитовидной железы не выявлено. Чтобы выявить эту связь необходимо измерить IGF1 в гистологических препаратах щитовидной железы.

## რეზიუმე

ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი I-ის შესაძლო დამოკიდებულება ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვან პათოლოგიასთან მეტაბოლური სინდრომის მქონე პაციენტებში

<sup>1</sup>მ. რეკვავა, <sup>1</sup>თ. დუნდუა, <sup>1</sup>მ. კობულია,  
<sup>1</sup>ლ. ჯავაშვილი, <sup>2</sup>ე. გიორგაძე

<sup>1</sup>კლინიკა კორტექსი, თბილისი; <sup>2</sup>ენდოკრინოლოგიის ეროვნული ინსტიტუტი, თბილისი, საქართველო

მეტაბოლური სინდრომი და ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი დაავადება სადღეისოდ ფართოდ გავრცელებული პრობლემაა. ბოლო პერიოდში განსაკუთრებით ხშირია მეტაბოლური სინდრომის და ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი პათოლოგიის თანხვედრა, რამაც საინტერესო გახადა ამ ორ დაავადებას შორის კავშირის გამოვლენა. შესაძლოა ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორის სისტემა (IGF), კერძოდ კი IGF1 იყოს დამაკავშირებელი რგოლი ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვან დაავადებასა და მეტაბოლურ სინდრომს შორის, რადგანაც სწორედ IGF1 ახდენს ორგანიზმში უჯრედების ზრდის და პროლიფერაციის სტიმულაციას. გამოკვლეულია 18-82 წლის ასაკამდე 71 პაციენტი. კვლევაში მონაწილე პაციენტები დაიყო 3 ჯგუფად: I ჯგუფი (n=27) - ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი პათოლოგია და მეტაბოლური სინდრომის კომბინაცია, II ჯგუფი (n=31) - ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი პათოლოგია მეტაბოლური სინდრომის გარეშე და III ჯგუფი (n=13) - მეტაბოლური სინდრომი, კვანძოვანი პათოლოგიის გარეშე. ყველა ჯგუფში შეფასდა ფარისებრი ჯირკვლის სტრუქტურული მონაცემები, განისაზღვრა ნახშირწყლოვანი ცვლის პარამეტრები, ფარისებრი ჯირკვლის ფუნქცია და IGF1-ის კონცენტრაცია სისხლში. პიპერინსულინემიის მქონე პაციენტებში IGF1 აღინიშნა ნორმის ფარგლებში ან დაქვეითებული კონცენტრაციით. I ჯგუფში IGF1 ნორმის ფარგლებში აღმოჩნდა 19 (70,4%) პაციენტს, დაქვეითებული - 8 (29,6%); II ჯგუფში ნორმის ფარგლებში - 24 (77,4%), დაქვეითებული - 7 (22,6%), ხოლო III ჯგუფში ნორმის ფარგლებში - 10 (76,9%), დაქვეითებული - 3 (23,1%) პაციენტს. IGF1-ის მატება ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი პათოლოგიის მქონე პაციენტებში არ დაფიქსირდა. სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი კავშირი ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი I-ის კონცენტრაციასა და ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვან დაავადებას შორის არ გამოვლინდა. მომავალ კვლევებში, აღნიშნული კავშირის გამოსავლენად ვგეგმავთ ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი I-ის განსაზღვრას ფარისებრი ჯირკვლის ჰისტოლოგიურ მასალაში.

## LIARITIES OF REMODELING OF HEART AND NEUROHUMORAL STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE AND CONCOMITANT RENAL DISEASE DEPENDING ON THE VALUE OF THE EJECTION FRACTION OF THE LEFT VENTRICLE

Bilchenko O., Kravtsova V., Samburh Y., Hodlevska O., Gavrilyuk V.

*Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Department of Therapy, Nephrology and General Practice-Family Medicine, Kharkov, Ukraine*

Prevalence of chronic heart failure (CHF) is 1-2% of the adult population in developed European countries. Recently, two CHF variants are classified – with preserved and decreased ejection fraction (EF) of the left ventricle (LV); nevertheless, ESC recommendations *Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure, 2016*, classify an individual group of CHF patients with “medium” LV EF ranging from 40 to 49% for the purpose of description of the main characteristics, pathophysiology and treatment principles of the patient category which can be classified neither as ones with preserved (>50%), not with decreased (<40%) ejection fraction [5]. In the presence of concomitant chronic renal disease (CRD), CHF adverse effect on the risk of cardiovascular complications is increased as a result of concomitant interaction of hemodynamic and renal factors affecting vital organs. The presence of concomitant cardio-renal pathology in patients with “medium” LV EF is an urgent and poorly studied problem, which is not less important for complex and differential approach to treatment of this patient category [1].

Chronic heart failure (CHF) and chronic renal disease (CRD), represented by chronic pyelonephritis (CP) [9,12], is a rather prevalent combination called “cardiorenal syndrome” [6,7], which describes the interrelation of cardiac and renal pathology, the degree of mutual aggravation of concomitant diseases [4,5,8]. Both in cardiac and renal pathology, decrease of renal blood flow due to concomitant atherosclerosis of vessels, endothelial dysfunction and functional vascular spasm in essential hypertension patients, activation of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and elevation of aldosterone and renin levels occurs [8,9]. This leads to sodium and fluid retention, increase of extracellular liquid volume, which aggravates the existing tissue edema and endothelial dysfunction. These mechanisms do not only considerably decrease renal blood flow, but also form the vicious circle of the concomitant pathology course [10,11]. Remodeling processes in vital organs, first of all heart and vessels, progress simultaneously [2,3].

Based on the above, study of the condition of heart and vessels in CHF patients with concomitant chronic pyelonephritis is a very urgent problem, requiring investigation.

The goal of this study was investigation of remodeling particulars of structural and functional condition of

heart, neurohumoral status in CHF patients of functional class II with concomitant stage 1 arterial hypertension (AH) and stage I-II CRD, represented by uncomplicated CP, stage 1-2.

**Material and methods.** 67 patients with CHF of FC II and concomitant chronic pyelonephritis at remission stage for not less than 6 months, having glomerular filtration rate (GFR) parameter within the normal limits, took part in the study. The patients' age varied from 53.5 to 64 years old. Men (33.8%) and women (66.2%) participated in the study. All patients have given informed consent for participation in the study. The diagnosis “chronic renal disease” and “chronic pyelonephritis” was established based on KDIGO recommendations [1]. The diagnosis “CHF” was established in accordance with recommendations of the European Society of Cardiology, 2016 [5]. As of the screening moment, intervention group (n=67 patients) and control group (n=22 apparently healthy individuals) were formed. The intervention group was divided into 3 groups: group 1 included 22 CHF patients with preserved LV EF ( $\geq 50\%$ ) associated with AH and concomitant CRD. Group 2 included 23 CHF patients with decreased heart LV EF ( $\leq 40\%$ , but not less than 35%) associated with AH and concomitant CRD. Group 3 was comprised of 22 patients with CHF associated with AH and concomitant CRD, having LV EF 40-49% (so-called “medium” LV EF).

In order to evaluate the condition of RAAS regulators, plasma aldosterone level (PA) (using the kit DRG Aldosterone Elisa (DRG International Inc., USA)) and plasma renin activity level (PRA) (using the standard reagent kit DRG Renin Elisa (DRG International Inc., USA)) were studied. The following ultrasonic parameters were measured in order to determine structural-functional condition of the heart: left atrial (LA), diastolic dimension left ventricular (LV), cardiac left ventricular ejection fraction (EF), myocardial mass index (MMI). The following parameters were measured in order to study LV diastolic function: maximum rates of early and late diastolic filling, their ratio, mean pulmonary arterial pressure (MPAP), the ratio of maximum rates of early diastolic flow by the data of spectral (E) and tissue (e), their ratio (E/e, C.U.).

The main parameters of structural and functional heart condition in CHF patients associated with AH and concomitant CRD have been studied. The comparative data are shown in Table.

Table. Comparative characterization of structural-functional and neurohumoral condition in patients with CHF of functional class II associated with I degree AH and concomitant CRD depending on the condition of heart LV EF

Parameter	Comparison of median structural-functional parameters in group 1 and group 3, %	P	Comparison of median structural-functional parameters in group 2 and group 3, %	P	Comparison of median structural-functional parameters in group 1 and group 2, %	P
Aorta, mm	0.00	0.13	2.35	0.05	-2.35	0.05
LA, mm	1.56	0.61	10.77	0.15	-9.38	0.58
End-diastolic volume, ml	22.48	0.31	11.16	0.41	8.80	0.13
End-systolic volume, ml	83.01	0.05	-4.64	0.36	91.51	0.16
EF, %	-31.19	0.05	14.57	0.36	-41.22	0.41
Relative wall thickness index	4.44	0.10	2.13	0.07	2.22	0.36
MMI	15.37	0.34	6.13	0.37	8.31	0.05
PA, pg/ml	31.28	0.05	22.47	0.31	12.82	0.05
PRA, µg/g*1	-14.53	0.03	0	0.16	-12.69	0.85
MPAP, mm Hg	7.91	0.05	-9.67	0.04	16.04	>0.05
E/A	1.15	0.18	3.44	0.13	-2.38	0.16
e/a	-14.66	0.35	-2.66	0.14	-11.68	0.91
E/e	8.42	0.13	-2.68	0.11	10.82	0.54

**Results and their discussion.** Comparison between median parameters of structural-functional heart condition in group 1 and group 3 has identified the reliable increase in median parameters of end-systolic dimension by 28.71% ( $P=0.03$ ), median end-diastolic volume by 22.48% ( $P>0.05$ ) and median end-systolic volume by 83.01% ( $P>0.05$ ) in group 3, indicative of higher involvement of systolic component of heart remodeling versus the diastolic one. Median LV EF parameter in group 3 was reliably lower by 31.19% ( $P>0.05$ ). Median parameters of relative wall thickness index and myocardium mass index were higher by 4.44% ( $P>0.10$ ) and by 15.37% ( $P=0.34$ ) in the group of group 3. Comparison between median parameters of structural-functional heart condition in group 2 and group 3 has revealed unreliable increase in median parameters of stroke volume (by 32.01%,  $P>0.10$ ) and LV EF (by 14.57%,  $P>0.10$ ) in group 3.

Comparison of median RAAS activity parameters in groups of CHF patients with preserved EF and with “medium” LV EF associated with AH and concomitant CRD has identified the increase of plasma aldosterone parameter (PA) by 31.28% ( $P<0.05$ ); nevertheless, the median of plasma renin activity parameter (PRA) was reliably lower by 14.53% ( $P<0.05$ ) in the group of CHF patients with “medium” LV EF associated with AH and concomitant CRD. Comparison of median RAAS effector parameters in group 2 and group 3 has identified the increase of median PA parameter by 22.47%

( $P>0.10$ ); no changes in PRA parameter were detected upon comparison of these groups. Evaluation of median data of RAAS effector parameters in group 1 and group 2 has revealed the increase of PRA parameter by 12.81% ( $P<0.05$ ), and decrease in median PRA parameter by 12.69% ( $P>0.10$ ) in group 2.

Comparison of median diastolic function parameters has identified the change of MPAP parameter upon decrease of heart LV EF by 16.04% ( $P>0.05$ ) in CHF patients with preserved and decreased LV EF associated with AH and CRD. When the CHF patients with preserved (group 1) and “medium” LV EF (group 3) associated with AH and CRD were compared, the increase of this parameter was 7.91% ( $P>0.10$ ). The increase in median E/e parameter was 10.82% ( $P>0.10$ ) in the group group 2 versus the group 1. In a group 3, median E/e parameter was lower by 2.68 ( $P>0.10$ ) versus the group 2. The decrease of this parameter can be indicative of heart diastolic function disorders, nevertheless, the median of isovolumic relaxation time was unaltered, indicative of involvement of compensatory mechanisms (development of myocardial hypertrophy, i.e. increase of its muscular mass; Frank-Starling mechanism; positive inotropic effect of sympathetic-adrenal system on the heart) [6].

The obtained data can be used in practical medicine during prescription of differentiated therapy in patients with chronic heart failure with consideration of heart LV EF level, optimization of approaches to treatment



of patients with concomitant cardio-renal pathology.

**Conclusion.** Therefore, the study of structural-functional condition of heart, taking into account both systolic and diastolic function of the left ventricle of heart, comparison of parameters in CHF patients associated with AH and CRD with preserved LV EF and “medium” LV EF, PA (by 31.28%) and decrease of PRA parameter (by 14.5%) in the group of CHF patients associated with AH and CRD with “medium” LV EF. Comparison of the groups of CHF patients associated with AH and CRD with decreased LV EF and “medium” LV EF has identified the increase of such parameters as relative wall thickness index (by 2.13%), MMI (by 6.13%), PA (by 22.4%); besides, the increase of E/e parameter (by 2.7%) was identified in the group of CHF patients with “medium” LV EF.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed A, Rich MW, Sanders PW et al. Chronical Kidney Disease Associated Mortality in Diagnostic Versus Systolic Heart Failure: A Propensity Matched Study // *Am. J. Cardiol.* 2007; 99: 393-398.
2. KDIGO BP Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the management of blood pressure in chronic kidney disease // *Kidney inter., Suppl.* 2012; 2: 337-414.
3. Kingma JG Jr, Simard D., Rouleau JR. Renocardiac syndromes: physiopathology and treatment stratagems // *Can J Kidney Health Dis.* 2015; 16: 2-41.
4. Koniari K, Nikolaou M, Paraskevaidis I, Parissis J. Therapeutic options for the management of the cardiorenal syndrome // *Int. J. Nephrol.* 2010.
5. Kovalenko VN, Talaieva TV, Bratus VV. Renin-angiotensin system in cardiac pathology // *Ukrainian Cardiologic Journal.* 2012; 4: 109-129.
6. Lip GYH, Skjøth F, Overvad K, Rasmussen LH, Larsen TB. Blood pressure and prognosis in patients with incident heart failure: the Diet, Cancer and Health (DCH) cohort study // *Clin Res Cardiol.* 2015; 104:1088-1096.
7. McClellan W. The epidemic of renal disease — what drives it and what can be done? // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21(6): 1461-1464.
8. Мухин Н.А., Моисеев В.С. Кардиоренальные соотношения и риск сердечно-сосудистых заболеваний // *Вестн РАМН* 2003; 11:50—55.
9. Ponikowski P, Voors A.A., Anker S.D. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC // *European Journal of Heart Failure* (2016).
10. Ronco C, Haapio C, House AA et al. Cardiorenal syndrome // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52, № 19: 1527-1539.
11. Ronco C. Cardiorenal and renocardial syndromes: clinical disorders in search of a systematic definition // *Int. J. Artif. Organs.* 2008; 31: 1-2.
12. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE Chronic kidney disease. Effects on the cardiovascular system // *Circulation.* 2007; 116: 85-97.

#### SUMMARY

#### PECULIARITIES OF REMODELING OF HEART AND NEUROHUMORAL STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE AND CONCOMITANT RENAL DISEASE DEPENDING ON THE VALUE OF THE EJECTION FRACTION OF THE LEFT VENTRICLE

**Bilchenko O., Kravtsova V., Samburh Y., Hodlevska O., Gavrilyuk V.**

*Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Department of Therapy, Nephrology, and General Practice-Family Medicine, Kharkov, Ukraine*

67 patients with CHF of FC II and concomitant chronic pyelonephritis at remission stage for not less than 6 months. As of the screening moment, intervention group (n=67 patients) and control group (n=22 apparently healthy individuals) were formed. The intervention group was divided into 3 groups: group 1 included 22 CHF patients with preserved LV EF ( $\geq 50\%$ ) associated with AH and concomitant CRD. Group 2 included 23 CHF patients with decreased heart LV EF ( $\leq 40\%$ , but not less than 35%) associated with AH and concomitant CRD. Group 3 was comprised of 22 patients with CHF associated with AH and concomitant CRD, having LV EF 40-49% (so-called “medium” LV EF).

In order to evaluate the condition of RAAS regulators, plasma aldosterone level (PA) and plasma renin activity level (PRA) were studied. The ultrasonic parameters were measured in order to determine structural-functional condition of the heart. the study of structural-functional condition of heart, taking into account both systolic and diastolic function of the left ventricle of heart, comparison of parameters in CHF patients associated with AH and CRD with preserved LV EF and “medium” LV EF, PA (by 31.28%) and decrease of PRA parameter (by 14.5%) in the group of CHF patients associated with AH and CRD with “medium” LV EF.

Comparison of the groups of CHF patients associated with AH and CRD with decreased LV EF and “medium” LV EF has identified the increase of such parameters as relative wall thickness index (by 2.13%), MMI (by 6.13%), PA (by 22.4%); besides, the increase of E/e parameter (by 2.7%) was identified in the group of CHF patients with “medium” LV EF.

**Keywords:** chronic heart failure, cardiorenal syndrome, renin-angiotensin-aldosterone system, structural-functional condition.

## РЕЗЮМЕ

### ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СЕРДЦА И НЕЙРОГУМОРАЛЬНОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ В СОЧЕТАНИИ С БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЕЛИЧИНЫ ФРАКЦИИ ВЫБРОСА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

Бильченко А.В., Кравцова В.И., Самбург Я.Ю., Годлевская О.М., Гаврилюк В.А.

*Харьковская медицинская академия последипломного образования, кафедра терапии, нефрологии и общей практики – семейной медицины, Украина*

В исследовании участвовали 67 больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН) II функционального класса с сопутствующим хроническим пиелонефритом в стадии ремиссии не менее 6 месяцев. Группу контроля составили 22 практически здоровых лица. Обследованные больные были поделены на 3 группы: I группу составили 22 пациента с ХСН с сохраненной фракцией выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) ( $\geq 50\%$ ) на фоне артериальной гипертензии (АГ) и сопутствующей хронической болезни почек (ХБП), II группу - 23 пациента с ХСН со сниженной ФВ ЛЖ сердца ( $\leq 40\%$ , но не менее  $35\%$ ) на фоне АГ и сопутствующей ХБП, III группу составили 22 больных ХСН на фоне АГ и сопутствующей ХБП, величина ФВ ЛЖ которых составила 40-49% (т.н. «средняя» ФВ ЛЖ). Для оценки состояния регуляторов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы исследовался уровень альдостерона в плазме крови (АПК) и активность ренина плазмы (АРП). С целью оценки структурно-функционального состояния сердца определялись ультразвуковые показатели. При исследовании структурно-функционального состояния сердца с учетом систолической и диастолической функции левого желудочка сердца, при сравнении показателей у больных ХСН на фоне АГ и ХБП с сохраненной ФВ ЛЖ и «средней» ФВ ЛЖ определено увеличение АПК на 31,28% и снижение показателя АРП на 14,5% в группе больных ХСН на фоне АГ и ХБП со «средней» ФВ ЛЖ. При сравнении групп больных ХСН на фоне АГ и ХБП со сниженной ФВ ЛЖ и со «средней» ФВ ЛЖ выявлено увеличение показателей индекса относительной толщины стенок на 2,13%, индекса массы миокарда - на 6,13%, АПК - на 22,4% и увеличение показателя E/e на 2,7% в группе больных ХСН со «средней» ФВ ЛЖ.

## რეზიუმე

გულის ქრონიკულ უკმარისობასთან შერწყმული თირკმლების დაავადების მქონე პაციენტთა გულის რემოდელირების და ნეიროჰუმორული სტატუსის თავისებურებანი მარცხენა პარკუჭის განდევნის ფრაქციის სიდიდეზე დამოკიდებულებით

ა. ბილჩენკო, ვ. კრავცოვა, ია. სამბურგი,  
ო. გოდლევესკაია, ვ. გავრილიუკი

*ხარკოვის დიპლომის შემდგომი განათლების სამედიცინო აკადემია, თერაპიის, ნეფროლოგიის და ზოგადი პრაქტიკის-საოჯახო მედიცინის კათედრა, უკრაინა*

კვლევაში ჩართული იყო ქრონიკული პიელონეფრიტით თანხლებული გულის ქრონიკული უკმარისობით (გქუ) 67 პაციენტი არანაკლებ ექვსთვიანი რემისიის სტადიაზე. საკონტროლო ჯგუფი შეადგინა 22 პრაქტიკულად ჯანმრთელმა პირმა. გამოსაკვლევი პაციენტები დაყოფილი იყო სამ ჯგუფად: I ჯგუფში შევიდა 22 პაციენტი გქუ-ით მარცხენა პარკუჭის (მპ) შენარჩუნებული განდევნის ფრაქციით (გფ) ( $\geq 50\%$ ) არტერიული ჰიპერტენზიის ფონზე; II ჯგუფში - 23 პაციენტი გქუ-ით მპ-ის შემცირებული გფ-ით ( $\leq 40\%$ , მაგრამ არანაკლებ  $35\%$ ) არტერიული ჰიპერტენზიის ფონზე; III ჯგუფში გაერთიანდა 22 პაციენტი გქუ-ით არტერიული ჰიპერტენზიის ფონზე და გფ-ით - 40-49%. ნეიროჰუმორული სტატუსის შეფასებისათვის სისხლის პლაზმაში შეისწავლეს ალდოსტერონის და პლაზმის რენინის აქტივობის დონე. გულის სტრუქტურულ-ფუნქციური მდგომარეობის შეფასების მიზნით განისაზღვრა ულტრაბგერითი მაჩვენებლები, მარცხენა პარკუჭის სისტოლური და დიასტოლური ფუნქციის გათვალისწინებით. მპ-ის შენარჩუნებული გფ-ის და ამ მაჩვენებლის “საშუალო” დონის არსებობის შედარებისას დადგენილია ალდესტერონის მატება სისხლის პლაზმაში (ასპ) 31,28%-ით, ხოლო პლაზმის რენინის აქტივობის შემცირება 14,5%-ით გქუ-ის დროს არტერიული ჰიპერტენზიის ფონზე მარცხენა პარკუჭის “საშუალო” განდევნის ფრაქციით.

გქუ-ის, არტერიული ჰიპერტენზიის და თირკმლების ქრონიკული დაავადების დროს მპ-ის დაქვეითებული გფ-ის და “საშუალო” გფ-ის მქონე ჯგუფების შედარებისას “საშუალო” გფ-ის ჯგუფში გამოვლინდა კედლების ფარდობითი სისქის ინდექსის მომატება 2,1%-ით, მიოკარდის მასის ინდექსის - 6,13%-ით, ასპ - 22,4%-ით, E/e მაჩვენებლის - 2,7%-ით.

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИИ ГЕПАТИТА С СРЕДИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОЖИВАЮЩИХ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Мамедов М.К., Мамедова Т.Н., Рагимзаде С.Э., Рагимов А.А.

*Национальный центр онкологии, Баку, Азербайджан*

В последнее десятилетие прошедшего столетия установлено, что среди находившихся в Национальном центре онкологии г. Баку больных раком молочной железы (РМЖ) частота выявления антител к вирусу гепатита С (ВГС) заметно превосходила таковую среди здоровых взрослых жителей Азербайджана [16]. Позже продемонстрировано, что этот показатель среди больных РМЖ, более чем в 4 раза превышает аналогичный среди здоровых взрослых жителей страны (контрольная группа) [1].

На сегодняшний день выявлено, что за прошедшие десятилетия распространенность инфекции, вызванной ВГС, значительно изменилась в мировом масштабе [14]. Вышеизложенное позволяет предполагать, что ранее определенные показатели распространения этой инфекции среди больных РМЖ также могли измениться, что косвенно подтверждается интенсивностью циркуляции вируса гепатита В, эпидемиологически весьма близкого к ВГС [2].

Объективная информация о распространенности ВГС-инфекции среди больных РМЖ - самым частым онкологическим заболеванием среди женщин по сей день имеет важное клиническое значение, поскольку известно, что ВГС-инфекция у больных РМЖ не только ограничивает возможности адекватного лечения РМЖ, но и влияет на течение этого заболевания [3,4].

Исходя из вышеизложенного, целью исследования явилось определить частоту выявления специфических (серологических и молекулярно-генетических) маркеров инфицирования вирусом гепатита С среди больных раком молочной железы и особенности развития этой инфекции.

**Материал и методы.** Проанализированы результаты исследования на наличие антител к ВГС (anti-HCV) в сыворотке крови 2682 больных РМЖ, отобранных методом простой рандомизации из числа госпитализированных и обследованных за 2014-2016 гг. Исследование проводилось иммуноферментным методом с использованием высокочувствительных коммерческих наборов для выявления anti-HCV 3-го поколения.

В качестве контроля использованы результаты ранее проведенного аналогичного исследования сывороток крови лиц, проживающих в г. Баку: здоровых взрослых безвозмездных доноров обоего пола (n=1541) и беременных женщин (n=1782) [5].

Сыворотка крови больных РМЖ и лиц контрольной группы, у которых были выявлены anti-HCV, подверглась молекулярно-генетическому исследованию,

проведенному посредством полимеразной цепной реакции. С ее помощью в сыворотке выявляли вирусную РНК, определяли ее генотипную принадлежность и концентрацию, т.е. «вирусную нагрузку» (ВН). Исследования проводили с использованием коммерческих наборов “АмплиСенс®HCV-FL”, “АмплиСенс®HCV-генотип-FL” (производство Центрального НИИ эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека).

Полученные результаты математически обработаны с помощью компьютерной программы «Statistica v.6».

**Результаты и их обсуждение.** Согласно серологическим исследованиям, anti-HCV выявлены в сыворотке крови 217 (8,1±0,5%) больных РМЖ, что более чем в 2 раза превышало показатель контрольной группы - 126 (3,8±0,3%), p<0,01, т.е. частота серопозитивности в отношении к ВГС у больных РМЖ превосходила таковую контрольной группы более чем в 2 раза.

Последний факт позволил прийти к заключению о том, что больные РМЖ, как и четверть века назад, оказались инфицированными достоверно чаще, по сравнению со здоровыми жителями, обследованными в составе контрольной группы.

Трактуя вероятные причины этого явления с современных позиций, мы формально были обязаны допустить, что высокая частота инфицирования больных РМЖ могла быть следствием причастности ВГС к возникновению РМЖ.

Такой взгляд основан, с одной стороны, на хорошо известных данных о том, что хронические заболевания печени являются одним из наиболее важных факторов риска возникновения РМЖ [12]. С другой стороны, недавно продемонстрировано, что среди лиц с хронической ВГС-инфекцией частота регистрации ряда онкологических заболеваний (не считая рака печени) возросла более чем в 2 раза [13,17]. Однако, в других наблюдениях было показано, что корреляционная связь между РМЖ и ВГС-инфекцией не столь высока и становится существенной лишь в регионах, эндемичных в отношении этой инфекции [15,18]. Поэтому, мы приняли традиционную точку зрения, согласно которой больные РМЖ, как и больные другими злокачественными опухолями, формируют одну из групп с высоким риском парентерального инфицирования вирусами гепатитов В и С [6].

Как известно, большинство таких групп риска характеризуются определенными особенностями,

Таблица. Частота выявления anti-HCV и РНК ВГС у больных различными клиническими стадиями рака молочной железы

Диагноз и стадия РМЖ	Число обследованных сывороток	Число серопозитивных сывороток	Число сывороток, содержащих РНК ВГС *
РМЖ I	440	20 / 4,5%	17 / 85,0%
РМЖ II	1054	64 / 6,1%	57 / 89,0%
РМЖ III	743	80 / 10,8%	78 / 97,5%
РМЖ IV	445	53 / 11,9%	53 / 100%
Всего	2682	217 / 8,1%	205 / 94,5%

примечание: \* - процент от числа серопозитивных сывороток

обусловленными спецификой развития вирусных инфекций (в том числе, ВГС-инфекции) и их передачи от человека человеку [7]. Приняв во внимание это обстоятельство, мы попытались выявить такие особенности развития ВГС-инфекции у больных РМЖ.

Первоначально сопоставлена средняя частота выявления anti-HCV среди больных РМЖ на различных клинических стадиях. Такое сопоставление отражено в средней колонке приведенной таблицы.

Из таблицы следует, что чем более поздняя стадия РМЖ, тем выше частота выявления anti-HCV, достигая максимума у больных РМЖ IV стадии. Проявлением этого стало то, что средняя частота выявления антител в общей группе больных РМЖ III-IV стадий составила 11,2±0,9%, а в общей группе больных РМЖ I-II стадиями - 5,6±0,6%; различие между ними устойчиво в интервале  $p < 0,01$ .

Такая же закономерность выявлена в ранее проведенном нами исследовании [1], а также среди инфицированных ВГС больных другими злокачественными опухолями [6].

Анализ результатов молекулярно-генетического исследования сывороток, содержащих anti-HCV, выявил, что вирусная РНК присутствовала не во всех сыворотках - ее обнаружили лишь в 205 (94,5±1,5%) сыворотках больных РМЖ и в 89 (70,6±4,1%) сыворотках лиц из контрольной группы [8]. При этом, показатели приведенные в правой колонке таблицы, указывают на то, что частота выявления РНК ВГС в серопозитивных сыворотках по мере увеличения клинической стадии РМЖ, возрастала, достигая 100% у больных IV стадией болезни.

Следует предполагать, что отмеченное выше несоответствие результатов серологического и молекулярного исследований объясняется тем, что сыворотки, в которых выявились и антитела, и РНК ВГС, принадлежали тем лицам, в организме которых происходила репродукция ВГС, за счет которой у них имелась и вирусемия.

В то же время, сыворотки, в которых были антитела, но отсутствовала вирусная РНК, принадлежали реконвалесцентам острого гепатита С (ГС). Эти лица перенесли ГС в прошлом и к моменту серологического обследования спонтанно выздоровели, а вирус уже элиминировался из их организма. На сегодняшний день считается, что частота такого спонтанного

выздоровления при ГС колеблется от 20 до 40% [14].

Итак, РНК ВГС не выявлена в 12 (5,5±5,4%) сыворотках больных РМЖ и 37 (29,4±4,1%) сыворотках лиц контрольной группы; различие между этими показателями было устойчивым в интервале  $p < 0,01$ . При этом, если частота реконвалесценции у лиц из контрольной группы совпадает с данными литературы, то этот же показатель у больных РМЖ значительно ниже. Последнее косвенно указывало на то, что у большинства больных РМЖ хронический ГС сформировался до момента их обследования.

Следует отметить, что аналогичная патогенетическая особенность течения ГС ранее выявлена и среди представителей других групп с высоким риском парентерального инфицирования ВГС и, в том числе, среди ряда других категорий онкологических больных, инфицированных ВГС [9,11]. Вышеизложенное позволяет заключить, что инфекция у больных РМЖ, как и у лиц из других групп риска, характеризуется более низкой частотой спонтанного выздоровления и, соответственно, более высокой частотой хронизации инфекции.

Рассматривая механизмы, лежащие в основе данной патогенетической особенности развития ГС у больных РМЖ, предполагается, что она может быть обусловлена иммуно-компрометацией этих больных, препятствующей формированию полноценного иммунного ответа, обеспечивающего освобождение организма от ВГС и, тем самым, предотвращающего хронизацию острой ВГС-инфекции [10]. Очевидно, что такая иммуно-компрометация больных РМЖ, регулярно отмечающаяся и у лиц из других групп риска [9], могла быть прямым следствием иммунодепрессии, вызванной онкологическим заболеванием.

И, наконец, в сыворотках крови 205 больных РМЖ и 126 лиц контрольной группы, в которых выявлена РНК ВГС, определена ВН. Далее эти сыворотки в зависимости от уровня ВН условно разделили на 2 типа: с "высокой" ВН (более 500 тыс. копий в мл) и с "низкой" ВН (до 500 тыс. копий в мл).

В результате, "высокая" ВН выявилась в сыворотке 131 (63,9±3,4%) больной РМЖ и 58 (46,0±4,4%) лиц контрольной группы; разница между этими показателями была устойчивой в интервале  $p < 0,01$ . Данный факт указывает, что среди инфицированных больных РМЖ, более высокая

ВН выявлялась достоверно чаще, чем среди лиц контрольной группы. Данный факт указывает на то, что ВГС-инфекция у больных РМЖ чаще протекает с более высокой ВН, чем у лиц контрольной группы.

Эту особенность течения ВГС-инфекции, на наш взгляд, следует связывать с иммуно-компрометацией больных РМЖ, из-за которой иммунная система не может ограничивать интенсивность репродукции вируса.

Подводя итоги изложенному, следует подчеркнуть, что отличительными особенностями, характеризующими процесс течения ВГС-инфекции у больных РМЖ, как и у лиц из многих других групп риска, являлись: 1) более низкая частота спонтанного выздоровления и, соответственно, более высокая частота хронизации острой инфекции и 2) более частое проявление высокой ВН.

Данные особенности течения ВГС-инфекции у больных РМЖ, сами по себе, демонстрируют более высокую степень эпидемиологической опасности этих больных в силу трех обстоятельств: во-первых, перенося хроническую инфекцию, они дольше остаются источниками инфекции; во-вторых, наличие более высокой концентрации вируса в крови повышает их потенциал распространения инфекции в своем окружении; в-третьих, хотя интенсивность циркуляции ВГС среди больных РМЖ оказалась ниже, чем у ряда других категорий онкологических больных [6], больные РМЖ, как группа риска, имеют важное эпидемиологическое значение, как минимум, в силу значительной численности данного контингента онкологических больных, не только в Азербайджане, но и во многих регионах мира.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Д.А., Рагимова С.Э., Мамедов М.К. и др. Анти-тела к вирусу гепатита С у больных доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы и лимфомами. // Азерб. мед. Ж., 1996, N. 5-6, с.7-9.
2. Мамедов М.К., Рагимов А.А., Мамедова Т.Н. и др. Тенденция к снижению интенсивности циркуляции вируса гепатита В среди онкологических больных и здоровых жителей Азербайджана. // Современные достижения азербайджанской медицины, 2014, N.3, с.39-42.
3. Мамедов М.К., Михайлов М.И., Дадашева А.Э. и др. Инфекция, вызванная вирусом гепатита С как неблагоприятный прогностический фактор при раке молочной железы. // Мир вирусных гепатитов, 2005, N.12, с.13-14.
4. Мамедов М.К., Михайлов М.И. Онкологические аспекты парентеральных вирусных гепатитов. // Экспериментальная и клиническая гепатология (Москва), 2006, N.5, с.6-69.
5. Мамедов М.К., Дадашева А.Э., Алиева Ш.Н. Инфекции, вызванные вирусами гепатитов В и С у безвозмездных доноров крови и беременных женщин: распространенность и патогенетические варианты течения. // Современные достижения азербайджанской медицины, 2012, N.1, с.45-48.
6. Мамедов М.К., Рагимов А.А., Зейналов Р.С. и др. Больные солидными злокачественными опухолями, как одна из групп с высоким риском парентерального инфицирования вирусами гепатитов В и С. // Современные достижения азербайдж. медицины, 2011, N.4, с.43-46.
7. Мамедов М.К., Дадашева А.Э. Теоретические основы эпидемиологии и профилактики трансфузионных вирусных инфекций. Под ред. М.И.Михайлова. Баку: Элм, 2012, 249 с.
8. Мамедов М.К., Рагимов А.А., Мамедова Т.Н. Инфекция, вызванная вирусом гепатита С у больных раком молочной железы, живущих в Азербайджане. // Медицинские новости (Минск), 2016, N.1, с. 70-72.
9. Мамедов М.К., Дадашева А.Э., Михайлов М.И. Патогенетическая характеристика гепатитов В и С у лиц из групп с высоким риском парентерального инфицирования. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2012, N.1, с.55-58.
10. Мамедов М.К., Михайлов М.И., Дадашева А.Э. Иммунокомпрометация лиц из групп с высоким риском парентерального инфицирования вирусами гепатитов В и С: причины и патогенетическое значение. // Ж. инфектологии (СПб.), 2012, N.1, с.19-22.
11. Михайлов М.И.: Мамедов М.К. Вирусные гепатиты В и С у онкологических больных. М.:ВК, 2012, 228 с.
12. Семиглазов В.В., Топузов Э.Э. Рак молочной железы. Под ред В.В.Семиглазова. М.: МЕДпресс, 2009, 176 с.
13. Allison R., X.Nong X., A.Moorman A. et al. Increased incidence of cancer and cancer-related mortality among persons with chronic hepatitis C infection. // J. Hepatology 2015, v.63, p.822-828.
14. Guidelines for prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. WHO: 2015, 134 p.
15. Larrey D., Bozonnat M., Assenat E. Is chronic hepatitis C virus infection a risk factor for breast cancer? // World J. Gastroenterol., 2010, v.16, p.3687-3691.
16. Mamedov M., Sailov M., Gudratov N. et al. Viral hepatitis type B and type C serological markers among patients with acute hepatitis, malignant tumours and healthy inhabitant in Azerbaijan Republic. / The hepatitis C virus and its infection: Symposium of Federation of Europ. Microbiol. Societies. Istanbul, 1993, p.59.
17. Nyberg A. The association of extrahepatic cancers with chronic hepatitis C virus infection. // Gastroenterol. Hepatol., 2016, v.12, p.185-187.
18. Su F.H., Chang S.N., Chen C.C. et al. Association between chronic hepatitis viral hepatitis and breast cancer: nation-wide population-based case-control study. // BMC Cancer, 2011, v. 11, p.495.

## SUMMARY

### HEPATITIS C INFECTION SPECIFIC MARKERS AMONG PATIENTS WITH BREAST CANCER IN AZERBAIJAN

Mamedov M., Mamedova T., Rahimzadeh S.,  
Rahimov A.

*National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan*

The article presents results of comparative investigation of blood serum in 2682 breast cancer (BC) patients and 3323 healthy persons. At the onset of the study, all the specimens were tested for serum antibodies to hepatitis C virus (HCV). At the later stage, the serum specimens containing the antibodies were examined for detecting RNA GCV.

Based on the obtained study results the authors concluded that BC patients can be considered as a high risk group for parenteral contamination with HCV. In addition, the authors have determined that HCV-infection course among BC patients is characterized by a low rate of recovery accompanied with spontaneous virus elimination and a high level of «viral load».

**Keywords:** breast cancer, hepatitis C virus.

## РЕЗЮМЕ

### СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИИ ГЕПАТИТА С СРЕДИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРОЖИВАЮЩИХ В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Мамедов М.К., Мамедова Т.Н., Рагимзаде С.Э.,  
Рагимов А.А.

*Национальный центр онкологии, Баку, Азербайджан*

В статье представлены сравнительные результаты исследования сывороток крови 2682 больных раком молочной железы (РМЖ) и 3323 здоровых

лиц. Изначально в сыворотках были определены антитела к вирусу гепатита С (ВГС). В дальнейшем сыворотки, в которых имелись антитела исследовали на присутствие в них РНК ВГС.

На основе результатов проведенных исследований авторы пришли к заключению: больные РМЖ могут рассматриваться как одна из групп с высоким риском парентерального инфицирования ВГС. Кроме того, выявлено, что течение ВГС-инфекции у больных РМЖ характеризуется низкой частотой выздоровления, сопровождающегося спонтанной элиминацией вируса и высокой «вирусной нагрузкой».

რეზიუმე

С ჰეპატიტის ვირუსით გამოწვეული ინფექციის სპეციფიკური მარკერები აზერბაიჯანში მცხოვრებ სარძევე ჯირკვლის კიბოს მქონე პაციენტებში

მ. მამედოვი, ტ. მამედოვა, ს. რაგიმზადე,  
ა. რაგიმოვი

ონკოლოგიის ეროვნული ცენტრი, ბაქო,  
აზერბაიჯანი

სტატიაში წარმოდგენილია სარძევე ჯირკვლის კიბოს (სჯკ) მქონე 2682 პაციენტის და 3323 ჯანმრთელი პირის (საკონტროლო ჯგუფი) სისხლის შრატის კვლევის შედეგები. თავდაპირველად შრატში ისაზღვრებოდა ანტისხეულები C ჰეპატიტის ვირუსის მიმართ. შემდგომ ანტისხეულების შემცველი შრატები გამოიკვლეული იყო C ჰეპატიტის ვირუსის რნმ-ის შემცველობაზე.

კვლევის შედეგად ავტორები დაასკვნინან, რომ სჯკ-ს მქონე ავადმყოფები შეიძლება განხილულ იქნან მაღალი რისკის მქონე ერთ-ერთ ჯგუფად პარენტერული გზით C ჰეპატიტით ინფიცირებისათვის. აგრეთვე ნაჩვენებია, რომ სჯკ-ს მქონე პაციენტებში C ჰეპატიტის მიმდინარეობა ხასიათდება გამოჯანმრთელების დაბალი სიხშირით, რასაც თან ახლავს ვირუსის სპონტანური ელიმინაცია და მაღალი “ვირუსული დატვირთვა”.

## PECULIARITIES OF THE CLINICAL COURSE OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS AGAINST THE BACKGROUND OF THE CHRONIC KIDNEY DISEASE OF THE I-III STAGE WITH SECONDARY ARTERIAL HYPERTENSION

Hukhlina O., Antoniv A., Dudka I., Dudka T., Mandryk O.

*Higher State Educational Institution of Ukraine Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine*

The topicality of the problem of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) course against the background of chronic kidney disease (CKD) consists in a significant increase in the frequency of this type of comorbidity (14-30%), which, when progressing, is accompanied by an increasing degree of endotoxemia, an increase of nitrogen metabolism products in systemic circulation against the background of hypoalbuminemia, hyper- and dyslipidemia, activation of oxidative and nitrosative stress against the background of significant suppression of the antioxidant defense system and the natural detoxification system, inhibition of erythropoiesis (anemia of chronic disease), endothelial dysfunction, significant disorders of the peripheral and organ circulation (liver, kidneys, myocardium), activation of connective tissue system [2,3,5-9,13,17,20]. All these mechanisms are pathogenetic links in NASH and CKD, especially if they occur against the background of type 2 diabetes or obesity [4,7,10,22]. The prevalence of NASH among patients with type 2 diabetes and obesity is 80-100% [8,9,11,18]. During the autopsy NASH is detected in 18.5-26%, cirrhosis of the liver – in 9-10% of cases in patients with type 2 diabetes and obesity [12,15,16,19]. However, at present, the degree of these disorders and the clinical features of the course in comorbidity of NASH and CKD are unknown.

According to various authors, liver steatosis is diagnosed by means of ultrasonography (USG), the sensitivity and specificity of which are 60-94 and 84-95% respectively [1, 4, 23]. Sensitivity of USG increases with the increasing of steatosis degree [14, 18, 21]. For instance, if the content of fat in the liver is 10-19%, the sensitivity of USG is 55%, and in the presence of >30% of fatty infiltration this index increases to 80% [1, 4]. For the purpose of quantitative assessment of liver echogenicity changes, the method of echodensitometry [24] is used. The analysis of ultrasound images by statistical and structural methods with the calculation of the hepatorenal index (HRI) [24] lies in its base. The calculation of HRI is based on the characteristic for steatosis increase of echogenicity of liver parenchyma, in comparison with the kidney cortical substance [4, 24]. At the same time, USG is an important method for evaluating structural changes in parenchyma and pelvi-calyceine system of kidneys under the conditions of CKD.

M. Webb et al. [24] studied the diagnostic effectiveness of HRI for quantitative assessment of steatosis while examining 111 patients with histologically confirmed non-alcoholic fatty liver disease. They established a direct strong interrelation between the degree of steatosis according to the biopsy and HRI ( $r=0.82$ ;  $p<0.001$ ), which was also observed in patients with NASH with different

stages of liver fibrosis ( $r=0.8-0.9$ ). With lipids accumulation in the liver parenchyma >5% the analysis of the HRI index compared with the use of liver biopsy as a reference method indicates that the area under the ROC (receiver operating characteristic)-curve (AUROC) was 99.2% (95% confidence interval (CI) 98-100%). At the threshold value of HRI equal to 1.49 for the diagnosis of >5% steatosis the sensitivity and specificity were 100 and 91% respectively. For the diagnosis of liver steatosis with accumulation of lipids in parenchyma  $\geq 25\%$ , the threshold value of HRI was 1.86 with a sensitivity and specificity of 90%. The HRI value for predicting severe steatosis ( $\geq 60\%$ ) was 2.23 with a sensitivity of 90% and a specificity of 93% [24]. However, the diagnostic value of HRI under the conditions of the comorbidity of NASH with CKD was not studied.

The objective of the article is to find out clinical and ultrasonographic features of the course of NASH in comorbidity with obesity of the I degree, CKD of the I-III stages and arterial hypertension (AH) in comparison with the course of NASH against the background of obesity without CKD and AH by studying the frequency and intensity of the leading clinical and biochemical syndromes of NASH, comparison of ultrasonographic characteristics of NASH depending on the presence of CKD.

**Material and methods.** 162 patients with NASH were examined: 52 patients with NASH and obesity of the I degree (group 1), 53 patients with NASH and comorbid obesity of the I degree and CKD of the I-III stages (group 2), 57 patients with NASH and obesity of the I degree and CKD of the I-III stage with AH (group 3). To determine the dependence of the NASH course on the presence of CKD and AH, the group of patients was randomized according to age, sex, degree of obesity. The average age of patients was  $(45.8 \pm 3.81)$  years; there were 78 men and 84 women.

The diagnosis of NASH was made according to a unified clinical protocol approved by the MoH of Ukraine Order No. 826 dated November 6, 2014, in the presence of criteria for the exclusion of chronic diffuse liver disease of viral, hereditary, autoimmune or medicinal origin as a cause of cholestatic or cytolytic syndromes, as well as the results of the USG examination. Diagnosis and treatment of CKD was conducted in accordance with the clinical guidelines of the SI "Institute of Nephrology of NAMS of Ukraine" (2012) [5]. The study involved patients with CKD of the I-III stage without nephrotic syndrome with chronic uncomplicated pyelonephritis in the phase of exacerbation subsiding or with a latent course. Secondary hypertension syndrome of the I-II degree was found in 57 patients with CKD.

When the patients were admitted to the hospital, the functional state of the liver and kidneys was determined according to the generally accepted list of enzymes activity, pigment and nitrogen metabolism markers, proteinogram, lipidogram, ionogram, De Ritis ratio (AST/ALT ratio) calculations, glomerular filtration rates. To determine structural changes in liver parenchyma and kidneys USG examination was conducted. Echodensitometry approach with the calculation of HRI (Webb M. et al., 2009) was used with the purpose of quantitative assessment of liver echogenicity changes. The echodensitometry of the liver was carried out on an empty stomach on the Ultima PA apparatus ("Radmir", State Enterprise, JSC Research Institute of Radiotechnical Measurements, Kharkiv, Ukraine) using a convex sensor (frequency 3-5 MHz) with the subsequent digital histographic processing of ultrasound images. To calculate the HRI the right lobe of the liver was visualized on the device, the sensor was placed in the sagittal plane along the mid-clavicular line, displaying the section of the right kidney. Two regions with the highest possible homogeneity and without vessels or biliary tracts were chosen along the line, parallel to the long axis of the right kidney. The first sized 3.5×4cm (zone A) was located near the front surface of the liver. The second region sized 2×2cm (zone B) was localized in the cortical substance of the right kidney between the pyramids. Digital histographic index of the average intensity of the echo signal – MN was recorded in each region. The HRI was calculated according to the formula (Webb M. et al., 2009):  $HRI = MNA/MNV [24]$ . All patients underwent anthropometry with the determination of body mass index (BMI), waist circumference (WC), hip circumference (HC) and their ratio: waist/hip index ( $WHI = WC/HC$ ).

The statistical analysis of the results was carried out in accordance with the type of research and the types of numerical data that were obtained. Distribution normality was verified using the Lilliefors and Shapiro-Wilk tests and by the direct visual evaluation of eigenvalues distribution histograms. Quantitative indices having a normal distribution are represented as mean (M) ± standard error (S). In the nonparametric distribution the data are presented as median (Me) as a measure of position, upper (Q75) and lower (Q25) quartiles as a measure of dispersion. Discrete indices are presented in the form of absolute and relative frequencies (percentage of observations to the total number of examined). Parametric tests with the assessment of Student's t-test, Fisher's F-test were used to compare the data that had normal distribution. The median test, Mann-Whitney Rank U-test, and Wilcoxon signed-rank test for multiple comparisons (in the case of dependent groups) were used in abnormal distribution. The Pearson correlation analysis was used to estimate the degree of dependence between variables in parametric distribution and the Spearman rank correlation coefficient was used in the case of the indices distribution that significantly differed from the normal one. In order to compare discrete values in independent groups, the criterion  $\chi^2$  of maximum probability (log-likelihood) (MP  $\chi^2$ ) was used; to compare the pairs of discrete values, the calculation of the modification of the exact criterion by Fisher (mid-p) was used. Determination of the diagnostic advantage of the method was performed on the basis of assessing the quality of diagnostic procedures using ROC-analysis, with the determination of sensitivity, specificity, diagnostic value, area under the ROC-curve (AUROC), diagnostic odds ratio (DOR). Statistica for Windows version 8.0 (Stat Soft Inc., USA), Microsoft Excel 2007 (Mi-

Table 1. Frequency of occurrence of clinical and biochemical syndromes of non-alcoholic steatohepatitis depending on the presence of CKD and arterial hypertension, %

Syndromes	Groups of examined patients					
	NASH, n=52		NASH + CKD, n=53		NASH + CKD + AH, n=57	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Asthenic-vegetative	32	61.5	42	79.2	48	84.2
Dyspeptic	41	78.8	47	88.7	54	94.7
Discomfort in the right subcostal, lumbar region	17	32.7	45	84.9	53	93.0
Hepatomegaly	45	86.5	51	96.2	57	100.0
Splenomegaly	7	13.5	17	32.1	31	54.4
Hemorrhagic	5	9.6	9	17.0	15	26.3
Cytolysis	52	100.0	53	100.0	57	100.0
Cholestasis	11	21.2	19	28.3	28	49.1
Mesenchymal-inflammatory	25	48.1	38	71.7	47	82.5
Hepatocellular failure	11	21.2	24	45.3	29	50.9
Impaired glucose tolerance	45	86.5	49	92.5	55	96.5
Arterial hypertension of the I degree	-	0	-	0	22	38.6
Arterial hypertension of the II degree	-	0	-	0	35	61.4



crosoft, USA) software packages were used for statistical and graphical analysis of the obtained results.

**Results and their discussion.** NASH in the examined patients clinically manifested in the following way: asthenic-vegetative (61.5%), dyspeptic (nausea, bloating, stool disorders) (78.8%) symptoms, heaviness or discomfort in the right subcostal region (32.7%), hepatomegaly (86.5%), splenomegaly (13.5%), hemorrhagic disorders (bleeding gums, nasal, uterine, hemorrhoidal bleedings, bruising, petechiae on the skin) (9.6%), cholestatic symptoms (bitter taste in the mouth, itching skin, xanthoma, xanthelasma on the eyelids) (21.2%) and endocrine disorders: 100.0% of patients suffered from obesity of the I degree, in 86.5% impaired glucose tolerance (IGT) was diagnosed (Table 1). Cytolytic (100.0%), cholestatic (21.2%), mesenchymal-inflammatory syndrome (48.1%) and the hepatocellular failure syndrome (HCF) were found among biochemical syndromes in the examined patients.

The analysis of clinical manifestations of NASH shows that their frequency and intensity are likely to be higher in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups. In particular, the symptoms of asthenic-vegetative syndrome were observed more often: in 1.3 and 1.4 times ( $p<0.05$ ) respectively compared to patients in group 1, which was probably due to increased accumulation of metabolic products which were not removed by the liver under the conditions of concomitant CKD in the phase of exacerbation and CKD with AH.

Manifestations of dyspepsia in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups also occurred more often than in patients of the 1<sup>st</sup> group (13.7% and 20.5% respectively ( $p<0.05$ ), which indicates disorders of digestive processes due to the secretion of bile inadequate in its composition, probable concomitant disbacteriosis and dysbiosis of the colon resulted from the repeated courses of antibiotic therapy against CKD, uroseptics, and, probably, the admission of central mechanisms of nausea due to hypertension. A sensation of heaviness or moderate pain with palpation in the right subcostal and lumbar regions was also recorded in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups at a frequency exceeding the one in patients of the 1<sup>st</sup> group: in 2.5 and 2.8 times ( $p<0.05$ ), that was probably associated with the stretching of the Glisson's capsule of the liver due to hepatomegaly, with the accompanying dysfunction of the sphincter apparatus of the biliary tract, which is often observed in obese patients, as well as in those with CKD in the exacerbation phase, more pronounced under conditions of AH. Reliably hepatomegaly was detected with higher frequency in patients of groups 2 and 3 (by 11.6% and 16.2% ( $p<0.05$ )), as compared to patients in group 1 (Table 1) with a significant increase in the average size of the liver (by Kurlov, USG) in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups ( $p<0.05$ ). The degree of liver enlargement, in this case, may indicate an increase in the degree of liver steatosis or the degree of the inflammatory process activity, venous stasis, as well as the stage of liver fibrosis.

Clinically and biochemically cholestasis syndrome was diagnosed in 20.0% of patients with NASH of

group 1 and in 28.3% of patients in group 2, which was manifested by itching of the skin, bitterness in the mouth, presence of xanthomatous formations on the eyelids, hyperbilirubinemia due to direct fraction of bilirubin, increased activity of alkaline phosphatase (AP) and  $\gamma$ -GT. A small number of patients of the 1<sup>st</sup> group had splenomegaly (13.5%), however, in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups, the frequency of splenomegaly exceeded the rate in group 1 in 2.4 and 4.2 times ( $p<0.05$ ) respectively. Splenomegaly syndrome completely disappeared in patients of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups after treatment, which indicates the absence of persistent syndrome of portal hypertension, however, it remained in 36.8% of patients in group 3.

The syndrome of endocrine disorders was observed in all patients with NASH in the form of obesity of the I degree. At the same time, IGT was detected more often in the presence of CKD by 7.6%, and by 12.2% – in patients with CKD and AH (see Table 1). Consequently, the frequency of development of the main clinical syndromes of steatohepatitis in patients with NASH with concomitant CKD of the I-III stage in comparison with the isolated course of NASH has reliably increased. In the group of patients with NASH and obesity with CKD and AH a large proportion of patients suffered from hypertension of the II degree (61.4%), a small part had the first degree (38.6%).

The analysis of biochemical syndromes at NASH most frequently demonstrated an increase in the average index of ALAT activity in the blood serum, which, at an isolated course of NASH, exceeded the index in PHI by 2.3 times ( $p<0.05$ ) and ASAT by 3.0 times ( $p<0.05$ ) (Table 2). A case in point was a decrease in the De Ritis coefficient (ASAT/ALAT) by 25.2% ( $p<0.05$ ), which, in the absence of positive viruses markers of hepatitis B and C in serum, indicates non-alcoholic dysmetabolic and inflammatory liver diseases. Positive results of biochemical screening tests confirmed this fact: Steato-test and NASH-test ( $p<0.05$ ) and negative results of ASH-test ( $p<0.05$ ) in the examined patients, which excludes the alcoholic character of the disease.

In patients with NASH and concomitant CKD, the cytolysis syndrome was more intense, since the activity of ALAT exceeded the index in PHI by 3.7 times ( $p<0.05$ ), and the activity of ASAT – by 3.2 times ( $p<0.05$ ), which led to a decrease in the De Ritis coefficient by 13.6% ( $p<0.05$ ) compared to the PHI (Table 2). At the same time, in patients with NASH and CKD with AH, the cytolysis syndrome exceeded the indices of all groups of comparison: the ALAT activity was 4.0 times higher ( $p<0.05$ ), and the ASAT activity – 3.5 times ( $p<0.05$ ). It should be noted that the decrease in the De Ritis coefficient in this observation group, as compared with the normative one, was the lowest among the comparison groups (by 11.7% ( $p<0.05$ )) (see Table 2), since in addition to metabolic disorders the medication effects of drugs used in the treatment of exacerbations of CKD and AH with hepatotoxic action were probably involved in NASH pathogenesis. The content of total bilirubin in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups exceeded

Table 2. Indices of biochemical blood test in patients with non-alcoholic steatohepatitis depending on the presence of arterial hypertension (M±m)

Indices, unit of measurement	PHI, n=30	Groups of examined patients		
		NASH, n=52	NASH + CKD, n=53	NASH + CKD + AH, n=57
Total bilirubin, μmol/l	19.23±1.11	28.2±1.25 *	35.2±1.03 */**	51.5±1.28 */**/**
Direct bilirubin, μmol/l	4.52±0.25	8.6±0.23 *	10.1±0.35 */**	21.9±0.41 */**/**
Indirect bilirubin, μmol/l	14.73±0.38	19.6±1.12 *	25.1±0.97 */**	29.6±1.32 */**/**
ASAT, μmol/h×l	0.39±0.012	0.89±0.016 *	1.25±0.025 */**	1.37±0.013 */**/**
ALAT, μmol/h×l	0.38±0.014	1.15±0.014 *	1.41±0.011 */**	1.51±0.015 */**/**
De Ritis coefficient	1.03±0.018	0.77±0.005 *	0.89±0.004 */**	0.91±0.003 */**/**
GGT, mmol/h×l	5.22±0.13	6.14±0.12*	6.74±0.13*/**	7.29±0.11 */**
AP, mmol/h×l	1.23±0.02	1.43±0.01 *	1.72±0.02 */**	1.95±0.02 */**/**
Bile acids, mmol/l	1.27±0.01	2.42±0.02 *	2.83±0.06 */**	3.31±0.04 */**/**
Thymol test, conventional unit	2.82±0.13	3.72±0.11 *	4.33±0.13 */**	4.92±0.15 */**/**
Total protein, g/l	76.13±2.12	69.27±1.96	60.31±2.17*/**	58.12±1.38*/**
Albumins,%	59.37±2.23	53.21±2.38	43.63±2.35 */**	33.30±2.17*/**/**
Globulins,%	40.63±2.62	46.79±2.14	56.37±2.21*/**	66.70±2.23*/**/**
A/G coefficient	1.46±0.002	1.14±0.004 *	0.77±0.003 */**	0.50±0.002*/**/**

notes: 1. \* - reliable difference compared to the index in practically healthy individuals ( $p < 0.05$ );

2. \*\* - reliable difference compared to the index in patients with NASH ( $p < 0.05$ );

3/\*\* - reliable difference compared to the index in patients with NASH and CKD ( $p < 0.05$ )

the normative indices in 1.8 and 2.7 times ( $p < 0.05$ ) versus 1.5 times in patients of group 1 ( $p < 0.05$ ). It should be noted that the total bilirubin rate in the blood grew due to an increase in both of its fractions: conjugated – in 2.2 and 4.9 times ( $p < 0.05$ ) versus 1.9 times ( $p < 0.05$ ) in group 1, and unconjugated: increase in 1.7 and 2.1 times versus 1.3 times respectively ( $p < 0.05$ ).

The presence of cholestasis syndrome was indicated by an increase in the AP activity in 1.4 and 1.6 times ( $p < 0.05$ ) in patients of the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups versus 1.2 times ( $p < 0.05$ ) in patients of the 1<sup>st</sup> group,  $\gamma$ -GT activity, in 1.3 and 1.4 times respectively versus 1.2 times ( $p < 0.05$ ) and the content of bile acids in blood, which exceeded the indices in the PHI in 2.2 and 2.6 times respectively versus 1.9 times in the 1<sup>st</sup> group ( $p < 0.05$ ) (see Table 2).

Mild manifestations of the deficiency of protein synthesis by the liver and, probably, loss of protein with the urine in comorbidity with CKD were found in 45.3% of patients in group 2 and 50.9% of patients in group 3 with a decrease in the average rate of total protein (in 1.3 times ( $p < 0.05$ )) and albumin content in the blood (in 1.4 and 1.8 times respectively ( $p < 0.05$ )), in the 1<sup>st</sup> group only a tendency to the decrease of these indices was observed ( $p > 0.05$ ), although in 11 (21.2%) patients there was a reliable decrease in albumin content in the blood ( $p < 0.05$ ). The presence of mesenchymal and inflammatory syndrome in patients with NASH in groups 2 and 3 was detected by hyperglobulinemia (in 1.4 and 1.7 times respectively ( $p < 0.05$ )), an increase in the thymol test (in the 1<sup>st</sup> group – in 1.3 times ( $p < 0.05$ ), in the 2<sup>nd</sup> group – in 1.5 times ( $p < 0.05$ ))

and in the 3<sup>rd</sup> group – in 1.7 times ( $p < 0.05$ ), as well as a decrease in the albumin-globulin ratio (in group 1 – in 1.2 times ( $p < 0.05$ ), in group 2 – in 1.9 times ( $p < 0.05$ ), in the third group – in 2.9 times ( $p < 0.05$ ) (Table 2), which was stipulated by the CKD exacerbation.

The USG of the liver of the examined patients revealed the probable degree of hepatomegaly (Table 1), medium-grained structure transformation and mosaic seals (hyperechogenicity, “irregularity”) of liver parenchyma due to its inflammation, as well as a significant degree of liver steatosis (a significant percentage of dorsal fading of the echo signal). In the examined patients there was a statistically significant increase in HRI ( $p < 0.001$ ). Thus, the median and the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quartile values for the HRI in the PHI were 1.13 (1.0-1.27), in the 1<sup>st</sup> group they were 1.92 (1.75-2.16), in the 2<sup>nd</sup> group – 2.44 (95% CI 2.27-2.61) and in the 3<sup>rd</sup> group – 2.51 (95% CI 2.32-2.70). The increase in HRI is associated with the amount of accumulated lipids in the parenchyma of the organ, that indicates the presence of a direct statistically significant strong correlation between the degree of steatosis (according to Steato-test) and HRI ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.001$ ). Correlation between the HRI and clinical-laboratory results in the PHI was not revealed. However, in patients with NASH against the background of obesity, changes in the echogenicity of the liver, caused by non-alcoholic steatosis, in various degrees were associated with anthropometric and laboratory indices. The direct statistically reliable relation of different degrees is established between HRI and HOMA-IR ( $r = 0.75$ ;  $p < 0.001$ ), BMI ( $r = 0.70$ ;  $p < 0.001$ ), WC/HC

( $r=0.71$ ;  $p<0.001$ ), ALAT ( $r=0.32$ ;  $p<0.05$ ), AP ( $r=0.37$ ;  $p<0.05$ ), GGT ( $r=0.29$ ;  $p<0.05$ ), triacylglycerols rate in the blood ( $r=0.54$ ;  $p<0.001$ ). At the same time in patients with NASH and CKD, correlation bonds matrix slightly changed its force: the direct statistically reliable interconnection of higher degree was established between HRI and HOMA-IR ( $r=0.79$ ;  $p<0.001$ ), BMI ( $r=0.75$ ;  $p<0.001$ ), WC/HC ( $r=0.76$ ;  $p<0.001$ ), ALAT ( $r=0.38$ ;  $p<0.05$ ), AP ( $r=0.43$ ;  $p<0.05$ ), GGT ( $r=0.41$ ;  $p<0.05$ ), triacylglycerols rate in the blood ( $r=0.67$ ;  $p<0.001$ ).

To determine the diagnostic value of HRI we used the ROC-analysis, according to which the increase of this index is an effective marker for the diagnosis of NASH, in which AUROC for HRI was 0.97 (95% CI 0.96-0.98;  $p<0.001$ ). The threshold value for HRI, at the growth of which NASH was diagnosed, was calculated at the level  $>1.49$ , and the sensitivity, specificity, PPV and NPV were 93.3%; 100%; 100% and 72.8% respectively. Analysis of the results of the diagnostic test for patients with a comorbidity of NASH and CKD indicates that AUROC for HRI was 0.99 (95% CI 0.98-1.0;  $p<0.001$ ), and sensitivity and NPV increased to 96.8 % and 87.2% respectively at the calculated optimal threshold value of HRI  $>1.52$ . For HRI a moderate increase in the threshold value in parallel with increasing diagnostic value is noted. It indicates that increased echogenicity of the liver parenchyma is a sensitive marker of the ultrasound signal for detecting the growth of steatosis degree.

**Conclusions.** 1. Clinical course of non-alcoholic steatohepatitis in comorbidity with obesity and CKD is characterized by higher frequency and intensity of clinical and biochemical syndromes, the manifestation of which is likely to increase with the occurrence of secondary arterial hypertension (syndromes of portal hypertension, cholestasis, mesenchymal inflammation).

2. The comorbid course of NASH with CKD is characterized by higher degree of liver steatosis (HRI is 1.3 times higher than that in the group of patients with NASH,  $p<0.05$ ), and higher diagnostic threshold of the hepatorenal index values, which correlates with strong interdependence with liver steatosis degree, determined by Steato-test ( $r=0.87$ ;  $p<0.001$ ).

The prospect of further research in this direction is the development of effective methods for the treatment of patients with a comorbid course of NASH and CKD against the background of obesity with arterial hypertension syndrome.

## REFERENCES

1. Динник О.Б., Кобиляк Н.М., Мішанич О.М. та ін. Ультразвукова еластографія: різноманітність та пастки: Матеріали IV конгресу Української асоціації фахівців ультразвукової діагностики (Севастополь, 14–16 травня, 2012 р. К.: ВБО «Український Доплерівський Клуб», 2012. С. 133.
2. Журавльова А.К. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет 2-го типу і ожиріння. Ліки України. 2012. №7 (163). С. 16-20.
3. Звягинцева Т.Д., Чернобай А.И., Глущенко С.В. Хронические заболевания печени и нарушение синтеза S-аденозил-L-метионина. Сучасна гастроентерол. 2014. №3 (77). С. 80–87.
4. Харченко Н.В., Анохина Г.А., Харченко В.В. Коррекция нарушений функционального состояния печени, содержания липидов, гомоцистеина в крови, эндотелиальной функции и энергетического обмена у больных неалкогольным стеатогепатитом в сочетании с гипертонической болезнью. Сучасна гастроентерол. 2011. № 1 (57). С. 27–32.
5. Хухліна О. С., Мандрик О.Є., Антонів А.А., Нечіпай Ж.А. Діагностичні маркери фіброзування печінки у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки поєднану з гіпертонічною хворобою та ожирінням. Вісник проблем біол. і мед. 2013. Т.1, Вип. 3. С. 250-253.
6. Хухліна О.С., Мандрик О.Є., Антонів А.А. Особливості патоморфологічних змін та інтенсивності фіброзування у печінці хворих на неалкогольний стеатогепатит за коморбідного перебігу з гіпертонічною хворобою II стадії. Бук. мед. вісник. 2013. Т. 17, №3. С.191-195.
7. Ягмур В.Б. Неалкогольна жирова хвороба печінки: сучасний погляд на патогенез, діагностику та лікування. Гастроентерологія. 2013. № 3 (49). С.
8. Angulo P., Hui J.M., Marchesini G. et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. Hepatology. 2007. Vol. 45, №4. P. 846–854.
9. Brunt E.M., Kleiner D.E., Wilson L.A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. Hepatology. 2011. Vol. 53, № 3. P. 810–820.
10. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E. et al. Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Am. J. Gastroenterol. 2012. Vol. 107. P. 811–826.
11. Cusi K., Chang Z., Harrison S. et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-nalcoholic fatty liver disease (NAFLD). J. Hepatol. 2014. Vol. 60, №1. P. 167–174.
12. Festi D., Schiumerini R., Scaioi E., Colecchia A. Letter: FibroTest for staging fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - authors' reply. Aliment. Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 37, №6. P. 656–657.
13. Gambino R., Cassader M., Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. Ann. Med. 2011. Vol. 43. P. 617–649.
14. Larrain S., Rinella M.E. A myriad of pathways to NASH. Clin. Liver Dis. 2012. Vol. 16, №3. P. 525–548. [

15. Lichtinghagen R., Pietsch D., Bantel H., et al. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J. Hepatol.* 2013. Vol. 59, №2. P. 236–242.
16. Mazhar S.M., M. Shiehorteza, Sirlin C.B. Noninvasive assessment of hepatic steatosis. *Clinical Gastroenterol. and Hepatol.* 2009. Vol. 7, № 2. P. 135-140.
17. Nascimbeni F., Pais R., Bellentani S. et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J. Hepatol.* 2013. Vol. 59, №4. P. 859–871.
18. Rinella M.E., Loomba R., Caldwell S.H. et al. Controversies in the diagnosis and management of NAFLD and NASH. *Gastroenterol. Hepatol. (NY).* 2014. Vol. 10, №4. P. 219–227.
19. Schwenzer N.F., Springer F., Schraml C. et al. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J. Hepatol.* 2009. Vol. 51, №3. P. 433–445.
20. Vernon G., Baranova A., Younossi Z.M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011. Vol. 34. P. 274–285.
21. Vuppalanchi R., Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their management. *Hepatology.* 2009. Vol. 49. P. 306–317.
22. Webb M., Yeshua H., Zelber-Sagi S. et al. Diagnostic value of a computerized hepatorenal index for sonographic quantification of liver steatosis. *Am. J. Roentgenol.* 2009. Vol. 192 (4). P. 909–914.

## SUMMARY

### PECULIARITIES OF THE CLINICAL COURSE OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS AGAINST THE BACKGROUND OF THE CHRONIC KIDNEY DISEASE OF THE I-III STAGE WITH SECONDARY ARTERIAL HYPERTENSION

**Hukhlina O., Antoniv A., Dudka I., Dudka T., Mandryk O.**

*Higher State Educational Institution of Ukraine Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine*

The article addresses the theoretical generalization of the clinical study of non-alcoholic steatohepatitis peculiarities in comorbidity with obesity and chronic kidney disease of the I-III stage, characterized by higher frequency and intensity of clinical and biochemical syndromes, the manifestation of which is likely to increase the occurrence of secondary arterial hypertension (portal hypertension syndromes, cholestasis, mesenchymal inflammation). Comorbid course of non-alcoholic steatohepatitis with chronic kidney disease is characterized by higher degree of liver steatosis compared to the patients with only non-alcoholic steatohepatitis ( $p < 0.05$ ), and a higher diagnostic threshold

of the hepatorenal index values, which correlates with the Steato-test index ( $p < 0.001$ ) with strong interdependence.

**Keywords:** non-alcoholic steatohepatitis, chronic kidney disease, clinical syndromes, liver steatosis, hepatorenal index.

## РЕЗЮМЕ

### ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК I-III СТАДИИ И ВТОРИЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

**Хухлина О.С., Антонив А.А., Дудка И.В., Дудка Т.В., Мандрык О.Е.**

*Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина*

В статье приведено теоретическое обобщение клинического исследования особенностей течения неалкогольного стеатогепатита в коморбидности с хронической болезнью почек I-III стадии, которые характеризуются высокой частотой и интенсивностью клинических и биохимических синдромов. Их манифестация достоверно возрастает в условиях присоединения вторичной артериальной гипертензии (синдром портальной гипертензии, холестаза, мезенхимальное воспаление). Для коморбидного течения неалкогольного стеатогепатита с хронической болезнью почек I-III стадии характерна более высокая степень стеатоза печени, чем у больных только неалкогольным стеатогепатитом ( $p < 0,05$ ) и выше диагностический порог значений гепаторенального индекса, который находится в тесной взаимозависимости с показателем Steato-test ( $p < 0,001$ ).

## რეზიუმე

კლინიკური არაალკოჰოლური სტეატოჰეპატიტის მიმდინარეობის თავისებურება თირკმელების ქრონიკული I-III სტადიის დაავადებით და მეორადი არტერიული ჰიპერტენზიით ავადმყოფებში

ო. ხუხლინა, ა. ანტონივი, ი. დუდკა, ტ. დუდკა, ო. მანდრიკი

*ბუკოვინის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ჩერნოვცი, უკრაინა*

სტატიაში მოცემულია არაალკოჰოლური სტეატოჰეპატიტით და თირკმელების I-III სტადიის ქრონიკულ დაავადების ფონზე ჩატარებული კლინიკური გამოკვლევების შედეგების შეფასება. გამოვლენილია აღნიშნული დაავადების მიმდინარეობისათვის დამახასიათებელი კლინიკური და ბიოქიმიური სინდრომების ინტენსივობის სისხირო,

მეორადი არტერიული ჰიპერტენზიის თანდართვის პირობებში (პორტალური ჰიპერტენზიის სინდრომი, ხოლესტაზი, მეზენსიმური ანთეზა). თირკმელების I-III სტადიის ქრონიკულ დაავადებასთან ერთად მიმდინარე არაალკოჰოლური სტეატოჰეპატიტისათვის დამახასიათებელია

ღვიძლის სტეატოზის უფრო მაღალი ხარისხი, ვიდრე ავადმყოფებში მხოლოდ არაალკოჰოლური სტეატოჰეპატიტით ( $p<0,05$ ), ასევე, უფრო მაღალია ჰეპატორენალური ინდექსის მაჩვენებლის დიაგნოსტიკური ზღვარი, რომელიც მკიდრო კავშირშია Steato-test-ის მაჩვენებელთან ( $p<0,001$ ).

## LEVELS OF NEUROSPECIFIC MARKERS IN CEREBROSPINAL FLUID OF ADULT PATIENTS WITH BACTERIAL MENINGITIS

Sokhan A., Zots Y., Gavrylov A., Iurko K., Solomennik A., Kuznietsova A.

*Kharkiv National Medical University, Department of infectious diseases, Ukraine*

Bacterial meningitis is a severe infection of the meninges (the membranes surrounding the brain and spinal cord) that is associated with high mortality and morbidity rates despite optimal antibiotic therapy and advances in critical care [8].

Bacterial meningitis is fatal in 5% to 40% of patients and causes neurologic sequelae such as focal neurologic deficits - hearing impairment, aphasia, quadriplegia, spasticity, mental retardation and other [8,12]. Up to 30% of survivors have chronic disorders of the central nervous system function [3,8]. The mechanism of brain damage during bacterial neuroinfections not entirely clear, but we know that once bacteria have gained access to the central nervous system, their multiplication triggers a complex host response consisting of humoral and cellular immune mediators, reactive oxygen intermediates, matrix-metalloproteinases, and other host-derived factors. Alterations of the cerebral vasculature, with disruption of the blood brain barrier and global and focal ischemia, ultimately lead to functional and structural brain damage. Neuronal damage is caused by the dual effects of an overwhelming inflammatory reaction and direct effects of bacterial toxins [3].

For the diagnosis of brain lesions in clinical practice we use imaging techniques such as MRI and the determination of focal neurological symptoms, behavioral or mental disorders, loss of consciousness. At the same time, patients with acute meningitis often come to the hospital with convulsions, septic shock, delirium, which exclude the possibility of brain MRI or CT scan. Currently, we have an opportunity to improve our knowledge of the pathogenesis and diagnosis of brain lesions by determining the levels of neurospecific markers in patient's cerebrospinal fluid and blood. Thus, proven diagnostic and prognostic value of increased levels of neuron specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and S-100 protein in patients with stroke, traumatic brain injuries, lesions of the central nervous system in newborns, multiple sclerosis [1,2,4,5,7,9,10].

We chose markers which are specific for different cells in the brain. NSE – intracellular neuronal cytoplasmic enzyme, S-100 – a protein specific for brain glial cell [1,4,10]. GFAP levels rise during the destruction of glial cells and breach the blood-brain barrier function [2,6,7], MBPs the major structural component of myelin that spirally wrap their plasma membrane around axons [7,11]. It may help to understand which specific brain cells are damaged in the process of acute bacterial meningitis, identify the diagnostic value of determining these neurospecific markers in the CSF.

The aim of study was to evaluate the diagnostic and prognostic value of cerebrospinal fluid levels of NSE, MBP, GFAP and S-100 in patients with acute bacterial meningitis.

**Material and methods.** Potential study participants were admitted in Kharkiv Regional Clinical Infectious Diseases Hospital (Kharkiv, Ukraine). The inclusion of patients in the research program conducted with the selection criteria. Inclusion criteria: clinical symptoms typical for acute meningitis, etiological confirmation of pneumococcal or meningococcal etiology of disease by bacteriological methods or CSF PCR, age of patients- 18 to 65 years, voluntary consent of the patient to participate in the study. Patients were excluded in the following cases: the presence of comorbidities, which can influence the level of neurospecific proteins - HIV, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, hematological diseases, malignant neoplasms.

At hospital admission, demographic data were obtained from patients, investigation along with a number of clinical indices. Briefly, anamnesis of the disease, complaints and neurological status were recorded. Past medical history was obtained along with routine laboratory exams. All significant events up to hospital discharge or death were recorded.

Patients were divided into groups depending on the etiology and severity of the disease. Were analyzed 60 cases of acute bacterial meningitis. As a comparison group

Table. CSF concentrations of neuroinjury biomarkers (S-100 protein, NSE, GFAP, MBP) in patients with acute bacterial meningitis within the first 24 h of hospital admission and on 10-12 day of treatment

Group of patients	CSF protein S-100 level, ng/l, mean ± SE		CSF NSE level, mcg/l, mean ± SE		CSF GFAP level, ng/ml, mean ± SE		CSF MBP level, ng/ml, mean ± SE	
	first 24 h of hospital admission	10-12 day of treatment	first 24 h of hospital admission	10-12 day of treatment	first 24 h of hospital admission	10-12 day of treatment	first 24 h of hospital admission	10-12 day of treatment
moderate meningococcal meningitis (n=9)	496,14±38,53 <sup>1*</sup>	431,35±54,21	18,20±1,97 <sup>1*</sup>	17,15±1,68	4,02±0,28 <sup>1*</sup>	2,58±0,32	6,12±0,31	6,95±0,54
severe meningococcal meningitis (n=19)	1389,41±105,73 <sup>1*</sup>	1094,65±95,21 <sup>1*</sup>	25,57±2,55 <sup>1*</sup>	18,38±3,37 <sup>1*</sup>	8,21±1,12 <sup>1*</sup>	4,89±0,65 <sup>1*</sup>	11,56±0,64 <sup>1*</sup>	10,48±0,92 <sup>1*</sup>
moderate pneumococcal meningitis (n=10)	550,80±19,51 <sup>1*</sup>	480,21±61,73 <sup>1*</sup>	20,28±1,91 <sup>1*</sup>	16,89±1,34	3,51±0,33 <sup>1*</sup>	2,81±0,23	6,70±0,41 <sup>1*</sup>	5,33±0,61
severe pneumococcal meningitis (n=19)	1431,53±112,56 <sup>1*</sup>	922,31±197,82 <sup>1*</sup>	24,52±3,11 <sup>1*</sup>	18,41±3,12 <sup>1*</sup>	8,94±1,35 <sup>1*</sup>	4,60±0,78 <sup>1*</sup>	12,32±0,57 <sup>1*</sup>	11,63±0,74 <sup>1*</sup>
non-survivors (n=10)	1817±162,56 <sup>1*2*</sup>		28,31±4,56 <sup>1*2*</sup>		14,88±1,29 <sup>1*2*</sup>		13,89±1,02	
Control group (n=12)	355,63±29,17		15,71±0,47		2,27±0,12		5,43±0,45	

<sup>1\*</sup> - differences between results with regard to the control group  $P \leq 0,05$ ;

<sup>2\*</sup> - differences between results of survivors and non-survivors  $P \leq 0,05$

CSF of 12 patients with acute respiratory infection (ARI) and meningism was analyzed.

CSF was aspirated by lumbar puncture. Performing of lumbar puncture was in a line with the usual protocols of diagnostics and treatment of patients with signs of meningitis. Patients involved in the study were not subjected to additional invasive procedures. Collecting CSF in patients with ARI and meningism performed only at the beginning of treatment to exclude neuroinfection. The CSF samples were immediately frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until subsequent analysis. CSF NSE, MBP, GFAP and S-100 protein level were identified on admission and after 10-12 days of treatment. Analysis of NSE, MBP, GFAP and S-100 protein CSF concentrations was performed using an enzyme immunoassay based on the sandwich technique in Central scientific research laboratory of Kharkiv National Medical University. Work conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the ethics committee of Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine. All data were analyzed using «BioStat» and «Microsoft Excel» programs. P value of  $<0,05$  was used for significance.

**Results and their discussion.** Of the 67 patients 36 with pneumococcal and 31 – meningococcal etiology of the disease (n=27 males; mean age 46,83 years), 12 with

meningism as comparison group. All patients in comparison group were of moderate severity. In the group of patients with pneumococcal meningitis in 10 (27,78%) were moderate, 26 (72,22%) – severe, among them 7 (19,44%) patients died. In the group of patients with meningococcal meningitis – 9 (29,03%) were moderate, 22 (71,97%) – severe, 3 (9,68%) patients died. All severe patients were admitted to hospital with symptoms of cerebral edema and neurological symptoms. The mortality rate was 14,93%. The lethal outcome occurred within 1 to 8 days of hospital treatment.

The obtained data show a significant increase of the CSF level of all neurospecific markers on the first day of admission to the hospital. CSF levels of neurospecific markers dependent on severity of the disease – the highest levels were observed in non-survivors (table 1). Reliable difference in levels of all neurospecific markers in the CSF of patients according to the etiology of meningitis was not found.

In severe cases the level of neurospecific markers was significantly higher than that in moderate patients. Thus, in patients with moderate severity of meningococcal meningitis level of protein S-100 in admission was  $496,14 \pm 38,53$  ng/l, with pneumococcal meningitis –  $550,80 \pm 19,51$  ng/l (Table). In patients with severe course level of protein S-100 was significantly higher –  $1389,41 \pm 105,73$  ng/l in

meningococcal and  $1431,53 \pm 112,56$  ng/l in pneumococcal meningitis ( $P < 0,001$ ). In patients with ARI and meningism level S-100 was significantly lower than in all patients with bacterial meningitis –  $355,63 \pm 29,17$  ng/l ( $P < 0,05$ ). After 10-12 days of treatment levels of protein S-100 decreased, but was still significantly elevated than in the control group ( $P < 0,05$  and  $P < 0,001$ ). In severe course levels of protein S-100 significantly elevated than in moderate severity ( $P < 0,001$ ) (Table).

Significant increase CSF NSE level was noted in patients within the first 24 h of hospital admission (Table). In all patients with bacterial meningitis CSF NSE level was significantly higher compared with the control group ( $P < 0,05$ ). Thus, in patients with moderate severity meningococcal and pneumococcal meningitis level of NSE in CSF was  $18,20 \pm 1,97$  and  $20,28 \pm 1,91$  mcg/l. The level of NSE also depends on the severity and period of illness. Within the first 24 h of hospital admission CSF NSE level in severe meningococcal meningitis was  $25,57 \pm 2,55$  mcg/l, severe pneumococcal meningitis –  $24,52 \pm 3,11$  mcg/l, which significantly higher than in patients with moderate severity and in the control group ( $P < 0,01$ ). After 10-12 days of treatment, NSE level decreased, but in patients with severe disease, anyway, was higher than in the control group ( $P < 0,05$ ) (Table).

The highest CSF level of GFAP was observed at admission in CSF of non-survivors –  $14,88 \pm 1,29$  ng/ml ( $P < 0,001$ ). In CSF of patients with moderate pneumococcal meningitis CSF level of GFAP was  $3,51 \pm 0,33$  ng/ml, meningococcal –  $4,02 \pm 0,28$  ng/ml, and in severe pneumococcal meningitis –  $8,94 \pm 1,35$  ng/ml, in severe meningococcal meningitis –  $8,21 \pm 1,12$  ng/ml ( $P < 0,01$ ) (Table). After 10-12 days of treatment, patients CSF GFAP level was significantly reduced almost to control group levels, in severe patient it was significantly higher ( $P < 0,05$ ) (Table).

In the first 24 h of hospital admission CSF level of MBP in moderate patients with pneumococcal meningitis was  $6,70 \pm 0,41$  ng/ml, meningococcal –  $6,12 \pm 0,31$  ng/ml, in control group –  $5,43 \pm 0,45$  ng/ml. In severe cases of pneumococcal meningitis MBP concentration was –  $12,32 \pm 0,57$  ng/ml, meningococcal meningitis –  $11,56 \pm 0,64$  ng/ml ( $P < 0,05$ ). Although the level of MBP was significantly higher in patients with severe bacterial meningitis ( $P < 0,05$ ), it did not differ in patients with moderate and control group. We found no significant differences between CSF levels of MBP in severe survivors and non-survivors.

The present findings indicate that severe survivors and non-survivors had higher CSF neurospecific markers S-100, NSE, GFAP and MBP levels than patients from the other groups. The severe survivors and non-survivors with acute bacterial meningitis were characterized by heterogeneous neurological disorders and symptoms of brain edema. The lack of an increase of CSF NSE, S-100 protein and GFAP in moderate patients with meningitis, was particularly surprising, since in those patients the inflammatory involvement of brain parenchyma is probably negligible. This indicates the presence of damages of neurons, glial

cells, even in patients who have no clinical symptoms of brain damage. Differences in the CSF levels of GFAP, NSE, S-100 protein and MBP in groups of patients with varying degrees of severity can assume that in the development of brain damage tissue during acute bacterial neuroinfections the first stage there is damage of glial cells responsible for the blood-brain barrier function, then start neuron damages and then myelin fiber.

These results indicate that CSF levels of NSE, S-100 protein, GFAP and MBP provides a good indicator for evaluation of brain cell damage and prognosis for patients with acute bacterial meningitis. Thus, the determination of neurospecific markers' levels in cerebrospinal fluid is informative for evaluating the brain cells damages not only in patients with stroke, brain injury, subarachnoid hemorrhage, as shown by other studies [1,2,4,5,7,9,10], but also in patients with acute bacterial meningitis.

## REFERENCES

1. Brunkhorst R, Pfeilschifter W, Foerch C., et al. Astroglial Proteins as Diagnostic Markers of Acute Intracerebral Hemorrhage-Pathophysiological Background and Clinical Findings. *Translational Stroke Research*. 2010;1(4): 246–51.
2. Fünfschilling U., Supplie L.M., Mahad D., Boretius S., Saab A.S., Edgar J., Brinkmann B.G., Kassmann C.M., Tzvetanova I.D., Möbius W. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 2012;485:517–521.
3. Gerber J., Nau R. 2010. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr. Opin. Neurol*. 23:312–318
4. Gmitterová K, Heinemann U, Krasnianski A, Gawinecka J, Zerr I. Cerebrospinal fluid markers in the differentiation of molecular subtypes of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur J Neurol*. 2016 Jun;23(6):1126-33. doi: 10.1111/ene.12991. Epub 2016 Mar 31.
5. Hajduková L, Sobek O, Prchalová D, et al. Biomarkers of Brain Damage: S100B and NSE Concentrations in Cerebrospinal Fluid—A Normative Study. *BioMed Research International*. 2015;2015:379071. doi:10.1155/2015/379071.
6. Hoyer C., Eisele P., Ebert A.D., Schneider S., Gass A., Fatar M., Szabo K., Alonso A. Blood-CSF-barrier dysfunction is a marker for encephalitic involvement in patients with aseptic meningitis/meningoencephalitis. *Journal of clinical virology*. 2016 Nov; 84:82–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.10.006>
7. Kulbe JR, Geddes JW. Current status of fluid biomarkers in mild traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 2016;275(0 3):334-352.
8. Lingani, C., Bergeron-Caron, C., Stuart, J.M., Fernandez, K., Djingarey, M.H., Ronveaux, O. et al. Meningococcal meningitis surveillance in the African meningitis belt, 2004-2013. *Clin Infect Dis*. 2015; 61: S410–S415; DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ597>
9. Papa L, Robertson CS, Wang KKW, Brophy GM, Hannay HJ, Heaton S, et al. Biomarkers improve clinical

outcome predictors of mortality following non-penetrating severe traumatic brain injury. *Neurocrit Care* (2015) 22:52–64.10.1007/s12028-014-0028-2

10. Rahati M, Nozari M, Eslami H, Shabani M, Basiri M., et al. Effects of enriched environment on alterations in the prefrontal cortex GFAP- and S 100 B-immunopositive astrocytes and behavioral deficits in MK-801-treated rats. *Neuroscience*. 2016;Apr 5. pii: S0306-4522(16)30052-5

11. Snaidero N., Möbius W., Czopka T., Hekking L.H., Mathisen C., Verkleij D., Goebbels S., Edgar J., Merkler D., Lyons D.A. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*. 2014;156:277–290.

12. Zhang Y, Wei D, Guo X, Han M, Yuan L, Kyaw MH. Burden of Neisseria meningitidis infections in China: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health*. 2016;6(2):020409. doi:10.7189/jogh.06.020409.

## SUMMARY

### LEVELS OF NEUROSPECIFIC MARKERS IN CEREBROSPINAL FLUID OF ADULT PATIENTS WITH BACTERIAL MENINGITIS

Sokhan A., Zots Y., Gavrylov A., Iurko K., Solomennik A., Kuznetsova A.

*Kharkiv National Medical University, Department of Infectious Diseases, Ukraine*

At present, the great attention is given to the neurospecific markers as their elevated level in the cerebrospinal fluid corresponds to the degree of destruction of relevant CNS cells. Therefore, actual direction of the studies of the pathogenesis and diagnosis of CNS diseases is to determine levels of neurospecific markers in the cerebrospinal fluid (CSF). The purpose of the study was to evaluate the diagnostic and prognostic role of NSE, S-100 protein, GFAP and MBP levels in CSF of patients with acute bacterial meningitis. S-100 protein, NSE, GFAP and MBP levels in CSF of patients with acute pneumococcal and meningococcal meningitis were determined during admission and after 10-12 days of treatment. Patients were divided into groups depending on the etiology and severity of the disease. 60 cases of acute bacterial meningitis, as a study group, and 12 cases with acute respiratory infection and meningism, as a control group, were analyzed. It is shown that CSF levels of NSE, S-100 protein, GFAP and MBP on the first day of admission were significantly increased ( $P<0,05$ ), depending on the severity of the disease. The highest levels of neurospecific markers have been identified in non-survivors ( $P<0,001$ ). The concentration changes of CSF neurospecific markers are found to be helpful as a diagnostic and prognostic marker in acute bacterial meningitis.

**Keywords:** meningitis, neurospecific markers, CSF, diagnostic marker.

## РЕЗЮМЕ

### УРОВНИ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫМ МЕНИНГИТОМ

Сохань А.В., Зоц Я.В., Гаврилов А.В., Юрко К.В., Соломенник А.О., Кузнецова А.А.

*Харьковский национальный медицинский университет, кафедра инфекционных болезней, Украина*

На сегодняшний день большое внимание уделяется изучению нейроспецифических маркеров, специфичных для тканей нервной системы. Повышенный уровень нейроспецифических маркеров в cerebrospinalной жидкости (ЦСЖ) соответствует степени разрушения клеток центральной нервной системы (ЦНС). Поэтому актуальным направлением исследований патогенеза и диагностики заболеваний ЦНС является определение уровней нейроспецифических маркеров в ЦСЖ. Целью исследования явилась оценка диагностической и прогностической роли уровней нейронной специфической энolahзы, основного белка миелина, глиального фибриллярного кислого белка в cerebrospinalной жидкости у пациентов с острым бактериальным менингитом в динамике заболевания. В ЦСЖ пациентов с острым пневмококковым и менингококковым менингитом определен уровень белка S-100, нейронной специфической энolahзы (NSE), основного белка миелина (MBP), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) при поступлении в стационар и спустя 10-12 дней после лечения. Проанализировано 60 случаев острого бактериального менингита и 12 случаев острой респираторной инфекции и менингизма в качестве сравнительной группы. Пациенты, в зависимости от этиологии и тяжести заболевания, разделены на группы. Показано, что уровни NSE, белка S-100, GFAP и MBP в ЦСЖ больных при поступлении были достоверно повышены ( $p<0,05$ ) и находились в прямой зависимости от тяжести заболевания. Наивысшие уровни нейроспецифических маркеров идентифицированы у умерших ( $p<0,001$ ). Эти показатели могут быть использованы как диагностический и прогностический маркер при остром бактериальном менингите.

## რეზიუმე

ცერებროსპინალურ სითხეში ნეიროსპეციფიკური მარკერების დონე ბაქტერიული მენინგიტით ზრდასრულ ავადმყოფებში

ა. სოხანი, ია. ზოცი, ა. გავრილოვი, კ. იურკო, ა. სოლომენიკი, ა. კუზნეცოვა

*ხარკოვის ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, ინფექციურ დაავადებათა კათედრა, უკრაინა*

სადღეისოდ დიდი ყურადღება ეთმობა იმ ნეიროსპეციფიკურ მარკერებს, რომლებიც სპეციფი-



ურია ნერვული სისტემის ქსოვილებისათვის. ცერებროსპინალურ სითხეში (ცსს) ნეიროსპეციფიური მარკერების დონე პირდაპირ პროპორციულია ცენტრალური ნერვული სისტემის შესაბამის უჯრედების რღვევის ხარისხის; აქედან გამომდინარე, პათოგენეზის გამოკვლევათა და ნერვული სისტემის დაავადებათა აქტუალურ მიმართულებას წარმოადგენს ცერებროსპინალურ სითხეში ნეიროსპეციფიური მარკერების დონის განსაზღვრა.

კვლევის მიზანი იყო ცერებროსპინალურ სითხეში NSE-ის, S-100 ცილის, GFAP და MBP დონეების დიაგნოსტიკური და პროგნოსტიკური როლის შეფასება ავადმყოფებში მწვავე ბაქტერიული მენინგიტით დაავადების დინამიკაში. მწვავე პნევმოკოკური და მენონგოკოკური მენინგიტით პაციენტების ცსს-ში გინისაზღვრა S-100 ცილის, NSE, GFAP და MBP დონე სტაციონარში მიღები-

სას და მკურნალობის 10-12 დღის შემდეგ. გაანალიზებულია მწვავე ბაქტერიული მენინგიტის 60 შემთხვევა და შედარებითი ჯგუფის სახით 12 პაციენტი მწვავე რესპირატორული ინფექციით და მენინგიტით. პაციენტები ეთიოლოგიისა და დაავადების სიმძიმის გათვალისწინებით გაყოფილი იყო ჯგუფებად.

გამოვლინდა, რომ ავადმყოფების კლინიკაში მიღების მომენტში NSE-ის, S-100 ცილის, GFAP და MBP დონე ცსს-ში იყო სარწმუნოდ მაღალი ( $p < 0,05$ ) და პირდაპირ დამოკიდებულებაში იყო დაავადების სიმძიმესთან. ნეიროსპეციფიური მარკერების უმაღლესი დონეები იდენტიფიცირებული იყო გარდაცვლილებში ( $p < 0,001$ ). აღნიშნული მონაცემები შეიძლება გამოყენებული იქნას პროგნოსტიკურ მარკერებად ბაქტერიული მენინგიტის დროს.

---

## EFFECT OF THE CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS ON VASCULAR AGING IN PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE CONCOMITANT WITH SUBCLINICAL HYPOTHYROIDISM

Kolesnikova E., Potapenko A.

SI «National Institute of Therapy named after L.T. Mala of NAMS of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Despite the progress in medicine over the past decades, cardiovascular diseases (CVD) remain the most pressing issues of healthcare in many countries and represent a serious socioeconomic problem, being the leading cause of death throughout the world at 31% (in 2014) [12]. Mortality from CVD in Ukraine is 222 patients per 100 000 population. The prevalence of CVD is associated with traditional risk factors: smoking, nutrition, obesity, hypodynamia, increased blood pressure (BP), dyslipidemia, dysglycemia, as well as aging of vessels [6,18]. The main signs of vascular aging are the gain in the diameter of the aorta and in the intima-media complex thickness (IMT), and the increase of the rigidity of the vascular wall. Published results of the recent research indicate that additional risk factors such as endothelial dysfunction (ED), IMT, increased level of C-reactive protein (CRP), and risk factors combined with the Framingham Scale (sex, age, AH, dyslipidemia, smoking) are met among patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [15,19]. Patients with NAFLD have a high incidence of endocrinopathy. Dysfunction of the thyroid gland, in particular subclinical hypothyroidism (SH) presents special interest in recent years in this category of patients due to an increase in the frequency of its occurrence in the population - 73% in women and 30% in men [10,16]. The search for early predictors is continuing: the level of adipocytokines in the blood serum, the vascular endothelial factors, incl. vascular endothelial growth factor (VEGF-A), inflammation

markers (CRP), vascular aging markers (length of telomere). The most significant causes of cell aging are the shortening of telomeres and decrease of telomerase activity. Telomeres are the terminal regions of chromosomes that were proposed as markers of the biological aging process. The relative length of telomeres is reduced with each division of cells, and the rate of shortening of telomere length is associated with the effect of oxidative stress and inflammation [4,13]. The factors associated with the risk of CVD, that can impact the shortening of length of telomeres are being actively studied in recent years [13]. The connection between leucocyte telomeres shortening and the development and progression of atherosclerosis has been shown. It is well known that the process of increasing arterial stiffness (atherosclerosis) due to a decrease in the amount of elastin and an increase in the amount of collagen, as well as qualitative changes in the structure of the arterial wall, which is associated with a disruption of vasodilation due to endothelial properties is observed with normal vascular aging. When comparing telomeres of endothelial cells obtained from atherosclerotic plaques with those from sites without atherosclerotic changes of the same human body, it was found that the former were shorter [14].

The work has been carried out within the framework of the research «To develop comprehensive programs for the prevention of cardiovascular diseases in patients with non-infectious diseases» 0116U003039; «The effect

of cardiovascular development factors on premature aging» 0117U003031.

The authors have evaluated cardiometabolic changes depending on the age and length of telomeres in patients with NAFLD combined with SH.

**Material and methods.** 74 patients [29 men (39.2%) and 45 women (60.8%)], with manifested NAFLD and SH were enrolled in the research. Patients were divided into two clinical groups: group 1 (n = 31) - patients with NAFLD; their mean age was  $47.2 \pm 2.6$  years. Group 2 (n = 43) - patients with NAFLD concomitant with SH; the mean age was  $56, 8 \pm 6,5$  years. The examined patients did not abuse alcohol, did not show signs of viral or medical diseases of the liver. The research did not include patients suffering from diabetes mellitus type 1 or any other endocrine disorders, pregnant women, patients receiving therapy for a previously established diagnosis of manifested hypothyroidism, or those who had surgical treatment of the thyroid gland. The criterion for excluding patients from the study was also an intake of preparations of iodine, glucocorticoids, amiodarone, lithium preparations, estrogen-containing drugs.

The diagnosis of NAFLD was determined according to the current unified clinical protocol. The diagnosis of SH was made in accordance with the recommendations of the European Thyroid Association (2013) [8,11]. To rule out Hashimoto thyroiditis versus the diagnosis of SH, the concentration of thyroid-stimulating hormone (TSH), free thyroxine (T4 free) and ATPO antibodies (anti-thyroid peroxidase antibodies) in blood serum were studied using enzyme-linked immunoassay with the help of diagnostic reagents kit of LLC RPL “Granum” (Ukraine); ultrasound examination of the thyroid gland was conducted. The level of fasting insulin was determined by immunoenzyme method with the help of “DRG insulin ELISA” (USA). The condition and degree of damage to the vascular endothelium were assessed by calculating of the desquamated endothelial cells (CDECs) in the blood circulation by the Hladovec J. method in Rajec J. et al. modification (2007), using phase contrast microscopy. Vascular endothelial growth factor – VEGF – was determined by the immunoenzyme method using a set of reagents APL (Germany). The state of carbohydrate and lipid metabolism as well as indicators of the functional state of the liver were assessed using the generally accepted technique.

DNA from samples of buccal epithelium and whole blood was isolated using the DNA sorb-AM and DNA sorb-B reagents kit, respectively (Amplisens, Russian Federation). The isolated samples for amplification were stored at  $70^{\circ}$  C. The DNA concentration in the samples was measured by fluorometric analysis on a Qubit3.0 fluorometer (Life Technologies, USA) using a Qubit dsDNA HS Assay Kits (Life Technologies, USA).

The length of the telomeres was determined in a real-time PCR (Cawthon R.M., 2002, 2009). Amplifications were performed on a CFX96 Touch Amplifier (BioRad Laboratories, USA) using the iQ SYBR Green

Supermix reagents kit (BioRad Laboratories, USA). To amplify telomere sequences, Thermo Fisher Scientific primers were used:

- Tel1 ggTTTTgagggtgagggtgagggtgagggtgagggt
- Tel2 tcccgcataccctatccctatccctatccctatccctatcccta.

The 36B4 gene (Ribosomal phosphoprotein) was used as the reference single-copy gene.

Thermo Fisher Scientific Primers:

- 36B4u cagcaagtgggaaggtgtaatcc
- 36B4d cccattctatcatcaacgggtacaa.

PCR program for telomere sequence repeat-pre-sample denaturation of DNA  $95^{\circ}$ C for 5 min, then 35 cycles  $95^{\circ}$ C for 20sec,  $54^{\circ}$ C for 2 min; for referential pre-sample denaturation of DNA  $95^{\circ}$ C for 5 min; then 35 cycles  $95^{\circ}$ C for 20 sec.;  $58^{\circ}$ C for 1 min.

The relative length of telomeres was estimated from the ratio T/ S (T is the number of copies of telomere repeats, S is the number of copies of the 36B4 gene), with subsequent normalization of the obtained data to the reference sample that was input in each experiment.

The statistical processing of the data was carried out using the Statistica software package, version 8,0. The data resulting from the study are presented as the mean  $\pm$  standard deviation from the mean (M $\pm$ SD). To assess the differences between groups in a distribution close to normal, the Student’s test was used. Differences were considered statistically significant at  $p < 0,05$ .

**Results and their discussion.** Lipid storage disease was observed in both clinical groups (NAFLD, NAFLD + SH). Accurate changes were noted in the age group  $>50$  years. Thus, the level of total cholesterol (TC) was  $5.9 \pm 0.64$  mmol/l against  $7.0 \pm 0.2$  mmol/l,  $p < 0.05$ ; triglycerides (TG) -  $2.0 \pm 0.18$  mmol/l against  $2.5 \pm 0.20$  mmol/l,  $p < 0.05$ . The upward trend was noted in low-density lipoproteins (LDL cholesterol) -  $3,6 \pm 0,2$  mmol/l against  $3,95 \pm 0,5$  mmol/l,  $p < 0,05$  and reducing trend in high density lipoprotein (HDL cholesterol) -  $1,39 \pm 0,05$  mmol/l against  $1,26 \pm 0,07$  mmol/l,  $p < 0,05$  (Table 1).

According to the analysis results there is the formation of dyslipidemia in patients with NAFLD as the leading risk factor for CVD [4,5,7]. The proterogenic lipid profile in patients with NAFLD, which is characterized by a decrease in HDL cholesterol, increased TG and LDL cholesterol [8,9] supports the accumulation of fat in the liver and can act as an independent factor of dyslipidemia, causing a pathogenetic relationship: hepatic steatosis - dyslipidemia - atherosclerosis. On the other hand, thyroid hormones deficiency independently leads to significant violations of lipid and carbohydrate metabolism, which potentiates the patient’s existing atherogenic dyslipidemia and forming of endothelial dysfunction. The collective effect of triiodothyronine (T3) that regulates the activity of LDL receptors and the activity of their genes, protecting LDL from oxidation [1,2,5], thyroid hormones that stimulate the conversion of cholesterol to bile acids, and the effect of T3 which is responsible for the activity of cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase, - an essential enzyme in the

Table 1. Mean values of cardiometabolic parameters depending on age peculiarities in patients with NAFLD combined with SH

Values	NAFLD, n= 31		NAFLD combined with SH, n= 43	
	< 50 years	>50 years	< 50years	>50 years
<b>Values of lipid metabolism</b>				
TC (mmol/L)	5,6±0,5	5,9±0,64	5,84±0,2	7,0±0,2 <sup>2)</sup>
TG (mmol/L)	1,6±0,2	2,0±0,18	1,63±0,30	2,55±0,20 <sup>2)4)</sup>
VLDL cholesterol (mmol/L)	0,73±0,14	0,76±0,09	0,78±0,1	0,85±0,08
HDL cholesterol (mmol/L)	1,5±0,1	1,39±0,05 <sup>1)</sup>	1,31±0,1	1,26±0,07
LDL cholesterol (mmol/L)	3,4±0,5	3,6±0,2 <sup>1)</sup>	3,52±0,1	3,95±0,5
<b>Values of carbohydrate metabolism</b>				
HbA1 (%)	6,7±0,4	6,9±0,2	6,67±0,4	7,45±0,2 <sup>2)</sup>
Glucose (mmol/L)	6,43±0,78	6,25±0,4	6,5±1,26	6,8±0,4
Insulin (uIU/mL)	19,5±5,07	22,27 ±4,2 <sup>1)</sup>	20,9±5,5	25,04±0,2 <sup>2)4)</sup>
<b>Values of endothelial dysfunction</b>				
CDEC (c/100µl)	8,5±1,6	10,1±0,6 <sup>1)</sup>	12,1 ±1,6 <sup>3)</sup>	16,0±1,7 <sup>2)4)</sup>
VEGF-A pg/ml	233,8±53,1	428,24±74,28 <sup>1)</sup>	282,73±64,8 <sup>3)</sup>	610±112,27 <sup>2)4)</sup>
CRP mg/l	6,2±2,1	7,7±1,29 <sup>1)</sup>	6,7±2,06	8,8±0,96 <sup>2)4)</sup>
<b>Values of functional status of liver</b>				
AST (mmol/L)	28,9±3,7	31,8±5,5 <sup>1)</sup>	29,66±5,62 <sup>3)</sup>	38,6±3,1 <sup>2)4)</sup>
ALT (mmol/L)	35,1±9,2	43,4±6,7 <sup>1)</sup>	43,8±5,3 <sup>3)</sup>	54,7±4,7 <sup>2)4)</sup>
GGT (u/l)	68,8±9,1	70,6±5,5 <sup>1)</sup>	69,8±9,7 <sup>3)</sup>	80,5±20,1 <sup>2)4)</sup>

1) statistical significance of the parameters in the NAFLD group and among patients > and <50 years,  $p < 0.05$ ;

2) statistical significance of the parameters in the NAFLD group + SH group and among patients > and <50 years,  $p < 0.05$ ;

3) statistical significance of the parameters in the NAFLD group and NAFLD group + SH at the age <50 years,  $p < 0.05$ ;

4) statistical significance of the parameters in the NAFLD group and NAFLD + SH at the age of >50 years,  $p < 0.05$ .

The parameters of the functional status of the liver in patients with NAFLD, both with the presence of SH, and without it were changing significantly.

synthesis of bile acids, which in the conditions of hypothyroidism slows down the disintegration of cholesterol in the liver and contributes to an increase in its level in the blood, causing atherogenic dyslipidemia in patients with NAFLD combined with SH [6].

The presence of a correlation between HDL cholesterol (high-density lipoprotein cholesterol) and GGT ( $r = 0.69$   $p = 0.001$ ) became an evidence of early atherosclerotic vascular changes in patients with NAFLD combined with SH, that creates the prerequisites for considering GGT as an early marker of dyslipidemia formation in the studied patient category.

Judging by the obtained results (when investigating the parameters of carbohydrate metabolism) hyperglycemic shifts and signs of insulin resistance (IR) in patients with NAFLD in combination with SH compared with the group of NAFLD at the age of >50 years,  $p < 0.05$ , were more expressed. It can be assumed that this is due to the

slowing of metabolism with age, the past medical history of SH, excessive body weight, which lead to a decrease in sensitivity to insulin - the development of secondary insulin resistance (Table 1).

Moreover, the parameters of ALT and GGT were significantly higher in the age group over 50 years in patients with NAFLD combined with SG - ALT ( $54.7 \pm 4.7$  mmol/l versus  $43.8 \pm 5.3$  mMol/l); GGT ( $80.5 \pm 20.1$  U/l against  $69.8 \pm 9.7$  U/L),  $p < 0.05$ . The presence of a correlation between AST and HbA1c ( $r = 0.39$   $p = 0.006$ ); GGT and fasting glucose ( $r = 0.59$   $p = 0.001$ ); total, direct bilirubin and the level of thyroperoxidase antibodies, which was ( $r = 0.89$   $p = 0.04$  and  $r = 0.99$   $p = 0.001$ , respectively, has become the evidence of the influence of the functional state of the liver on the metabolic parameters of patients with NAFLD combined with SH.

Data resulting from the study are consistent with the data of the study, which included 4,648 patients, of

Table 2. Comparative characteristics of vascular aging values depending on the level of TSH in patients with NAFLD combined with SH

Indicators of endothelial dysfunction	NAFLD combined with SH		
	TSH <4 mU/l n=13	TSH 4-10 mU/l n=16	TSH >10 mU/l n=14
CDEC (c/100 µl)	9,78±0,6	12,1±0,96 <sup>1)</sup>	14,65±1,3 <sup>2)3)</sup>
VEGF-A pg/ml	357,7±62,1	381,13±55,8	636,13±145,9 <sup>2)3)</sup>
CRP Mg/L	6,63±0,97	6,74±1,35	9,55±1,1 <sup>2)3)</sup>

1) statistical significance between the parameters in the TSH group up to 4 mU/l and TSH 4-10 mU/l,  $p < 0.05$ ;

2) statistical significance between the parameters in the TSH group up to 4 mU/l and TSH > 10 mU/l,  $p < 0.05$ ;

3) statistical significance between the parameters in the TSH 4-10 mU/l and TSH > 10 mU/l,  $p < 0.05$

which 2324 with signs of hypothyroidism versus 2324 with euthyroidism [9]. It has been shown that the frequency of occurrence of NAFLD, verified by the ultrasound method, combined with an elevated ALT level was higher in the hypothyroidism group ( $p < 0.001$ ). Significant changes were noted in patients with combined course of NAFLD and SH, that is representative of the function of vascular endothelium at the cellular level according to the data of the CDEC in comparison with the patients of NAFLD -  $16.0 \pm 1.7$  cells/100 µl against  $12.1 \pm 1.6$  cells/100 µl,  $p < 0.01$  and vasoendothelial factor - VEGF-A -  $610 \pm 112.27$  pg/ml versus  $428.24 \pm 74.28$  pg/ml,  $p < 0.01$ . Comparison of vascular endothelial parameters in the group of patients with NAFLD and NAFLD combined with SH showed significant difference between the patients aged >50 years old and <50 years, with a significant prevalence of the values of CDEC and VEGF-A in the older age group,  $p < 0.01$  (Table 1). This is explained by the fact that with age the vascular tone changes and the stiffness of the vessels increases, which causes the further progression of atherosclerotic vascular lesion under ED conditions. When hypothyroidism is observed the disruption of EF forms independently. Furthermore, the study by J. Lekakis et al gave the demonstration that the ED is detected even within normal TSH values in patients with SH and it worsens as the TSH levels increase. The effect of TSH on the endothelium state in patients with subclinical hypothyroidism without cardiovascular pathology has been studied in research of S. Taddei et al [16,18]. Significant changes in ED markers in patients with NAFLD combined with SH can be considered as a risk factor for the development of atherosclerosis and its complications, which form the background for the development of cardiovascular complications. The evidence of this is the presence of positive correlation between VEGF-A and LDL cholesterol levels ( $r=0,78$   $p=0,04$ ), which indicates the predictive role of VEGF-A in the development and progression of early atherosclerotic changes in blood vessels. The analysis of vascular aging parameters in groups of patients with NAFLD in combination with SH depending on the level of TSH has shown a significant increase of CDEC in proportion to worsening of

the severity of hypothyroidism, which was  $9.78 \pm 0.6$  c/100 µl vs.  $12.1 \pm 0.96$  c/100 µl and  $14.65 \pm 1.3$  c/100 µl,  $p < 0.005$ ; while the level of VEGF-A significantly increased when comparing patients with TSH levels equal to and above 10 mU/l ( $381.13 \pm 55.8$  pg/ml vs.  $636,13 \pm 145.9$  pg/ml,  $p < 0.05$ ) (Table. 2). Similar changes were noted with the CRP index, confirming the presence of proinflammatory status in patients with NAFLD and SH ( $6.74 \pm 1.35$  mg/L versus  $9.55 \pm 1.1$  mg/L,  $p < 0.05$ ), under conditions of which endothelial dysfunction develops and increases with age. The participation of CRP has been demonstrated in the pathogenesis of both atherogenesis and atherothrombosis as a predictor of CVD. However, data on the level of CRP in patients with SH have a contradictory nature. The research [8,13] demonstrates an increased level of CRP and an increase in the risk of complications of CVS 3.4 times in patients with SH [17]. In contrast, number of studies have not revealed an increase of CRP levels in patients with SH in comparison with patients without thyroid pathology [3]. In addition, the results of our own observations indicate that SH in patients with NAFLD makes an independent contribution to the development of endothelial dysfunction, which predetermines the formation of cardiovascular complications.

Carrying out the analysis of variance allowed to reveal the significant influence of TSH level >4.0 mU/l in patients with NAFLD combined with SH on such values as HDL cholesterol ( $F=4.03$  ( $p=0.025$ ) and HbA1s ( $F=3.53$  ( $P=0.038$ ).

The study of the length of telomeres in blood and buccal epithelium in patients with NAFLD combined with SH, depending on the degree of compensation of the latter, has made a demonstration that the process of age-dependent telomere shortening in the cells of the buccal epithelium is accelerated ( $0.82 \pm 0.01$  versus  $0.89 \pm 0.02$  for TSH > 10 mU/l;  $1.16 \pm 0.01$  versus  $1.1 \pm 0.1$  for TSH 4-10 mU/l,  $p < 0.05$ ), Fig. There was a significant correlation between the telomeres' length in the blood and the buccal epithelium in patients with NAFLD and SH ( $r=0,62$   $p=0,002$ ), which confirmed the unity of telomeres erosion mechanisms in different tissues.

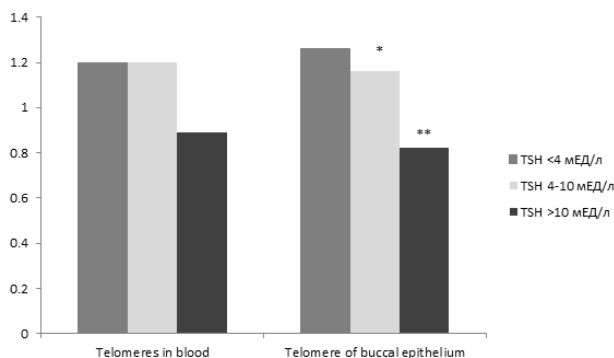


Fig. Changes in the level of telomeres and DNA in the buccal epithelium in patients with NAFLD and SH depending on the level of TSH

\* - significance of differences between telomeres in blood and buccal epithelium in the group with a TSH level of 4-10 mU / l,  $p < 0.05$

\*\* - significance of differences between telomeres in blood and buccal epithelium in the group with a TSH level  $< 10$  mU / l,  $p < 0.05$

The association between the accelerated shortening of telomeres and NAFLD as well as SH can be explained by a number of factors. On one hand, telomeres are shortened with aging and the shortening of their length in our study is observed clearly with the progression of hypothyroidism in patients older than 50 years. On the other hand, a number of studies demonstrate the linkage between inflammation and the length of telomeres, which is an integral part of the pathogenesis of both NAFLD and SH [20]. It should be also considered that oxidative stress leads to a shortening of telomere length in vitro, and telomeres have a high sensitivity to damage caused by oxidative stress, which is associated with a high content of guanine. Oxidative damages of DNA accumulate throughout life and lead to aging.

Age is one of the predictors of CVD. The aging process of the cardiovascular system has an impact on the development of CVD. The main signs of vascular aging are the diameter of the aorta, the thickness of the intima-media complex and the increase of stiffness of the vascular wall. Short telomeres have an adverse effect on the aging of CVS and on the early development of atherosclerosis. Biological aging, with years, contributes to the accumulation of endothelial damage through various mechanical, hemodynamic and immunological mechanisms.

Probably, the age-associated changes of blood vessels in patients with NAFLD combined with SH are not only the result of hormone-metabolic changes, but also the consequence of the pathogenetic cascade as part of the damage of telomeres DNA, and the shortening of telomeres to a greater extent in the buccal epithelium can be used as a marker of vascular aging in the early stages of its formation. The search for new ways of early diagnosis is able to individualize the approach to preventing early vascular aging and cardiovascular diseases in general.

**Conclusions.** 1. The formation of pro-atherogenic lipid profile is representative of patients with NAFLD combined with SH at the age older than 50.

2. Significant increase in ALT and GGT levels in patients with NAFLD combined with SH over the age of 50 indicates the involvement of the “fatty” liver in the formation of thyroid dysfunction.

3. Patients with NAFLD in combination with SH in comparison with patients without SH have significantly more pronounced endothelial dysfunction, manifested by an increase in the number of CDEC and VEGF-A, mainly over the age of 50, depending on the TSH levels.

4. The process of age-dependent shortening of telomere length predominantly in the buccal epithelium, which is observed at TSH more than 4 mU / l, is observed in patients with NAFLD in combination with SH.

5. The total effect of cardiometabolic risk factors in patients with NAFLD combined with SH probably is the determining factor of the rate of progression of vascular aging.

## REFERENCES

- Ageev F.T. Hypothyroidism and cardiovascular diseases / F.T. Ageev, ON Svirida, Z.N. Blankova // Russkii meditsinskii zhurnal [Russian Journal of Medicine] - 2014. №13.-p.980
- Asvold B.O. The association between TSH within the reference range and serum lipid concentration in population-based study. The HUNT Study/B.O. Asvold, L.J. Vatten, T.I. Nilsen // Eur.J. Endocrinol.-2007.- Vol.20.-P.932-936.
- Blankova Z.N, Ageev F.T, Seredenina E.M, Ryabtseva O.Yu., Svirida O.N, Irtuganov N.Sh. Hypothyroidism and cardiovascular diseases // Russkii meditsinskii zhurnal [Russian Journal of Medicine]. 2014. №13. p. 980
- Babak O.Ya. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: a modern view on the problem. Optimization of therapy / O. Ya. Babak, E.V Kolesnikova // Novosti meditsiny i farmatsii [ News of Medicine and Pharmacy] - 2012. - No.8 (410).- pp.12-14.
- Babak O.Ya., Kolesnikova E.V. Participation of liver in formation of metabolic syndrome and insulin resistance. Condition of the/ O.Ya. Babak, E.V. Kolesnikova // Suhasna gastroenterology [ Modern gastroenterology] .- 2006., № 4 (30).
- Bobrik M.I. The mutual influence of thyroid and carbohydrate metabolism.Paradigms and paradoxes/M.I.Bobrik //International Journal of Endocrinology-2015.-№3-pp.127-32.
- Chen X., Xun K., Chen L., Wang Y. TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator // Cell Biochem. Funct.— 2009.— Vol. 7 (7).— P. 407—416. 6.
- Chung GE, Kim D, Kim W, Yim JY, Park MJ, Kim YJ, Yoon JH, Lee HS. Non-alcoholic fatty liver disease across the spectrum of hypothyroidism. J Hepatol 2012; 57: 150-156 [PMID: 22425701 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.027]
- Drapkina O.M Non-alcoholic fatty liver disease as a

component of metabolic syndrome. Drapkina, D.S. Gatsolaeva, V.T. Ivashkin // Rus. meditsinskie vesti [Rus. Medical News]-2010.- №2.- pp. 72-78.

10. 2013 ETA Guideline: Management of Subclinical Hypothyroidism/ H.S. Simon Pearce, G.Brabant, L. H. Duntas [ et al.] // Eur. Thyroid.J.-2013.- №2.- P. 215-228.

11. Kolesnikova E.V. Modern patient with liver disease and pathology of the cardiovascular system: what is the choice? / E.V. Kolesnikova // Suhasna gastroenterology [Modern gastroenterology] .- 2014.-№ 2 (76).

12. Koryakina L.B, Pivovarov Yu.I., Kurilskaya T.E., etc. Dysfunction of the vascular endothelium in arterial hypertension and coronary heart disease / Koryakina L.B, Pivovarov Yu.I., Kurilskaya T.E // Bulletin of the All-Union Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2013.-No. 2.- pp. 165-170.

13. Kolesnikova. E.V., Fadeenko. G.D., Popovych A.S.. Role of telomere length in the development of cardiovascular diseases// J.NAMS Ukraine.— 2015.V.21,№ 1.—P.28-34.

14. Lomonaco R. et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease // Hepatology. — 2012. — Vol. 55. — P. 1389 — 1397.

15. Lampka M. Circulating endothelial cells in coronary artery disease/ M.Lampka, Z.Grobczewska, E.Jendryczka-Mackiewicz// Kardiologia Polska.-2010.- Vol.68 (10).-P.1100-1105.

16. Podzolkov A.V. , Fadeyev V.V.. Hypothyroidism, Subclinical Hypothyroidism, High-normal TSH-level// Clinical and Experimental thyroidology.-2009.- Vol. 5 (2).- P. 10-11.

17. Targher G. et al. Risk of all-cause and cardiovascular mortality in patients with chronic liver disease // Gut. — 2011. — Vol. 60. — P. 1602 — 1603.

18. Vyalov S. S Non-alcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome: fatty liver and atherosclerosis // Consilium Medicum. Cardiol. - 2012. - No. 5. - Vol. 14. - pp. 41 - 45.

19. van Veldhuisen D. J., Huzen J., van Gilst W. H., van der Harst P. Telomeres and biological ageing in cardiovascular disease // Ned. Tijdschr. Geneesk. — 2008. — 152, № 22. — P. 1265-1270.

## SUMMARY

### EFFECT THE CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS ON VASCULAR AGING IN PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE CONCOMITANT WITH SUBCLINICAL HYPOTHYROIDISM

**Kolesnikova E., Potapenko A.**

*SI «National Institute of Therapy named after L.T. Mala of NAMS of Ukraine», Kharkov, Ukraine*

The article presents the analysis of the relationship between thyroid function abnormality -subclinical

hypothyroidism (SH) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), depending on age peculiarities (>50 years and <50 years), and the risk of cardiovascular complications in this category of patients. Research of early predictors of cardiovascular complications: dyslipidemia, insulin resistance, inflammatory marker- C-reactive protein, marker of vascular aging-telomerase activity and marker of endothelial dysfunction (ED) - CDECs and VEGF-A that have been analyzed are on the front burner. In this regard, the effect of the given values on the formation of cardiac risk in patients with NAFLD combined with SH was studied. 74 patients (29 men (39.2%) and 45 women (60.8%)), with verified NAFLD and SH have been examined. Patients were divided into two clinical groups: group 1 (n=31) - patients with NAFLD, with the mean age 47.2±2.6 years; group 2 (n=43) patients with NAFLD in combination with SH, with the mean age 56,8±6,5 years. Results of the performed tests have shown that patients with NAFLD combined with SH aged over 50 years have pro-atherogenic lipid profile and significantly more pronounced manifestations of endothelial dysfunction. The process of age-dependent shortening of telomere length predominantly in the buccal epithelium is an important point to be made. Consequently, the total effect of cardiometabolic risk factors in patients with NAFLD combined with SH probably is the determining factor of the rate of progression of vascular aging.

**Keywords:** Non-alcoholic fatty liver disease, subclinical hypothyroidism, vasculoendothelial factor, cardiometabolic risk, length of telomere, vascular aging.

## РЕЗЮМЕ

### ВЛИЯНИЕ КАРДИОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА НА СОСУДИСТОЕ СТАРЕНИЕ У ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ В СОЧЕТАНИИ С СУБКЛИНИЧЕСКИМ ГИПОТИРЕОЗОМ

**Колесникова Е.В., Потапенко А.В.**

*ГУ «Национальный институт терапии им. Л.Т. Малой НАМН Украины», Харьков Украина*

В статье представлены данные о связи между субклиническим гипотиреозом (СТ) и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) в зависимости от возраста (>50 лет и <50 лет), а также о риске возникновения кардиоваскулярных осложнений у больных данной категории. Актуальным является изучение ранних предикторов сердечно-сосудистых осложнений: дислипидемия, инсулинорезистентность, маркер воспаления- С-РБ, маркер сосудистого старения- активность теломеразы и маркер эндотелиальной дисфункции – циркулирующие десквамированные клетки эндотелия и васкулоэндотелиальный фактор. В связи с этим изучено влияние указанных показателей на формирование кар-

დიოვასკულარული რისკის მქონე პაციენტების (НАЖБП) სტრატეგიაში. გამოვლინდა 74 პაციენტი - 29 (39,2%) მამაკაცი და 45 (60,8%) ქალი სტრატეგიაში. პაციენტები იყო დაჯგუფებული: I ჯგუფი (n=31) - პაციენტები სტრატეგიაში, საშუალო ასაკი - 47,2±2,6 წელი, II ჯგუფი (n=43) - პაციენტები სტრატეგიაში, საშუალო ასაკი - 56,8±6,5 წელი.

შედეგები გამოვლინდა, რომ პაციენტები სტრატეგიაში, საშუალო ასაკი 50 წელს აღემატება, აქტიური ცხოვრების წესი, სტრატეგიაში, საშუალო ასაკი 50 წელს აღემატება, აქტიური ცხოვრების წესი, სტრატეგიაში, საშუალო ასაკი 50 წელს აღემატება, აქტიური ცხოვრების წესი.

### შედეგები

კარდიომეტაბოლური რისკის ფაქტორების გავლენა ღვიძლის არაალკოჰოლური ცხიმოვანი დაავადებით და თანხვედრითი ჰიპოთეროზით პაციენტების სისხლძარღვოვანი დაზარალებაზე

### ე. კოლესნიკოვა, ა. პოტაპენკო

სახელმწიფო დაწესებულება "უკრაინის ეროვნული სამედიცინო აკადემიის ლ. მალოის სახ. თერაპიის ეროვნული უნივერსიტეტი", ხარკოვი, უკრაინა

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ღვიძლის არაალკოჰოლური ცხიმოვანი დაავადებით და

თანხვედრითი ჰიპოთეროზით პაციენტების სისხლძარღვოვანი დაზარალებაზე კარდიომეტაბოლური რისკის ფაქტორების გავლენის შესწავლა.

შესწავლილია გულ-სისხლძარღვოვანი გარემოებების პრედიქტორების (დისლიპიდემია, ინსულინრეზისტენტობა, ანთების მარკერი C-რეაქტიული ცილა, სისხლძარღვოვანი დაზარალების მარკერები - ტელომერების აქტივობა და ენდოთელური დისფუნქციის მარკერი, ენდოთელიუმის ცირკულირებადი დისკვაზური უჯრედები, ვასკულოენდოთელური ფაქტორი) გავლენა კარდიომეტაბოლური რისკის ჩამოყალიბებაზე. დაკვირვება მიმდინარეობდა 74 პაციენტზე: 29 (39,2%) მამაკაცზე და 45 (60,8%) ქალზე ღვიძლის არაალკოჰოლური ცხიმოვანი დაავადებით (ლაკდ) და სუბკლინიკური ჰიპოთეროზით. პაციენტები გაყოფილი იყო 2 ჯგუფად: I ჯგუფი - 31 პაციენტი ღვიძლით, საშუალო ასაკი - 47,2±2,6 წელი, II ჯგუფი - 43 პაციენტი ღვიძლით და სუბკლინიკური ჰიპოთეროზით, ასაკი - 56,8±6,5 წელი.

ჩატარებული კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ პაციენტებს ღვიძლით, სუბკლინიკური ჰიპოთეროზის თანხლებით აღენიშნებათ პროატეროგენული ლიპიდური პროფილი, სარწმუნოდ უფრო გამოხატული ენდოთელური დისფუნქცია და ბუკალურ ეპითელიუმში ასაკდამოკიდებული ტელომერის სიგრძის შემცირების პროცესი.

ამგვარად, სავარაუდოა, რომ კარდიომეტაბოლური რისკის ფაქტორების ერთობლივი გავლენა ღვიძლით და სუბკლინიკური ჰიპოთეროზით პაციენტებზე იწვევს სისხლძარღვოვანი დაზარალების ტემპების პროგრესირებას.

## ANALYSIS OF TISSUE OXYGENATION IN CHRONIC LEG ULCERS BY COMBINATION OF A MULTI-SPECTRAL CAMERA AND A HYPER-SPECTRAL PROBE

<sup>1</sup>Zimmermann P., <sup>2</sup>Scheibe A., <sup>3</sup>Marotz J., <sup>1</sup>Wollina U.

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology, Academic Teaching Hospital Dresden-Friedrichstadt, Dresden, Germany; <sup>2</sup>Department Jena - Photonics and Sensorics, Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e. V., Jena, Germany; <sup>3</sup>Diaspective Vision GmbH, Strandstraße Am, Germany

An objective evaluation of leg ulcers by use of non-invasive techniques is of importance for diagnosis, monitoring treatment response and probably leads to improved treatment strategies. Furthermore, such technologies can contribute to standardization and validation of new treatment options [20].

Digital (RGB-)photography, thermography, transcutaneous oxygen and laser doppler imaging have

been used in various clinical settings [1,21]. Photography allows for better assessment of wound size and by the employing of software with interactive image processing, different major components of the wound surface may be determined more precisely than by naked eye [18].

In recent years, newer technologies such as multiphoton tomography [16], photoacoustic imaging [13], optical coherence tomography [10], reflectance confocal

microscopy [19] or fluorescence imaging have been applied to evaluate the healing process of chronic or acute wounds in a more objective way [11].

Here we present the results of a pilot study using a combination of a multi spectral camera and a hyper spectral probe for objective evaluation of chronic leg ulcers as a model method.

**Material and methods.** All patients involved were hospitalized; all were Caucasians although this was not an inclusion criterion. Sixty patients – 40 females and 20 males - were enrolled in the study. The age range was 46 to 85 years for males (mean 65.8 years, median 73.0 years) and 51 to 91 years for females (mean 74.4 years, median 77.0 years). The skin phototype according to Fitzpatrick was I and II in 77% of cases, 23% had skin type III.

Demographic data and significant comorbidities were recorded. Medical history of leg ulcers, size, localization and etiology were registered. The ulcers were characterized by the Wollina-Wound Score (WWS) [10] and a digital photo of the wound(s) was taken.

Non-invasive measurements were performed during morning hours to avoid interference with possible treatments and edema formation during daily activities.

Measurements were performed by hyper spectral wound (HySkinII) probe and multi spectral (DeMuk) camera (Fig. 1). Both devices were calibrated using a 1 cm thick polytetrafluoroethylene tile every time before the start of measurement (Fig. 2). Measurements of clinically healthy (non-wounded) skin and of the wounds were taken in sitting position of a patient with leg in a horizontal position.



Fig. 1. Measuring station with multi-spectral camera (left) and hyperspectral probe HySkinII (right)

The hyperspectral wound probe HySkinII is a skin imaging probe for an objective assessment of chronic wounds with regard to the healing process. It is based on the principle of spectral imaging, which represents a combination of classical spectroscopy and digital image processing, whereby a spectrum is recorded for each pixel simultaneously. Component analysis or other classification methods can be applied to the spectral data; for instance,

a score is computed to describe the state of a wound numerically (Fig. 3).

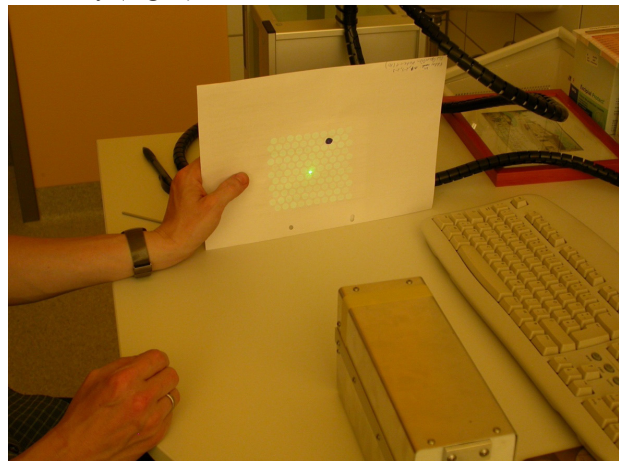


Fig. 2. Calibration of HySkinII

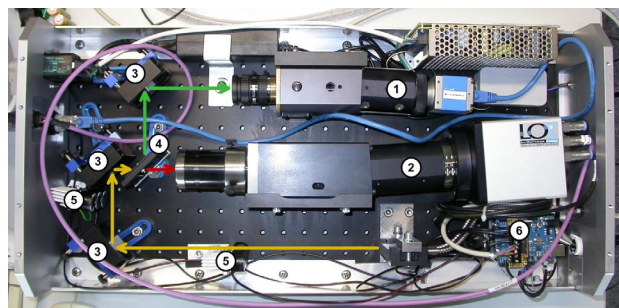


Fig. 3. Beam path of HySkinII: 1: visual imaging spectrograph; 2: NIR imaging spectrograph; 3: mirrors; 4: wavelength selective mirror; 5: green high power LEDs; 6: arduino micro computer

The probe consists of an imaging spectrograph that spectrally disperses light from the sample and projects it on a camera chip. By the use of a lens a 10 x 10 cm area was depicted on a nearly square bundle of 10 x 11 optical fibres in the measuring head. The 110 optical fibres serve as a cross-section converter transforming areas into lines. These lines are divided by a wavelength selective mirror to a visible light and a near-infra red (NIR) channel. For both channels, an imaging spectrograph depicts the lines on a black and white camera and dissolves them hereby spectrally. The measuring distance is 30 cm from the wound surface. Illumination is realized by a flash light integrated into the measuring head. Crossed polarization filters were used to suppress the reflection from the surface and to ensure detection of relevant signals from deeper tissue layers.

The determination of the wound condition was performed by measuring and comparing the wound spectra with a library of spectral signatures. To generate this library, measurements had been carried out on patients with chronic wounds. For the purpose of calibration an experienced physician determined the Wollina-Wound Score (WWS) of these ulcers [14]. Automatic determina-



tion of the healing index from the spectral data captured with the skin probe is achieved through the analysis of the hyperspectral remission signals. The determination of the similarity of these signals to those in the library of known wound spectra is carried out by means of spectral angular mapping. With these results not only overall statements about the healing prospects of the wound can be made, but also detailed parts of the wound can be evaluated [5].

Multi-spectral camera DeMuk was used in a distance of 30 cm from the skin or ulcer, ensured by a pilot laser. The camera has two different LED ring lights, that illuminate the area at different time points. The inner ring consists of white LEDs, the outer ring is built of NIR-LEDs. The white LEDs are used for four photo shots in the visible spectral range while the NIR-LEDs are used for a single photo shot in the NIR-range (830-900 nm). All LEDs are used in single impulse mode creating a lightning effect due to the high intensity. White LEDs illuminate in a broad band from 400 nm to almost 800 nm, while NIR-LEDs show a narrow emittance at 845 nm. The remission was analyzed in 5 narrow-band sections, i.e. 540 nm, 560 nm, 630 nm, 760 nm, and 830 – 900 nm.

For evaluation of oxygen saturation the method of Stratonnikov et al. was adopted [17].

**Results and their discussion.** We investigated patients with chronic leg ulcers with a mean duration of 34.6 months (median 12 months). The most common etiology of the ulcers was chronic venous insufficiency (55.9%) followed by mixed arterial-venous and arterial leg ulcers, each in 8.5% of cases. The remaining patients suffered from ulcers of other etiologies. The depth of leg ulcers was: skin only in 50% and adipose tissue or musculature - in 50%.

The WWS rates between 0 and 9, with 9 – complete granulation and healing ulcer and 0 – the worst ulcer (Schmidt et al. 2001). The mean WWS in the present study was 3.96 (median 4.00). For details see Fig. 4.

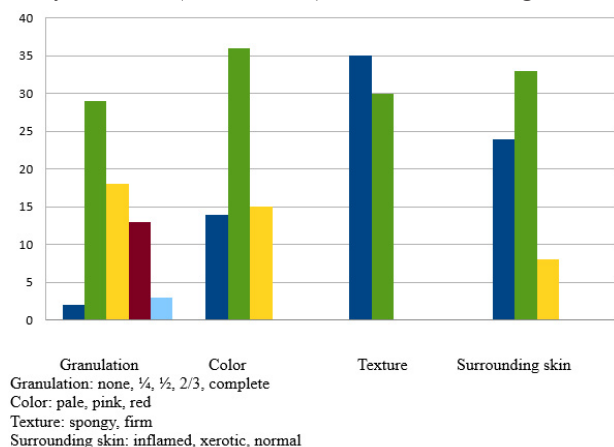


Fig. 4. Relative frequency of the WWS categories

The multi spectral camera (DeMuk) takes 10 x 11 shots of every object – 5 with different spectral ranges, 5 from surrounding light and a single black shot (Fig. 5).

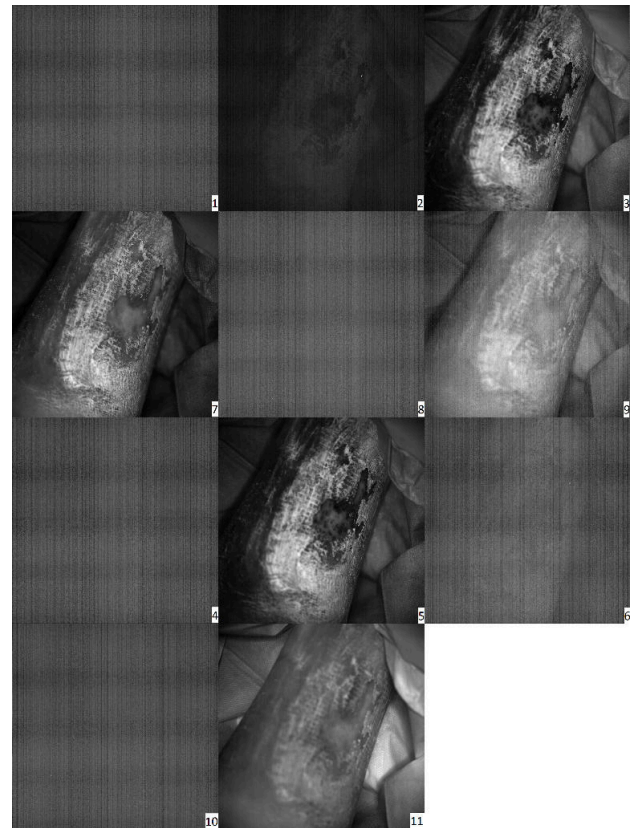


Fig. 5. DeMuk sequence of pictures taken from a chronic venous leg ulcer: (1) Dark current noise of the camera, (2) 540 nm without camera illumination, (3) 540 nm, (4) 560 nm without camera illumination, (5) 560 nm, (6) 630 nm without camera illumination, (7) 630 nm, (8) 760 nm without camera illumination, (9) 760 nm, (10) 830-900 nm without camera illumination, and (11) 830 – 900 nm

Remission spectra obtained in this study are dominated by hemoglobin absorption. The oxygen supply by hemoglobin is the most critical parameter during wound healing. Oxy-hemoglobin has an absorption double-peak at 548 nm and 575 nm. Hemoglobin *per se* has an absorption double-peak at 428 nm and 564 nm.

Despite the limited spatial resolution, the hyper spectral camera allows to analyze oxy-hemoglobin content and distribution over the whole area of 10 cm x 10 cm. Using depth of tissue penetration for different emitted wavelengths, an approximate calculation of oxygen saturation in superficial and deeper tissue compartments is possible (Fig. 6-9).

The oxygen saturation ( $sO_2$ ) varies in leg ulcers depending to the underlying pathology, but even within a single wound,  $sO_2$  is inhomogeneously distributed. For deeper tissue layers, we observed a range between 22% and 75% within the wounds and 19% to 73% in the neighboring skin. Very low values of  $sO_2$  suggest poor prognosis with possible ulcer enlargement. The mean  $sO_2$  of leg ulcers was 58.1%, with a median of 59.0 % and a standard deviation (SD) of 11.7%. For the surrounding skin mean  $sO_2$  was 46.1 %, with a median of 50.0 % and an SD of 12.5%.

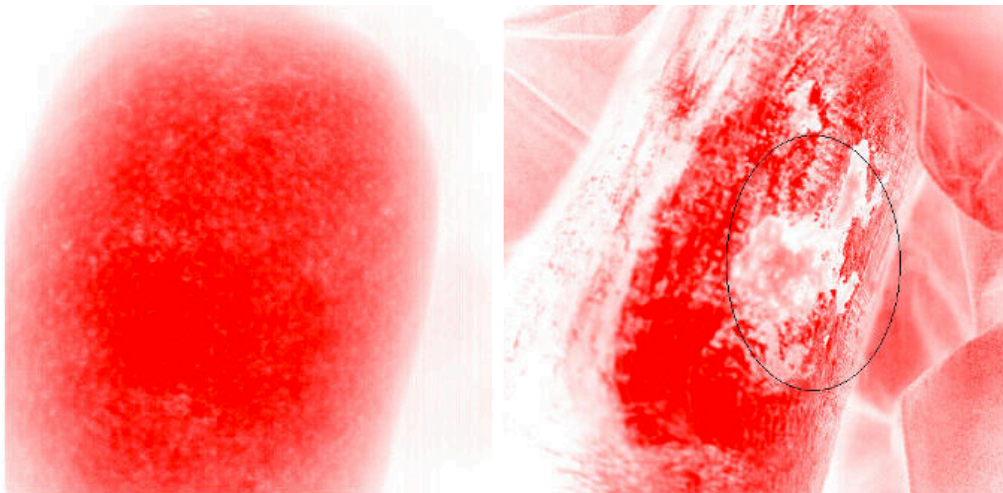


Fig. 6. Pseudocolor images at 540 nm. Left - intact surrounding skin, right - chronic venous leg ulcer (here, the wound area is circled). The white area in the circle demonstrates a low absorption, i.e. a low perfusion and oxygenation of the wound

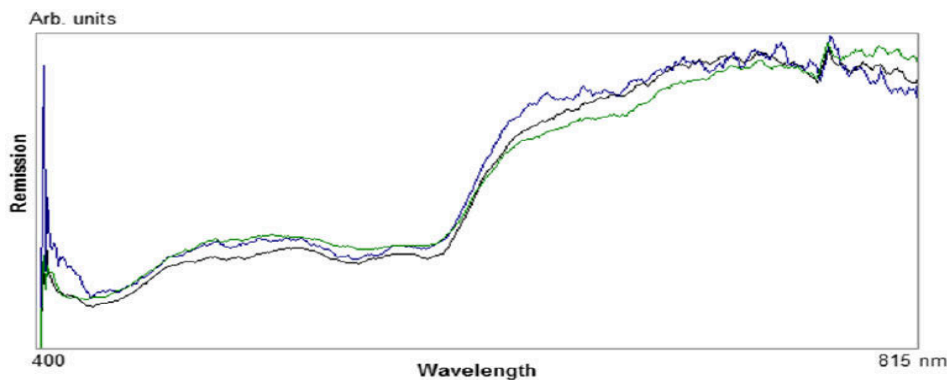


Fig. 7. Remission spectra of a chronic venous leg ulcer: Black line – wound area; blue line and green line – two different surrounding areas of intact skin (proximal and distal from the wound). The remission in the spectral range of oxy-hemoglobin is marked lower within the wound

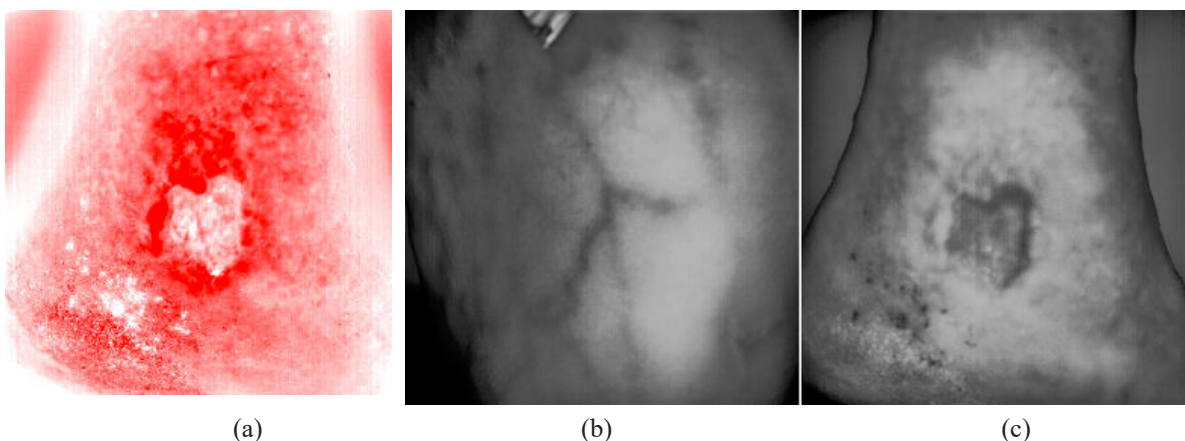


Fig. 8: Pseudocolor image of a leg ulcer: (a) at 540 nm, (b) and (c) at 830-900 nm. (b) intact surrounding skin and (c) wound area. The white pseudocolor of the wound area in (a) demonstrates a diminished perfusion and oxygenation within the wound. The deeper penetrating wavelength of 830-900 nm demonstrates veins in (b) but not in (c), arguing for a decreased circulation and oxygenation in (c)

Considering those patients (n=13), with a higher  $sO_2$  within their ulcers compared to surrounding skin, their mean WWS was 4 (median 4, SD 1.9). The relative  $sO_2$  in these ulcers was in the range of 107% to 194%. On the other hand, those patients with a lower  $sO_2$  within their ulcers

compared to the neighboring skin (n=10; range of  $sO_2$  84% to 98%), achieved a mean WWS of 3.1 (median 3, SD 0.5).

In conclusion, relatively higher  $sO_2$  in leg ulcers is associated with a higher WWS (a better healing).

We present arithmetically averaged spectra of leg

ulcers and neighboring intact skin with a spectral range between 450 to 950 nm (Fig 7). The major chromophore of the range 500 to 600 nm is hemoglobin. Necrotic tissue, melanin and biofilms interfere in the range < 500 nm.

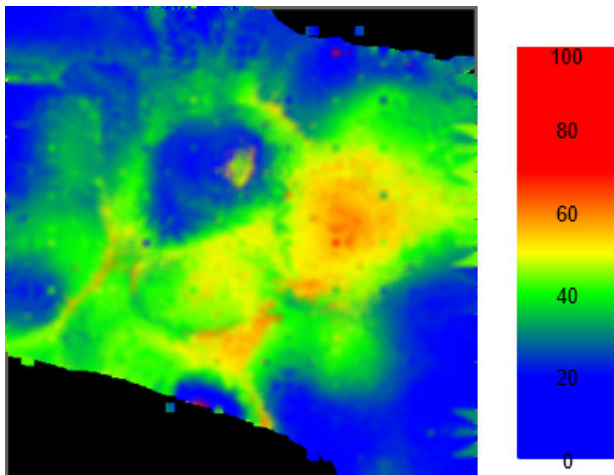


Fig. 9. Tissue oxygenation (%) within a chronic leg ulcer as shown by pseudocolors

The classification of wounds into healing states depending on their absorption spectrum of visible and near infrared light remains an important task in dermatology. Moreover, a reduction of the spectrum, used in the classification task to fewer but important wavelengths is desirable, as each measured wavelength increases the examination costs without necessarily providing further information on the classification of a wound healing state [15].

Multi- and hyper-spectral skin imaging is a promising technique for various clinical applications where the local distribution of oxygenation is of major importance [9]. This technology offers the opportunity of extracting spatial spectral information of each pixel from a tissue image. The background idea of the method is to acquire a set of images in multiple adjacent narrow spectral bands, and to reconstruct the reflectance spectrum for every pixel of the image [2]. In order to estimate microvascular blood oxygen saturation of skin various modifications of multi-spectral imaging have been developed [3,6-8]. The newer developments overcome the necessity for longer measurement times (minutes) and reduce the possibility of movement artefacts. The evaluation of a broad spectrum instead of a few spectral channels provides additional information and improves the accuracy of parameter determination. Longer wavelengths provide information on deeper underlying structures of wounds, however, the absorption and resulting spectra are less pronounced. Wavelengths above 650 nm offer to evaluate  $sO_2$  of deeper vascular layers of skin, whereas spectra between 500 nm and 600 nm reflect  $sO_2$  of the upper capillary vascular layer.

Further developments will focus on efforts to overcome some hints of present techniques, i.e. the improvement of the receptive grid to increase the resolution of resulting images, and statistical classification methods [2,4,12,15].

## REFERENCES

1. Burke-Smith A, Collier J, Jones I. A comparison of non-invasive imaging modalities: Infrared thermography, spectrophotometric intracutaneous analysis and laser Doppler imaging for the assessment of adult burns. *Burns*. 2015;41(8):1695-707.
2. Calin MA, Coman T, Parasca SV, Bercaru N, Savastru R, Manea D. Hyperspectral imaging-based wound analysis using mixture-tuned matched filtering classification method. *J Biomed Opt*. 2015;20(4):046004.
3. Chin MS, Freniere BB, Lancerotto L, Lujan-Hernandez J, Saleeby JH, Lo YC, Orgill DP, Lalikos JF, Fitzgerald TJ. Hyperspectral Imaging as an early biomarker for radiation exposure and microcirculatory damage. *Front Oncol*. 2015;5:232.
4. Denstedt M, Pukstad BS, Paluchowski LA, Hernandez-Palacios JE, Randeberg LL. Hyperspectral imaging as a diagnostic tool for chronic skin ulcers. In: Kollias N, Choi B, Zeng H, Wook Kang H, Knudsen BE, Wong BJ, Ilgner JF, Suter MJ, Lam S, Brenner M, Gregory KW, Tearney GJ, Marcu L, Hirschberg H, Madsen SJ, Mahadevan-Jansen A, Jansen ED, Mandelis A, Morris MD (eds) *Photonic Therapeutics and Diagnostics IX*. Proc. SPIE 2013; 8565.
5. Erfurth F, Nyuyki B, Scheibe A, Schmidt W. Spectral imaging for chronic wounds therapy evaluation. *SENSOR+TEST Conferences 2011*. Proceedings SENSOR 2011:638-43.
6. Feng W, Shi R, Zhang C, Yu T, Zhu D. Lookup-table-based inverse model for mapping oxygen concentration of cutaneous microvessels using hyperspectral imaging. *Opt Express*. 2017;25(4):3481-3495.
7. Holmer A, Tetschke F, Marotz J, Malberg H, Markgraf W, Thiele C, Kulcke A. Oxygenation and perfusion monitoring with a hyperspectral camera system for chemical based tissue analysis of skin and organs. *Physiol Meas*. 2016;37(11):2064-2078.;
8. Jafari-Saraf L, Wilson SE, Gordon IL. Hyperspectral image measurements of skin hemoglobin compared with transcutaneous  $PO_2$  measurements. *Ann Vasc Surg*. 2012;26(4):537-48.
9. Klaessens JHGM, Noordmans HJ, de Roode R, Verdaasdonk RM. Non-invasive skin oxygenation imaging using a multi-spectral camera system: effectiveness of various concentration algorithms applied on human skin. *Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue VIII*, edited by Tromberg BJ, Yodh AG, Tamura M, Sevick-Muraca EM, Alfano RR. Proc. of SPIE 2009.
10. Kuck M, Strese H, Alawi SA, Meinke MC, Fluhr JW, Burbach GJ, Krahl M, Sterry W, Lademann J. Evaluation of optical coherence tomography as a non-invasive diagnostic tool in cutaneous wound healing. *Skin Res Technol*. 2014;20(1):1-7.
11. Lee O, Kim J, Park G, Kim M, Son S, Ha S, Oh C. Non-invasive assessment of cutaneous wound healing using fluorescent imaging. *Skin Res Technol*. 2015;21(1):108-13.

12. Marotz J, Siafiakakis A, Holmer A, Kulcke A, Siemers F. First results of a new hyperspectral camera system for chemical based wound analysis. *Wound Medicine* 2015;10-11:17-22.
13. Petri M, Stoffels I, Jose J, Leyh J, Schulz A, Dissemond J, Schadendorf D, Klode J. Photoacoustic imaging of real-time oxygen changes in chronic leg ulcers after topical application of a haemoglobin spray: a pilot study. *J Wound Care*. 2016;25(2):87, 89-91.
14. Schmidt WD, Liebold K, Fassler D, Wollina U. Contact-free spectroscopy of leg ulcers: principle, technique, and calculation of spectroscopic wound scores. *J Invest Dermatol*. 2001;116(4):531-5.
15. Schmidt J, Hapfelmeier A, Schmidt WD, Wollina U. Improving wound score classification with limited remission spectra. *Int Wound J*. 2012;9(2):189-98.
16. Springer S, Zieger M, Böttcher A, Lademann J, Kaatz M. Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo. *Skin Res Technol*. 2017.
17. Strattonnikov AA, Loschenov VB, Evaluation of blood oxygen saturation in vivo from diffuse reflectance spectra. *J Biomed Optics* 2001;6:457-467.
18. Sundeep K, Eswara RB. Digital analysis of changes in chronic wounds through image processing. *Int J Signal Process Image Process Pattern Recongn*. 2013;6:367-80.
19. Terhorst D, Maltusch A, Stockfleth E, Lange-Asschenfeldt S, Sterry W, Ulrich M, Lange-Asschenfeldt B. Reflectance confocal microscopy for the evaluation of acute epidermal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2011;19(6):671-9.
20. Ud-Din S, Bayat A. Non-invasive objective devices for monitoring the inflammatory, proliferative and remodelling phases of cutaneous wound healing and skin scarring. *Exp Dermatol*. 2016;25(8):579-85.
21. Yip WL. Evaluation of the clinimetrics of transcutaneous oxygen measurement and its application in wound care. *Int Wound J*. 2015;12(6):625-9.

## SUMMARY

### ANALYSIS OF TISSUE OXYGENATION IN CHRONIC LEG ULCERS BY COMBINATION OF A MULTI-SPECTRAL CAMERA AND A HYPER-SPECTRAL PROBE

<sup>1</sup>Zimmermann P., <sup>2</sup>Scheibe A., <sup>3</sup>Marotz J., <sup>1</sup>Wollina U.

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology, Academic Teaching Hospital Dresden-Friedrichstadt, Dresden, Germany; <sup>2</sup>Department Jena - Photonics and Sensorics, Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien e. V., Jena, Germany; <sup>3</sup>Diaspective Vision GmbH, Strandstraße Am, Germany

Objective evaluation of chronic wounds, such as leg ulcers, by the use of non-invasive techniques is of

importance for diagnosis, monitoring treatment response, and probably leads to improved treatment strategies.

We performed a feasibility study for the combined use of a multi-spectral camera and a hyper-spectral probe to evaluate chronic leg ulcers with a focus on tissue oxygenation.

Sixty patients – 40 females and 20 males were enrolled in the study. The age range was 46 to 85 years for males (mean 65.8 years, median 73.0 years) and 51 to 91 years for females (mean 74.4 years, median 77.0 years).

Measurements were performed by hyper-spectral wound (HySkinII) probe and multi-spectral (DeMuk) camera on wounds and surrounding skin.

The investigation results demonstrate a high variability of oxygenation within ulcers and the surrounding tissue. The methods allow an investigator to independently assess of tissue oxygenation in superficial and deeper layers.

Non-invasive multi- and hyper-spectral imaging techniques offer new opportunities of an objective assessment of chronic wounds.

**Keywords:** chronic wounds, leg ulcers, non-invasive measurements, tissue oxygenation, multi-spectral camera, hyperspectral probe.

## РЕЗЮМЕ

### АНАЛИЗ ОКСИГЕНАЦИИ ТКАНЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЯЗВАХ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПУТЕМ СОЧЕТАНИЯ МНОГОСПЕКТРАЛЬНОЙ КАМЕРЫ И ГИПЕРСПЕКТРАЛЬНОГО ЗОНДА

<sup>1</sup>Циммерманн П., <sup>2</sup>Шайбе А., <sup>3</sup>Маротц Дж.,  
<sup>1</sup>Воллина У.

<sup>1</sup>Академический учебный госпиталь Дрезден-Фридрих-штадт, департамент дерматологии и алергологии, Дрезден, Германия; <sup>2</sup>Общество по развитию медицинских, био- и экологических технологий, департамент Йена - Фотоника и сенсорная техника, Йена, Германия; <sup>3</sup>Diaspective Vision GmbH, Зальцхаффе, Германия

Объективная оценка хронических ран, таких как язвы ног, с использованием неинвазивных методов, имеет важное значение для диагностики, мониторинга результатов лечения и позволяет усовершенствовать стратегию лечения.

Авторами приведено технико-экономическое обоснование использования многоспектральной камеры в сочетании с гиперспектральным зондом при оценке хронических язв нижних конечностей с акцентом на оксигенацию тканей.

В исследование включено 60 пациентов - 40 женщин и 20 мужчин. Возраст мужчин составлял 46-85 лет (средний возраст 65,8 лет), женщин - 51-91 год

(средний возраст 74,4 года). Измерения в области раневых поражений и прилежащей коже проводились с помощью гиперспектрального зонда (HySkinII) и многоспектральной камеры (DeMuk).

Результаты исследования демонстрируют высокую вариабельность оксигенации в области язв и окружающих тканей. Данные методы позволяют

исследователям самостоятельно оценивать оксигенацию в поверхностных и более глубоких слоях тканей.

Неинвазивные методы с использованием многоспектральных и гиперспектральных изображений предлагают новые возможности объективной оценки хронических раневых поражений.

### რეზიუმე

ქსოვილების ოქსიგენაციის ანალიზი მრავალსპექტრული კამერის და ჰიპერსპექტრული ზონდის შეუღლებით ქვედა კიდურების ქრონიკული წყლულების დროს

<sup>1</sup>პ. ციმერმანი, <sup>2</sup>ა. შაიბე, <sup>3</sup>ჯ. მაროტცი, <sup>1</sup>უ. ვოლინა

<sup>1</sup>დრეზდენ-ფრიდრიხ-შტადტის აკადემიური სასწავლო პოსპიტალი, დერმატოლოგიისა და ალერგოლოგიის დეპარტამენტი, დრეზდენი, გერმანია; <sup>2</sup>სამედიცინო, ბიო- და ეკოლოგიური ტექნოლოგიების განვითარების საზოგადოება, ფოტონიკის და სენსორული ტექნიკის დეპარტამენტი, იენა, გერმანია; <sup>3</sup>Diaspective Vision GmbH, ზალცხაფე, გერმანია

ქრონიკული ჭრილობების, მათ შორის ქვედა კიდურების წყლულების, ობიექტური შეფასება, არაინვაზიური მეთოდების გამოყენებით დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის შედეგების მონიტორინგისათვის მეტად მნიშვნელოვანია, ვინაიდან, იძლევა მკურნალობის სტარტეჯის სრულყოფის შესაძლებლობას.

ავტორების მიერ წარმოდგენილია მრავალსპექტრული კამერის და ჰიპერსპექტრული ზონდის შერწყმული გამოყენების ტექნიკურ-ეკონომიკური დასაბუთება ქვედა კიდურების ქრონიკული წყლულების დროს, ქსოვილების ოქსიგენაციაზე აქცენტით. გამოკვლეულია 60 პაციენტი (40 - ქალი, 20 - მამაკაცი). მამაკაცების ასაკი შეადგენდა 46-85 წელს (საშუალო ასაკი - 65,8 წელი), ქა-

ლების - 51-91 წელი (საშუალო ასაკი - 74,4 წელი). გაზომვები ჭრილობის მიდამოში და მიმდებარე კანზე ტარდებოდა ჰიპერსპექტრული ზონდით (HySkinII) და მრავალსპექტრული კამერით (DeMuk).

კვლევის შედეგებით გამოვლინდა ოქსიგენაციის მაღალი ლაბილობა წყლულების არეში და ახლოს მდებარე ქსოვილებში. აღნიშნული მეთოდები მკვლევარებს აძლევს ქსოვილების ზედაპირულ და უფრო ღრმა ფენებში ოქსიგენაციის დამოუკიდებლად განსაზღვრის საშუალებას. არაინვაზიური მეთოდები მრავალსპექტრული და ჰიპერსპექტრული გამოსახულებების გამოყენებით იძლევა ქრონიკული ჭრილობების ობიექტური შეფასების ახალ შესაძლებლობებს.

## ПСИХОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ИНТЕРВЕНЦИИ ВО ВРЕМЯ ПЕРВОГО ЭПИЗОДА ПСИХОЗА У БОЛЬНЫХ С АУТОАГРЕССИВНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ

Мудренко И.Г., Потапов А.А., Сотников Д.Д., Коленко О.И., Кмыта А.П.

Сумский государственный университет, медицинский институт, Украина

Рост уровня самоубийств и суицидального поведения (СП), происходящих в мире диктуют необходимость проведения углубленного изучения этой проблемы в различных странах, разработки национальных программ по превенции. Вопросы изучения предикторов и разработка эффективных методов терапии и профилактики аутоагрессивного поведения (АП) по сей день являются основным направлением суицидологических исследований [1,2,4,5,11-15]. Установлено,

что к психопатологическим предикторам суицидального поведения у больных с первым эпизодом психоза (ППЭ) относятся синдром Кандинского-Клерамбо, депрессивная симптоматика, обсессивно-компульсивные симптомы, концептуальная дезорганизация, психомоторное возбуждение, нарушения в эмоционально-волевой сфере, вегетативная дисфункция, суицидальные попытки в прошлом. К психологическим детерминантам аутоагрессивного поведения относятся

такие особенности пациентов, как снижение заботы о своем здоровье за счет формирования суицидальных намерений; тревожно-мнительные черты характера со склонностью к самобичеванию, с раздражительностью, нервозностью, неуверенностью в себе; недостаточная сдержанность, импульсивность, максимализм, властность, низкий самоконтроль, эмоциональная холодность, избирательность контактов, склонность к социальной изоляции и интроспекции [1,2,5]. Помощь пациентам должна оказываться в рамках комплексной неотложной суицидологической помощи (КНСП), включающей в себя неотложную фармако- и психотерапию. К прицельным методам психотерапевтической коррекции СП относится кризисная психотерапия [3,8,9,10,14]. Задачи кризисной психотерапии схематично представлены в виде индивидуальной программы, включающей этапы кризисной поддержки, кризисного вмешательства, повышения уровня адаптации. В данной работе эта модель взята за основу, как наиболее эффективная для коррекции суицидоопасных состояний у больных с первым психотическим эпизодом. На основании выявленных нами предикторов определены патопсихологические «мишени» для фармако- и психотерапии. Так, психотерапия у лиц с суицидальным поведением с ППЭ должна быть направлена на коррекцию психопатических черт характера (повышение социальной адаптации, структурирование и принятие социальных норм); формирование удовлетворенности состоянием здоровья, отношениями с окружающими и реализацию в духовной сфере; коррекцию нарушений в межличностном взаимодействии с окружающими (формирование доверия к окружающим, расширение межличностных контактов, повышение активности пациентов в социальном взаимодействии); снижение фиксированности на соматическом состоянии;

восстановление контроля над импульсивностью, повышение решительности, организованности и сосредоточенности при достижении определенных целей; формирование активной позиции пациентов.

Цель исследования – на основании выделенных психопатологических предикторов разработать прицельные методы немедикаментозной профилактики аутоагрессивного поведения у пациентов с первым психотическим эпизодом и оценить их эффективность.

**Материал и методы.** Для достижения поставленной цели нами использовался клинический метод, включающий традиционную клинико-психопатологическую оценку состояния пациентов и психодиагностический: модифицированная методика оценки выраженности аутоагрессивных предикторов (пресуицидального синдрома).

Полученные результаты обработаны с помощью метода математической статистики «Excel» на персональном компьютере с использованием вариационного ряда с подсчетом средней арифметической величины, стандартной ошибки среднего арифметического. Достоверность различия оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t).

Обследовано 100 пациентов, поступивших в Сумский областной клинической психоневрологической диспансер клиник первого психотического эпизода. Из них 58 пациентов имели СП (мысли, намерения, попытки), остальные 42 (без аутоагрессивного поведения) составили группу контроля.

**Результаты и их обсуждение.** С помощью теста выраженности аутоагрессивных предикторов (пресуицидальный синдром) удалось выявить основные психопатологические составляющие, участвующие в формировании АП у пациентов с ППЭ.

Данные теста самооценки выраженности АП (пресуицидального синдрома) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики выраженности аутоагрессивных предикторов у больных с ППЭ (M±m, в баллах)

Аутоагрессивные предикторы	Группы	
	больные с АП, n=58	больные без АП, n =42
Аутоагрессия	14,60±1,67**••••	5,66±1,07*••••
Агрессия	11,40±0,88**•	6,54±0,70*•
Импульсивность	7,86±0,63*•	4,00±0,55*•
Аффективные нарушения	22,05±1,48**••	11,04±1,47*•
Сужение и расстройство когнитивных функций	18,30±0,93**•	11,54±1,43*•
Сужение и расстройство межличностных контактов	13,08±0,80**•	8,20±0,74*•
Вегетативные расстройства	17,48±1,16**•••	11,54±1,43*•••
Ложь	10,30±0,81	8,20±0,81

примечание: 1. (\*) – легкая степень выраженности признака. 2. (\*\*\*) – умеренная степень.

3. (\*\*\*) – высокая степень 4. (\*\*\*\*) – тяжелая степень 5. • - достоверность различий между значениями в основной и контрольной группе на уровне (p≤0,01).

6. •• - достоверность различий между значениями в основной и контрольной группах на уровне (p≤0,001).

7. ••• - достоверность различий между значениями в основной и контрольной группах на уровне (p≤0,005).

8. •••• - достоверность различий между значениями в основной и контрольной группах на уровне (p≤0,0005)

Анализ результатов методики самооценки выраженности аутоагрессивных предикторов позволил определить общие для пациентов с ППЭ особенности (таблица 1). Так, для всех испытуемых было характерно наличие нарушений в когнитивной и аффективной сферах ( $18,30 \pm 0,95$  балла в основной и  $11,54 \pm 1,43$  балла в контрольной группах;  $22,05 \pm 1,48$  и  $11,04 \pm 1,47$  балла соответственно), а также сужение и нарушение межличностных контактов ( $13,08 \pm 0,80$  и  $8,20 \pm 0,74$  соответственно). Низкие показатели по шкале лжи свидетельствуют об искренности пациентов в описании своих переживаний.

У пациентов с АП по всем показателям отмечалась умеренная степень выраженности пресуицидального синдрома, тогда как для больных без АП характерна низкая степень выраженности аутоагрессивных предикторов. Так, для пациентов с АП были характерны такие особенности как сужение когнитивных функций ( $p \leq 0,001$ ), избегание межличностных контактов ( $p \leq 0,001$ ), наличие аффективных ( $p \leq 0,001$ ) и вегетативных ( $p \leq 0,01$ ) нарушений, умеренная выраженность аутоагрессии ( $p \leq 0,001$ ) и импульсивности ( $p \leq 0,001$ ).

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи АП с различными психопатологическими нарушениями. Суицидальные попытки у больных с ППЭ реализуются на высоте аффективных колебаний, импульсивно, на фоне нарушенного восприятия окружающей действительности, нарушения коммуникативных способностей. Состояние сопровождается выраженными вегетативными симптомами: головной болью, головокружением, тремором конечностей, повышенной потливостью, аффектом страха и тревоги.

На основании выявленных нами предикторов определены патопсихологические «мишени» для фармако- и психотерапии.

Таким образом, основной целью КНСП явилось снижение выраженности аффективных и когнитивных нарушений, вегетативных дисфункций, позитивной симптоматики, а также восстановление межличностных взаимоотношений с окружающими, снижение агрессии и импульсивности как ведущих психопатологических предикторов формирования и рецидивирования АП [2].

Всего психотерапевтическое лечение получили 58 пациентов основной группы с суицидальными проявлениями (32 больных женского и 26 мужского пола). Поддерживающая психотерапия проводилась параллельно с фармакотерапией атипичными нейролептиками и антидепрессантами класса СИОЗС, которые являются препаратами выбора для купирования и профилактики состояний, обуславливающих АП.

Большинство пациентов ( $79,30\%$ ) были молодого возраста (20-39 лет). Средний возраст больных составил  $27,18 \pm 1,04$  года. Среди получавших психотерапевтическое лечение преобладали лица с параноидной

формой шизофрении - 16 ( $27,6\%$ ) пациентов, с острым полиморфным психотическим расстройством - 22 ( $37,9\%$ ) больных, манифестом простой формы шизофрении - 13 ( $22,4\%$ ) больных. Основная часть пациентов ( $65,50\%$ ) не состояла в браке,  $19,00\%$  пациентов были разведенными и лишь  $12,10\%$  - имели супруга(у). Большинство пациентов с АП имели среднее образование -  $68,90\%$ . При этом  $36,20\%$  пациентов не имели работы. Конфликты семейного и интимно-личного плана выявлены у  $67,13\%$  пациентов. У остальных, поводом для суицидоопасных кризисных состояний были: потеря работы ( $56,15\%$ ) и связанная с этим неудовлетворенность материально-бытовыми условиями ( $45,82\%$ ), психо-эмоциональное перенапряжение ( $38,97\%$ ), а также утрата близких ( $11,02\%$ ), состояние здоровья ( $9,78\%$ ) и конфликты на работе ( $14,66\%$ ).

Для коррекции и профилактики СП мы использовали индивидуальные формы психотерапии с дифференцированной направленностью психотерапевтического процесса. С помощью психотерапии решались следующие вопросы: создание адекватной личностной установки больного на болезнь и терапию; повышение толерантности больных к эмоционально-стрессовым ситуациям; социальная активация: формирование доверия к окружающим, расширение межличностных контактов; повышение социальной адаптации и активности пациентов в социальном взаимодействии [3,6-8,13].

Решение поставленных задач мы начали с индивидуальных психотерапевтических бесед для создания адекватных личностных установок на болезнь и проводимую терапию.

При этом в первую очередь решались задачи, связанные с фармакотерапией: обучение больных и членов их семей к распознаванию ранних признаков обострения; выработка осознания необходимости длительного приема лекарств; повышение контроля со стороны пациентов за эффективностью лечения; при полном отказе от приема лекарств сохранять психотерапевтический контакт для более раннего вмешательства в случае рецидива.

Терапия осуществлялась в индивидуальной форме и включала этапы: кризисную поддержку, кризисное вмешательство и повышение уровня адаптации у больных с ППЭ.

На этапе кризисной поддержки необходимо было установление терапевтического контакта, раскрытие суицидоопасных переживаний больного и мобилизация адаптивных вариантов копинг-поведения и личностной защиты пациента.

На этапе кризисного вмешательства основными целями служили когнитивный анализ неопробованных способов решения кризисной проблемы, выявление неадаптивных когнитивных мыслей, блокирующих оптимальные способы разрешения кризисной ситуации и коррекция неадаптивных когнитивных механизмов [3,8,10,14-16].

На этапе повышения уровня адаптации проводились поведенческий тренинг неопробованных способов разрешения проблемной ситуации, тренинги, направленные на повышение толерантности больных к эмоционально-стрессовым факторам и улучшение ресоциализации пациентов с ППЭ, осуществлялась семейная психотерапия с родственниками пациента.

Так, на этапе *кризисной поддержки* при установлении терапевтического контакта применялся прием выслушивания. На этом этапе работы исключались конфронтация и другие активные элементы психотерапии. Психотерапевтические задачи установления контакта и раскрытия суицидоопасных переживаний считались реализованными, когда, несмотря на усилия психотерапевта и применение им техники классической вербализации и избирательной вербализации (обобщающие высказывания психотерапевта касаются только травмирующей ситуации, другие же темы игнорируются), пациент самостоятельно перестает говорить на травмирующую его тему и самостоятельно выбирает другую тему для обсуждения. Задача установления терапевтического контакта и прием выслушивания требовали в некоторых случаях 4-5 сеансов. Далее реализовалась терапевтическая задача актуализации адаптивных вариантов копинг-поведения и личностной защиты пациента. Реализуя эту задачу, психотерапевт обращал внимание пациента к прошлым достижениям и будущим перспективам. Проявления личностной несостоятельности пациента не интерпретировались и не анализировались. Задачи кризисной поддержки считались выполненными, когда купировались аффективные переживания, что значительно снижало актуальность суицидоопасных тенденций и позволяло перейти к когнитивной перестройке, осуществляемой на втором этапе кризисной терапии - этапе кризисного вмешательства.

*Кризисное вмешательство* проводилось с целью реконструкции нарушений в микросоциальной сфере пациента и когнитивной перестройки его представлений о причинах и путях выхода из кризиса. Как известно, формирование АП претерпевает три этапа: когнитивный (суицидальные мысли), потом присоединяется аффективный компонент, что придает негативную эмоциональную окраску суицидальным переживаниям, и далее - реализация суицидальных намерений через внешнеповеденческие акты. Одним из видов психотерапии воздействующей на все три компонента, является когнитивная терапия А. Бека. Путем воздействия на когнитивный компонент она опосредованно регулирует эмоциональные реакции и воздействует на поведение. Основными задачами когнитивной терапии являются выявление и коррекция неадаптивных мыслей на продуктивные. С помощью поведенческих техник проводится моделирование приемлемого поведения в кризисной ситуации. У пациентов с АП (основная группа, n=58) когнитивная перестройка и формиро-

вание новых вариантов преодолевающего поведения происходили в течение 15-20 сеансов длительностью 30-40 минут. На этапе кризисной поддержки мы проводили выявление «автоматических» отрицательных мыслей, обуславливающих суицидальное поведение, часто не осознаваемое больным. Пациентам предлагали записывать ситуации, которые вызывают дискомфорт, в одну колонку, эмоции, которые возникают при этом, в другую, соответственно мысли - в третью. Также выявление неадаптивных мыслей происходило путем наводящих вопросов в ходе сократического диалога. Таким образом, пациенты начинали осознавать негативные мысли. Выявление и коррекция неадаптивных когнитивных мыслей, приводящих к развитию суицидальных переживаний и способствующих рецидивам суицидоопасного риска, осуществлялись, прежде всего, в отношении суицидогенной установки - представления о большей, чем собственная жизнь, значимости той или иной ценности. Далее, методом абстрагирования, сравнения с другими, декатастрофизации у пациентов с ППЭ с АП вырабатывались отдаление от негативной мысли и формирование новых механизмов преодолевающего поведения в кризисной ситуации. На этапе кризисного вмешательства рассмотрение неопробованных способов решения проблемы, как правило, включало поиск лиц из ближайшего окружения, с которыми пациент мог бы сформировать новые, необходимые ему значимые отношения, облегчающие ему микросоциальную адаптацию.

На этапе *повышения уровня адаптации* применялись различные варианты поведенческой психотерапии, проводился индивидуальный поведенческий тренинг, который реализовывался через систему домашних заданий пациенту [4,7,13-15].

Для решения социальных и коммуникативных проблем использовались когнитивно-поведенческие методы: стимуляция, совет, разъяснение и уточнение, конфронтация, объективация и интерпретация, а также тренинг не опробованных пациентом способов разрешения актуального межличностного конфликта, повышающих уровень социально-психологической адаптации [3,6,9,13-16].

Технические приемы когнитивно-поведенческой психотерапии основывались на научении пациента новым формам поведения с дальнейшим положительным подкреплением. Например, пациентка с неадаптивной мыслью «я ничего не могу, я никчемная» в палате выполняла какую-то работу, о чем вела записи. На сеансе у врача получила похвалу и изменение режима наблюдения со свободным выходом. Таким образом, у пациентки происходит осознание своей социальной значимости и возможности самостоятельно себя обслуживать. Применялась также методика конфронтации и постепенной десенситизации, когда пациента погружали в среду, которая вызывает неприятные переживания. Например, больной с бредом отношения и осуждения, чтобы удостовериться



Таблица 2. Динамика показателей выраженности суицидального риска и аутоагрессивных предикторов до и после проведения психотерапевтического лечения

Исследуемые параметры		Пациенты с первым эпизодом шизофрении (n=58)	
		до курса психотерапии	после курса психотерапии
Суицидальный риск		30,31 ± 4,61 *	25,74 ± 1,06*
Аутоагрессивные предикторы	Аутоагрессия	14,60 ± 1,68 *	9,68 ± 0,67 *
	Агрессия	11,4 ± 0,89 *	6,45 ± 0,41 *
	Импульсивность	7,86 ± 0,67 *	4,24 ± 0,30 *
	Сужение когнитивных функций	18,30 ± 0,95	15,31 ± 0,49
	Сужение межличностных контактов	13,08 ± 0,81 *	9,22 ± 0,40 *
	Аффективные нарушения	22,05 ± 1,51 *	18,58 ± 0,66 *
	Вегетативные нарушения	17,48 ± 1,18	16,32 ± 0,59

примечание: \* -  $p \leq 0,05$

в доброжелательности и искренности медперсонала, спрашивал у каждого из них об отношении к нему. Получив позитивные ответы, осознал нелепость своих подозрений. Методика декатастрофизации заключалась в продувании самого страшного исхода сложившейся ситуации с объяснением минимальной вероятности такого исхода. Изменить АП можно путем поощрения у пациентов гетероагрессивных вариантов поведения в кризисной ситуации.

Наиболее сложным оказалось осуществление задачи на повышение толерантности больных к эмоционально-стрессовым факторам. Для решения этой задачи использовалась рациональную психотерапию, которая была построена в форме диалога по принципу обратной связи. С пациентами обговаривались различные ситуации, в которых наиболее резко выявлялась их эмоциональная нестабильность. Мы попробовали раскрыть ее причины и дать адекватные образцы поведенческой тактики. Кроме перестройки отношения больных к психотравмирующим ситуациям, проводился также детальный анализ отношений, сложившихся в семье и на работе.

Используя психотерапевтический процесс, направленный на ресоциализацию больных, ведущее место отводилось семейной психотерапии, максимально глубоко изучая внутрисемейные отношения.

Процесс психотерапии с семьей строился, как работа с родственниками больных и был направлен на:

- 1) разъяснение связи между поведением родственников и состоянием больного;
- 2) снижение уровня выражения эмоций, особенно критического характера;
- 3) развитие контроля за своими эмоциями и выработку новых, более адекватных форм поведения;
- 4) выработку правильного отношения к проводимой лекарственной терапии.

Эффективность выбранной тактики индивидуальной психотерапии обсуждали с учетом данных психодиагностического обследования (методика

определения суицидального риска и опросник выраженности аутоагрессивных предикторов) до и после проведенного курса психотерапии (таблица 2).

Как свидетельствуют результаты показателей таблицы 2, до лечения у больных с ППЭ риск СП был высок и составлял в среднем 30,31 балла. После проведенного курса психотерапии отмечалась положительная динамика: риск суицида снизился на 15,10% и составил 25,74 балла, что соответствовало умеренной выраженности СП.

Анализ результатов методики самооценки выраженности аутоагрессивных предикторов показал, что у больных с ППЭ были выражены нарушения в когнитивной и аффективной сферах, а также сужение и нарушение межличностных контактов. До лечения отмечалась умеренная степень выраженности пресуицидального синдрома по всем показателям: сужение когнитивных функций (18,30±0,95), избегание межличностных контактов (13,08±0,81), выраженность аффективных (22,05±1,51) и вегетативных (17,48±1,18) нарушений, умеренная выраженность аутоагрессии (14,60±1,68), агрессии (11,40±0,89) и импульсивности (7,86±0,67).

После проведенного курса психотерапии отмечалась положительная динамика: снизилась степень выраженности аутоагрессивных предикторов. Значительно снизились показатели нарушений в аффективной сфере (18,58±0,66). Так, у пациентов с ППЭ снизились показатели как аутоагрессии (9,68±0,67), так и гетероагрессии (6,45± 0,41). При этом снизился также показатель импульсивности (4,23±0,30), что проявилось в повышении толерантности к эмоционально-стрессовым факторам, контроле над своими переживаниями и снижении их аффективной окраски ( $p \leq 0,001$ ). Отмечалось расширение межличностного взаимодействия с окружающими, налаживание отношений с родственниками (9,22±0,40) и положительная динамика в соматическом состоянии пациентов и их когнитивной сфере, однако данные изменения не были достоверно значимы.

**Выводы.** Основными задачами вторичной психопрофилактики у лиц с высоким риском суицида во время первого психотического эпизода являются: купирование депрессивной симптоматики; купирование синдрома Кандинского – Клерамбо (чувства владычества, открытости и внушения мыслей, бреда физического и гипнотического воздействия); купирование синдрома дереализации; коррекция когнитивных нарушений (повышение концептуальной организации процесса мышления, повышение критичности); купирование параноидной симптоматики (бредовые идеи самоосуждения и самоуничужения, редукция идей преследования, отношения, снижение враждебности); купирование обсессивно-компульсивных симптомов; купирование психомоторного возбуждения и внутреннего беспокойства; коррекция нарушений в эмоционально-волевой сфере (повышение уровня эмоциональной устойчивости пациентов, коррекция негативных расстройств); коррекция вегетативных нарушений; коррекция психопатических черт характера (повышение социальной адаптации, структурирование и принятие социальных норм); формирование удовлетворенности состоянием здоровья, отношениями с окружающими и наличие реализации в духовной сфере; коррекцию нарушений в межличностном взаимодействии с окружающими (формирование доверия к окружающим, расширение межличностных контактов, повышение активности пациентов в социальном взаимодействии); снижение фиксированности на соматическом состоянии; восстановление контроля над импульсивностью, повышение решительности, организованности и сосредоточенности при достижении определенных целей; формирование активной позиции пациентов. Для лечения больных с аутоагрессивным поведением и профилактики суицидов целесообразно использовать комплексную неотложную суицидологическую помощь, состоящую из неотложной фармако- и психотерапии.

Для больных с высоким суицидальным риском рекомендовано использовать кризисную психотерапию, состоящую из этапов кризисной поддержки, кризисного вмешательства и повышения уровня адаптации. Наиболее эффективными для профилактики аутоагрессивного поведения у лиц с первым психотическим эпизодом являются когнитивная терапия Бека и техники, моделирующие поведение по Дж. Якобсону. Психотерапевтическое лечение способствовало повышению толерантности к эмоционально-стрессовым нагрузкам, контролю над своими переживаниями, улучшению социальной активности больных, а также преодолению ситуаций, которые раньше вызывали эмоциональный дискомфорт.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А.А. Психотерапия. Изд.: СПб. Питер.: 2004; 310.
2. Бачериков А.М., Мудренко И.Г. Аутоагрессивное поведение у больных с первым психотическим эпизодом (диагностика, клиника, лечение). Украинский вестник психоневрологии 2007; vol. 15, no 3 (52), pp. 30-33.
3. Боева А.В. Клинические и социально-психологические характеристики суицидентов и методы краткосрочной кризисной психотерапии. Москва: 2004; 211.
4. Любов Е.Б., Паршин А.Н. Клинико-экологические исследования суицидального поведения. Суицидология 2016; 1(22): 42-50.
5. Марута Н.А., Юрьева Л.М., Кутиков А.Е., Гура Е.И. Первичный психотический эпизод (диагностика, фармакотерапия и психологическая реабилитация). Методические рекомендации. Харьков: 2009; 68.
6. Положий Б.С., Панченко Е. Дифференцированная профилактика суицидального поведения. Суицидология 2012; 1: 8-13.
7. Сергеева Е.А., Васильев В.В., Пакрев С.Г, Ковалев Ю.В. Современные исследования суицидального поведения психически больных. Суицидология 2015; Том 6, no 4 (21): 32-39.
8. Харитонов С.В., Куприн В.Е., Паршин А.Н. Программа включения родственников в превенцию суицидов у и больных с личностными расстройствами. Медицинская психология в России (электронный журнал) 2013; no 2(19). Available at: <http://medpsy.ru> (accessed 18 June 2017).
9. Холмогорова А.В. Протокол когнитивно-поведенческой терапии пациентов, переживающих суицидальный кризис. Журнал современная терапия в психиатрии и неврологии 2014; no 1: 26-29.
10. Юрьева Л.М., Шевченко Ю.М. Доказательная медицина в современной тактике профилактики суицидов // Таврический журнал психиатрии 2011; Том. 15, № 2 (52): 54.
11. Khasakhala L., Sorsdahl K.R., Harder V.S., Williams D.R., Stein D.J., Ndeti D.M. (2011) Lifetime mental disorders and suicidal behavior in South Africa. Afr. J. Psychiatry (Johannesbg), vol. 14, no 2, pp. 134–139.
12. Lasyi E., Rynkov P. (2016) Suicide risk factors in hospital. Psychiatry psychoterapy and clinical psychology 2016; vol.7, no1: 105-111.
13. Soloff P.H., Lynch K.G., Kelly T.M., Malone K.M., Mann J.J. Characteristics of suicide attempts of patients with major depressive episode and borderline personality disorder: a comparative study. Am. J. Psychiatry 2000; vol. 157, no 4: 601–608.
14. Wasserman D., Rihmer Z., Rujescu D. The European Psychiatric Association (EPA) guidance on suicide treat-

ment and prevention. Eur. Psychiatry 2012; vol. 27, no 2: 129-141.  
15. World Health Organization. Preventing suicide: a global

imperative. Geneva: 2014; 97.  
16. Jacobsen G. Programs and techniques of crises intervention. American handbook of psychiatry, New York: 1974.

## SUMMARY

### PSYCHOTHERAPEUTIC INTERVENTIONS IN PATIENTS WITH AUTO-AGGRESSIVE BEHAVIOR DURING THE FIRST PSYCHOTIC EPISODE

Mudrenko I., Potapov A., Sotnikov D., Kolenko O., Kmyta A.

*Sumy State University, Medical Institute, Ukraine*

In this article the formation of psychopathological predictors auto-aggressive behavior in patients with a first psychotic episode were identified, which became "targets" in the framework of a comprehensive emergency suicide assistance to conduct the crisis psychotherapy. The work was done on the basis of the Sumy regional psychoneurologic dispensary, where 100 patients with a first psychotic episode were examined: 52 of them (core group) had suicidal symptoms and 48 (control group) had not. According to the test results of severity of auto-aggressive predictors (pre-suicidal syndrome) to clinicopsychopathological predictors of auto-aggressive behavior include: the narrowing of the cognitive function ( $p \leq 0,001$ ), the avoidance of interpersonal contact ( $r \leq 0,001$ ), the presence of affective ( $p \leq 0,001$ ) and vegetative ( $p \leq 0,01$ ) violations, the autoaggression of moderate severity ( $p \leq 0,001$ ) and

impulsivity ( $p \leq 0,001$ ). Patients of the core group with the auto-aggressive behavior ( $n=58$ ) completed a course of a crisis psychotherapy comprising the stages of crisis support, crisis intervention and increase the adaptation layer. After a psychotherapy course levels of aggression ( $6,45 \pm 0,41$ ), auto-aggression (of  $9,68 \pm 0,67$ ), disorders in the affective sphere ( $18,58 \pm 0,66$ ) and impulsivity (of  $4,23 \pm 0,30$ ) decreased, which was manifested in increasing tolerance to emotional stress factors, control over their emotions and reduce their affective valence ( $p \leq 0,001$ ). The expansion of interpersonal interaction, the increase of patients social activity, the blood relationships establishment (of  $9,23 \pm 0,40$ ) was observed.

**Keywords:** first psychotic episode; auto-aggressive behavior predictors; comprehensive emergency suicide assistance; crisis psychotherapy; Beck's cognitive therapy.

## РЕЗЮМЕ

### ПСИХОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ИНТЕРВЕНЦИИ ВО ВРЕМЯ ПЕРВОГО ЭПИЗОДА ПСИХОЗА У БОЛЬНЫХ С АУТОАГРЕССИВНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ

Мудренко И.Г., Потапов А.А., Сотников Д.Д., Коленко О.И., Кмыта А.П.

*Сумский государственный университет, медицинский институт, Сумы, Украина*

В данной статье описаны выявленные психопатологические предикторы формирования аутоагрессивного поведения у больных с первым психотическим эпизодом, которые стали «мишенями» для проведения кризисной психотерапии в рамках комплексной неотложной суицидологической помощи. Работа выполнена на базе Сумского областного психоневрологического диспансера, где обследовано 100 больных с первым психотическим эпизодом: из них 58 (основная группа) имели суицидальные проявления, 42 (группа контроля) не имели. По результатам теста выраженности аутоагрессивных предикторов (пресуицидального синдрома) к клинко-психопатологическим предикторам аутоагрессивного поведения относятся: сужение когнитивных функций ( $p \leq 0,001$ ), избегание межличностных контактов ( $p \leq 0,001$ ), наличие аффективных ( $p \leq 0,001$ )

и вегетативных ( $p \leq 0,01$ ) нарушений, умеренная выраженность аутоагрессии ( $p \leq 0,001$ ) и импульсивности ( $p \leq 0,001$ ). Пациенты основной группы с аутоагрессивным поведением ( $n=58$ ) прошли курс кризисной психотерапии, состоящей из этапов кризисной поддержки, кризисного вмешательства и повышения уровня адаптации. После курса психотерапии снизился уровень агрессии ( $6,45 \pm 0,41$ ), аутоагрессии ( $9,68 \pm 0,67$ ), нарушений в аффективной сфере ( $18,58 \pm 0,66$ ), импульсивности ( $4,23 \pm 0,30$ ), что проявлялось в повышении толерантности к эмоционально-стрессовым факторам, контроле над своими переживаниями и снижении их аффективной окраски ( $p \leq 0,001$ ). Отмечалось расширение межличностного взаимодействия с окружающими, улучшение социальной активности больных, налаживание родственных связей ( $9,23 \pm 0,40$ ).

## რეზიუმე

ფსიქოთერაპიული ინტერვენცია ავადმყოფებში აუტოაგრესიული ქცევით ფსიქოზის პირველი ეპიზოდის დროს

ი. მუდრენკო, ა. პოტაპოვი, დ. სოტნიკოვი,  
ო. კოლინკო, ა. კმიტა

სუმის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი,  
სამედიცინო ინსტიტუტი, უკრაინა

სტატიაში აღწერილია აუტოაგრესიული ქცევის ფსიქოპათოლოგიური პრედიქტორების ფორმირება ავადმყოფებში პირველი ფსიქიური ეპიზოდით, რაც წარმოადგენდა კრიზისული ფსიქოთერაპიის ჩატარების სამიზნეს კომპლექსური, გადაუდებელი სუიციდალური დახმარების აღმოჩენისათვის. კვლევა ჩატარებულია სუმის სამხარეო ფსიქონევროლოგიური დისპანსერის ბაზაზე. დაკვირვება მიმდინარეობდა 100 ავადმყოფზე პირველადი ფსიქოზური ეპიზოდით. ავადმყოფები გაყოფილი იყო 2 ჯგუფად: I (ძირითადი) ჯგუფი – 58 ავადმყოფი სუიციდალური გამოვლინებით, II (საკონტროლო) ჯგუფი

– 42 სუიციდალური გამოვლინების გარეშე. აუტოაგრესიული პრედიქტორების (პრესუიციდალური სინდრომი) გამოვლენის ტესტის შედეგების მიხედვით აუტოაგრესიული ქცევის კლინიკო-პსიქოპათოლოგიურ პრესიქტორებს განეკუთვნება: კოგნიტიური ფუნქციების შეზღუდვა ( $p \leq 0,001$ ), პიროვნებათაშორისი კონტაქტების თავიდან აცილება ( $p \leq 0,001$ ), ეფექტური და ვეგეტატიური ( $p \leq 0,01$ ), აფექტური და ვეგეტატიური დარღვევები, აუტოაგრესიის ზომიერი გამოხატულება ( $p \leq 0,001$ ). ძირითადი ჯგუფის პაციენტებს ( $n=58$ ) ჩატარდა კრიზისული ფსიქოთერაპიის კურსი, რომელიც შედგებოდა კრიზისული თანადგომის, კრიზისული ჩარევის და ადაპტაციის ამალღების ეტაპებისაგან. ჩატარებული ფსიქოთერაპიის კურსის შემდეგ შემცირდა აგრესიის ( $6,45 \pm 0,41$ ), აუტოაგრესიის ( $9,68 \pm 0,67$ ), აფექტურ სფეროში დარღვევების ( $18,58 \pm 0,66$ ), იმპულსირების ( $4,23 \pm 0,30$ ) მაჩვენებლები, რაც გამოიხატა ემოციურ-სტრესული ფაქტორების მიმართ ტოლერანტობით, საკუთარი განცდების კონტროლით და მათი აფექტური შეფერვლობის შემცირებით ( $p \leq 0,001$ ). აღინიშნა სოციალური აქტივობის ამალღება, ნათესაური კავშირების აღდგენა, გარემოსთან ურთიერთობის გაუმჯობესება ( $9,23 \pm 0,40$ ).

## PHAGOCYTOSIS AND EXPRESSION OF Fcγ-RCEPTORS AND CD180 ON MONOCYTES IN CHRONIC LYMPHOCYtic LEUKEMIA

<sup>1</sup>Tsertsvadze T., <sup>1</sup>Mitskevich N., <sup>1</sup>Bilanishvili A., <sup>2</sup>Girdaladze D., <sup>1,3</sup>Porakishvili N.

<sup>1</sup>Iv. Javakhishvili Tbilisi State University; <sup>2</sup>Institute of Haematology and Blood Transfusiology, Tbilisi, Georgia;  
<sup>3</sup>University of Westminster, London, UK

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a lymphoproliferative disease characterised by accumulation of monoclonal CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> lymphocytes in peripheral blood and bone marrow [1-3]. CLL is the most common leukaemia in the US and in Europe, including Georgia, and rare in China, Japan, and Southeast Asian countries. Some studies have however, shown increasing occurrence of CLL in Taiwan [4,5]. The aetiology of the disease is still unknown [6].

The disease is incurable, albeit there are new molecular and immunotherapy methods currently available, which, in conjunction with chemotherapy, lead to the “precision therapy” approach [7]. The majority of immunotherapies are based on the ability of therapeutic anti-

bodies (Rituximab, Alemtuzumab) to mobilize anti-tumour potential of the Natural Killer cells and macrophages/monocytes through their Fcγ-receptors (FcγR) [8]. Therefore functional status of monocytes and the levels of their FcγR expression are important contributors to the efficacy of immunotherapy of CLL [9]. There are three types of FcγR - CD64, CD32 and CD16 which differ by their affinity of binding to IgG [10-12], and in this paper we assess the levels of their expression on CLL monocytes. In addition, CLL patients are characterized by a profound immunodeficiency, and how this affects monocytes, has not yet been established. Here we study the ability of monocytes of CLL patients to attach and engulf gram-negative bacterial particles as well as the level of expression of CD180

toll-like receptor which is involved in anti-bacterial innate immune responses [13] and in the regulation of intracellular signaling in CLL cells [14-16].

**Material and methods.** Peripheral blood was obtained from 22 CLL patients, at various stages of the disease (Rai I-IV), age 45-80 (median age 67), care of Professor Darejan Ghirdaladze, Institute of Haematology and Blood Transfusiology, Tbilisi, Georgia. WBC counts in patients varied from  $4.9 \times 10^9/L$  to  $120 \times 10^9/L$ . Fourteen patients were untreated during six months prior to the study, 8 were treated with Cyclophosphamide, Adriamycin, Prednisolone (COP). Ten ml of blood were collected in heparinised tubes (Sigma), stored at a room temperature and processed on the same day. The control group consisted of 12 healthy age-matched volunteers (median age 65).

**Assessment of phagocytosis.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated in Ficoll-Hypaque (Sigma) density gradient, the cells were washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco). Rabbit polyclonal IgG antibodies (Molecular Probes), specific for *Staphylococcus aureus*, were used as an opsonizing reagent to enhance the uptake of particles by the monocytes and were added to FITC-conjugated *S. aureus* (Wood strain, Molecular Probes). The mixture was incubated at 37°C for 1 hour and washed four times in Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma). The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in medium RPMI-1640 (Sigma). The concentration of isolated PBMCs was adjusted at  $0.1 \times 10^6$  cells/ml. 100  $\mu$ l of cell suspension was mixed with 20  $\mu$ l of opsonized or untreated *S. aureus* and incubated at 37°C for 40 minutes, the supernatant was removed and the samples were analyzed in a FACScan flow cytometer (Becton&Dickinson). The results were expressed as the mean fluorescent intensity (MFI) of FITC-positive cells in the monocyte gate of a dot-plot in the side/forward scatter (SSC-FSC).

In separate experiments the Trypan Blue dye (Sigma) was added to monocytes at a final concentration 0.1% to quench the fluorescence of *S. aureus* attached to the surface of the cells, in order to assess the engulfed *S. aureus* exclusively (Dr John Holton, UCL, personal communication).

In order to assess possible cytokine-dependent enhancement of phagocytosis, 200 U/ml of type II interferon (IFN $\gamma$ ) and 100 ng/ml of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were added to PBMC and the phagocytic ability of monocytes was measured upon 12 hours of incubation with the cytokines.

**Immunophenotyping:** PBMCs were isolated as above and were treated with the following monoclonal antibodies: FITC~anti Human CD64, FITC~anti Human CD16, FITC~anti Human CD180; PE~anti Human CD32 and the relevant control IgG1 (BD Pharmingen) following the standard procedure described previously by us [14]. All samples were analysed using the FACScan flow cytometer and the results were expressed as the percentages of positive cells (CD180) as well as MFI (all receptors).

The data was statistically analysed using the Mann-Whitney non-parametrical *U*-test. The values given in the figures represent the average (M) and its standard deviation (SD).

**Results and their discussion.** Our data demonstrated that monocyte ability to attach and to engulf opsonized *Staphylococcus aureus* was significantly decreased in untreated CLL patients compared to normal age-matched healthy volunteers (Fig. 1).

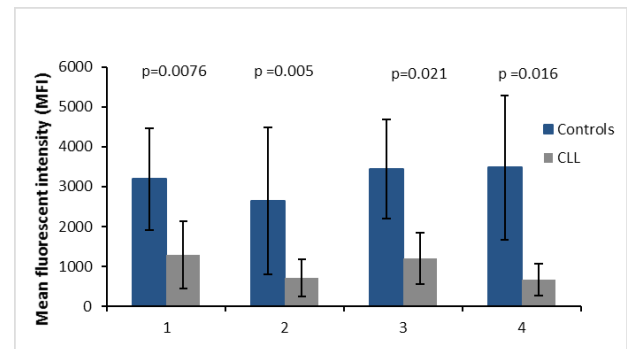


Fig. 1. Mean fluorescent intensity (MFI) of the attached and engulfed *S. aureus* particles by monocytes of untreated CLL patients (n=14) and normal controls (n=12): 1) non-opsonised particles; 2) non-opsonized particles treated with Trypan Blue; 3) opsonized particles; 4) opsonized particles treated with Trypan Blue

No differences were observed between the attachment/engulfing of the opsonized or non-opsonized bacterial particles. This might be due to the fact that the expression of Fc $\gamma$ RI which interacts with opsonising IgG1 is significantly reduced on CLL monocytes as shown previously by us [17,18] and, presumably, Fc $\gamma$ RI does not play an appreciable role in the particle engulfment (Fig. 1: 1 and 3).

In certain experiments we treated the monocytes/particle complexes with Trypan Blue dye which was shown to quench the surface bound but not the intracellular fluorescence (Dr John Holton, UCL, personal communication) in order to assess the levels of the true internalization of the *S. aureus*. However no appreciable changes were detected in the MFI of the CLL monocytes, treated or untreated with Trypan Blue, irrespective of opsonization (Figure 1: 2 and 4). This indicates that very few bacterial particles remained on the cell surface non-internalised, and that the phagocytic capacity of the monocytes of CLL patients was indeed saturated.

We next explored whether the impaired phagocytic capacity of the monocytes of CLL patients can be enhanced by the administration *in vitro* of the therapeutic cytokines - IFN $\gamma$  and G-CSF [19]. Surprisingly, the ability of monocytes, stimulated with the optimal physiological concentrations of IFN $\gamma$  and G-CSF [20] to engulf *S. aureus* was significantly lower than that of unstimulated cells (Fig. 2), which might suggest activation-induced cell death of overstimulated monocytes [21].

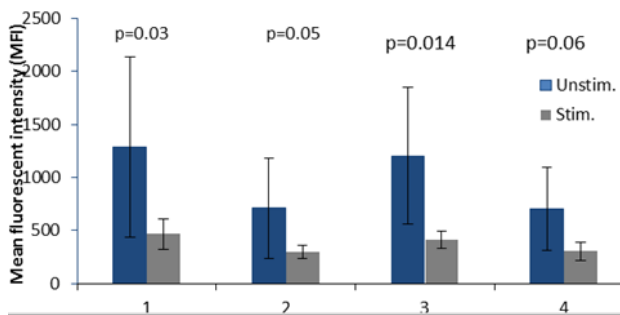


Fig. 2. Mean fluorescent intensity (MFI) of the attached and engulfed *S. aureus* particles by stimulated and unstimulated with IFN $\gamma$  and G-CSF monocytes of untreated CLL patients (n=14): 1) non-opsonized particles; 2) non-opsonized particles treated with Trypan Blue; 3) opsonized particles; 4) opsonized particles treated with Trypan Blue

The quenching of the cell surface fluorescence by Trypan Blue did not impact the low level of the bacteria internalization by the cytokine-treated monocytes from CLL patients. This indicates that IFN $\gamma$  and G-CSF addition did not change the ratio between the cell surface bound and internalized bacterial particles.

Our previous studies demonstrated that, unlike CD32, expression of CD64 on CLL monocytes was significantly decreased compared to the controls which might account for their weak phagocytic activity [17,18]. Here we analysed the expression of Fc $\gamma$  receptors on monocytes in correlation with CLL Rai stages and the treatment regimen available in Georgia. The results demonstrate a further decrease in the expression of CD64 on monocytes with more advanced stages of CLL (Fig. 3). In contrast, no appreciable changes were detected for the expression of CD32 and CD16, although the expression of CD32 was quite variable.

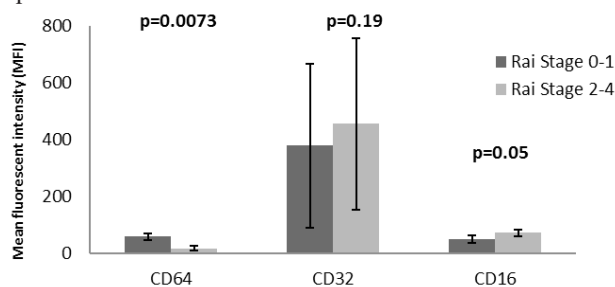


Fig. 3. Expression of CD64, CD32, and CD16 on monocytes of CLL patients at the early and late Rai stages of CLL

Likewise, the treatment of CLL patients with COP (Cyclophosphamide, Adriamycin, Prednisolone) leads to a further decrease in the expression of CD64, but not CD32 or CD16 (Fig. 4).

Our data indicates that the dramatic decrease in the expression of CD64 on monocytes of CLL patients coupled with the impaired phagocytic capacity would

substantially undermine the ability of monocytes to contribute to anti-bacterial immune responses and would lead to immunodeficiency, aggravated by the progressive disease and certain treatment regimen (COP). In addition, aberrant expression of CD64 would negatively affect the efficacy of antibody-mediated immunotherapies [22]. The necessity of the optimal management of CLL through the augmentation of the monocytic function in CLL appears to be paramount, and other approaches rather than administration of IFN $\gamma$  and G-CSF should be explored.

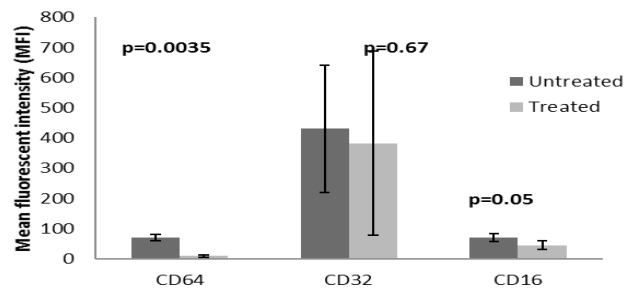


Fig. 4. Expression of CD64, CD32, and CD16 on monocytes of CLL patients untreated (n=14) and treated (n=8) with COP

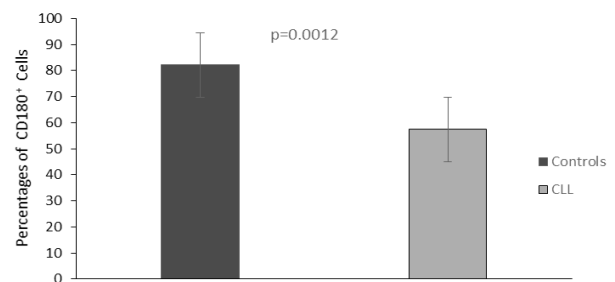


Fig. 5. Percentages of CD180<sup>+</sup> monocytes in peripheral blood of CLL patients and normal controls

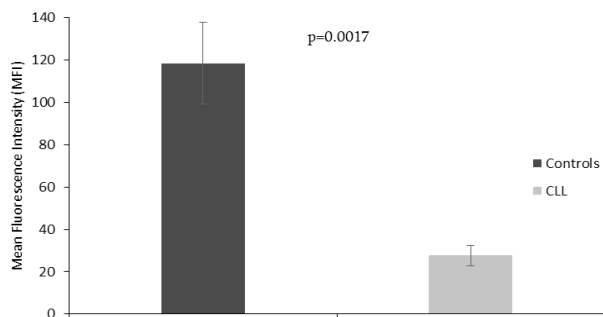


Fig. 6. MFI of the expression of CD180 on monocytes of CLL patients and normal controls

The diminished phagocytic activity could be also due to the changed microenvironmental interactions in CLL, many of which are mediated by Toll like receptors (TLRs) [23]. We have previously reported impaired expression of one of the TLRs – CD180 on CLL cells [14]. Here we assessed the expression of CD180 on monocytes from CLL patients.

Our results indicate that the levels of CD180 on monocytes from CLL patients were also significantly de-

creased, compared to normal controls ( $p=0.0012$ ) as expressed both by the percentages of positive cells (Fig. 5) and MFI (Fig. 6). This would substantially undermine the ability of monocytes in CLL to contribute to anti-bacterial immune responses [13], particularly to gram-negative bacteria [24].

The decreased functional status of monocytes in CLL might contribute to the diminished efficacy of therapeutic antibodies as well as to the immunodeficiency, characteristic for these patients. Development of the therapeutic approaches focused on the optimization of the functional activity of monocytes in CLL patients, would allow to augment anti-bacterial immune responses pre- and post-therapeutic intervention, and to assist effective immunotherapy of CLL.

This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation (SRNSF).

## REFERENCES

1. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol.* 2003; 21: 841–894.
2. Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2007; 7(2):127-31.
3. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008; 111(12):5446-56.
4. Fleischer T, Chang TT, Chiang JH, et al. Integration of Chinese Herbal Medicine Therapy Improves Survival of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(21): e3788.
5. Wu SJ, Huang SY, Lin CT, et al. The Incidence Of Chronic Lymphocytic Leukemia In Taiwan, 1986-2005: A Distinct Increasing Trend with Birth-Cohort Effect. *Blood.* 2010; 116, 4430-5.
6. Rodrigues CA, Gonçalves MV, Ikoma MR, et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2016; 38(4):346-357.
7. Mavromatis B, Cheson BD. Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2003; 21(9):1874-81.
8. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2010; 10:317–327.
9. Clifford R, Louis T, Robbe P, et al. SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood.* 2014; 123(7):1021-31.
10. Garcia-Garcia E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Blood.* 2000; 95(9): 2943-2946.
11. Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, et al. Activating Fc  $\gamma$  receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med.* 2013; 26;210(9):1685-93.
12. Kim JM, Ashkenazi A. Fc $\gamma$  receptors enable anticancer action of proapoptotic and immune-modulatory antibodies. *J Exp Med.* 2013; 26; 210(9): 1647–1651.
13. Chaplin JW, Kasahara S, Clark EA, Ledbetter JA. Anti-CD180 (RP105) activates B cells to rapidly produce polyclonal Ig via a T cell and MyD88-independent pathway. *J Immunol.* 2011; 187(8):4199-209.
14. Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP, et al. Differential expression of CD180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br J Haematol.* 2005; 131(3):313-319.
15. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, et al. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2011; 153:486–498.
16. Porakishvili Nino, Vispute Ketki, Rajakaruna Nadeeka, Andrew Steele, Kulikova Nina, Tsertsvadze Tamar, Clark Edward A., Rai Kanti R., Nathwani Amit, Damle Rajendra N., Chiorazzi Nicholas and Lydyard, Peter M. Re-wiring of sIgM-mediated signaling by CD180-toll-like receptor in CLL. *Molecular Medicine.* 2015; 21:46-57.
17. Tsertsvadze T, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Correlation of the expression of CD32 and CD180 receptors on CLL cells and MEC1 Cell Line. *Georgian Medical News.* 2015; 2(240): 56-59.
18. Tsertsvadze T, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Aberrant expression of Fc $\gamma$  receptors and toll like receptor CD180 on monocytes from patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Georgian Medical News.* 2015, 2(239): 35-38.
19. Morris KT, Castillo EF, Ray AL, et al. Anti-G-CSF treatment induces protective tumor immunity in mouse colon cancer by promoting protective NK cell, macrophage and T cell responses. *Oncotarget.* 2015; 6(26):22338-47.
20. Lendemans S, Kreuzfelder E, Rani M, et al. Toll-like receptor 2 and 4 expression after severe injury is not involved in the dysregulation of the innate immune system. *J Trauma.* 2007 Oct;63(4):740-6.
21. Miranda-García M, Däbritz J, Varga G, et al. PReS-FINAL-2332: Activation-induced cell death of human monocytes as a novel mechanism fine-tuning inflammation and autoimmunity. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2013; 11(2): P322.
22. Bpetricevic B, Laengle J, Singer J, et al. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *Journal of Translational Medicine.* 2013; 11: 307.
23. Kostareli E, Gounari M, Janus A, et al. Antigen receptor

stereotypy across B-cell lymphoproliferations: the case of IGHV4-59/IGKV3-20 receptors with rheumatoid factor activity. *Leukemia*. 2012; 26:1127–1131.

24. Liu B, Fu Y, Feng S, et al. Involvement of RP105 and Toll-Like Receptors in the Activation of Mouse Peritoneal Macrophages by *Staphylococcus aureus*. *Scand J Immunol*. 2013; 78(1):8-16.

## SUMMARY

### PHAGOCYTOSIS AND EXPRESSION OF Fcγ-RECEPTORS AND CD180 ON MONOCYTES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

<sup>1</sup>Tsertsvadze T., <sup>1</sup>Mitskevich N., <sup>1</sup>Bilanishvili A.,  
<sup>2</sup>Girdaladze D., <sup>1,3</sup>Porakishvili N.

<sup>1</sup>*Iv. Javakhishvili Tbilisi State University; <sup>2</sup>Institute of Haematology and Blood Transfusiology, Tbilisi, Georgia;*  
<sup>3</sup>*University of Westminster, London, UK*

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a lymphoproliferative disease characterised by accumulation of monoclonal CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> lymphocytes in the peripheral blood and bone marrow. CLL is the most common type of the adult leukemia in the Western world. The disease is incurable, albeit there are new molecular and immunotherapy methods currently available in conjunction with chemotherapy, leading to the “precision therapy”. The majority of immunotherapeutic approaches are based on the ability of therapeutic antibodies (Rituximab, Alemtuzumab) to mobilize anti-tumour potential of the Natural Killer cells and macrophages/monocytes through their Fcγ-receptors (FcγR). Therefore functional status of monocytes in CLL is an important contributor to the efficacy of this treatment. In addition, CLL patients are characterized by a profound immunodeficiency, and how this affects monocytes, has not been established.

Here we study *ex vivo* phagocytic function and the expression of Fcγ receptors and CD180 toll-like receptor (TLR) by monocytes of 14 untreated and 8 treated with Cyclophosphamide, Adriamycin, Prednisolone (COP) CLL patients, and 12 age-matched control volunteers. Phagocytic function was assessed through the ability of freshly isolated monocytes to attach and to engulf intact or opsonized *Staphylococcus aureus* particles *in vitro* with or without Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) and Interferon g (IFN $\gamma$ ). Simultaneously, immunophenotyping for FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) and CD180 has been carried out. The results were assessed by Flow Cytometry.

Our results demonstrated that phagocytosis of the intact and opsonised or intact *S. aureus* by monocytes of CLL patients was significantly decreased in comparison with normal controls, with no recovery upon the treatment with GM-CSF and IFN $\gamma$ . A significant decrease in

the expression of CD64 and CD180 has been detected on monocytes of CLL patients, with the drop in CD64 expression correlating with the disease progression and advanced Rai stages. In addition, the treatment with COP led to a more profound decrease in the expression of CD64. No appreciable changes were detected in the expression of CD32 and CD16 throughout the experiments. The diminished expression of CD64 and CD180 provides possible explanation for the impaired phagocytic function of monocytes in CLL, as FcγRI receptor interaction with opsonising IgG1, and CD180 with the ligands on *S. aureus* might affect the ability of monocytes to attach and to engulf *S. aureus* particles and effectively eliminate the pathogen.

Our data indicates that the decreased functional status of monocytes in CLL might contribute to the diminished efficacy of therapeutic antibodies as well as to the immunodeficiency, characteristic for these patients.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukaemia (CLL), CD180, FcγR, phagocytosis, monocytes.

## РЕЗЮМЕ

### ФАГОЦИТАРНАЯ ФУНКЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ Fcγ РЕЦЕПТОРОВ И CD180 НА МОНОЦИТАХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЛИМФОЦИТАРНОЙ ЛЕЙКЕМИИ

<sup>1</sup>Цертсвадзе Т.Ш., <sup>1</sup>Мицкевич Н.Г., <sup>1</sup>Биланишвили А.В.,  
<sup>2</sup>Гирдаладзе Д.М., <sup>1,3</sup>Поракешвили Н.З.

<sup>1</sup>*Тбилисский государственный университет Ив. Джавахишвили; <sup>2</sup>Институт гематологии и трансфузиологии, Тбилиси, Грузия; <sup>3</sup>Вестминстерский университет, Лондон, Великобритания*

В статье представлены данные относительно *ex vivo* фагоцитарной функции моноцитов и экспрессии Fcγ-рецепторов и CD180 толл-подобного рецептора (TLR) на моноцитах периферической крови 14 нелеченых и 8 леченых комбинацией циклофосфамид, адриамицин и преднизолон (COP) пациентов с хронической лимфоцитарной лейкемией (ХЛЛ) и 12 практически здоровых доноров того же возраста. Фагоцитарную функцию оценивали по способности свежеезолированных моноцитов присоединять и поглощать интактные или опсонизированные частицы *Staphylococcus aureus in vitro* в условиях присутствия или отсутствия цитокинов – фактора, стимулирующего гранулоцитарные/макрофаговые колонии (GM-CSF) и интерферона g (IFN $\gamma$ ). Одновременно проводили иммунофенотипирование моноцитов на наличие Fcγ1RI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и CD180. Результаты оценивали методом проточной цитометрии.

Полученные данные выявили значительно сниженный фагоцитоз интактных и опсонизированных частиц *S. aureus* моноцитами у пациентов с ХЛЛ в сравнении с контрольными показателями, который не



восстанавливается после добавления GM-CSF и IFN $\gamma$ . Кроме того, на моноцитах пациентов с ХЛЛ обнаружено значительное снижение экспрессии CD64 и CD180, причем уровень CD64 коррелировал с прогрессированием заболевания и поздними Rai стадиями. Дефицит экспрессии CD64 еще более усугублялся у больных, леченых COP. Значительного изменения экспрессии CD32 или CD16 на протяжении всех экспериментов не обнаружено. Низкой экспрессией CD64 и CD180 можно объяснить нарушение фагоцитарной функции

моноцитов при ХЛЛ, поскольку взаимодействие Fc $\gamma$ RI рецептора с опсонизирующим IgG1, а CD180 - с лигандами, присутствующими на *S. aureus*, влияет на способность моноцитов присоединять и поглощать частицы *S. Aureus*, с целью эффективной нейтрализации патогена.

Результаты исследования указывают, что снижение функционального статуса моноцитов при ХЛЛ, по всей вероятности, способствует уменьшению эффективности терапевтических антител и углублению иммунодефицита, характерного для этих больных.

## რეზიუმე

ფაგოციტური ფუნქცია და Fc $\gamma$ -რეცეპტორებისა და CD180-ის ექსპრესია მონოციტებზე ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის დროს

<sup>1</sup>თ. ცერცვაძე, <sup>1</sup>ნ. მიცკევიჩი, <sup>1</sup>ა. ბილანიშვილი,  
<sup>2</sup>დ. ღირდალაძე, <sup>3</sup>ნ. ფორაქიშვილი

<sup>1</sup>ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი;  
<sup>2</sup>ჰემატოლოგიისა და ტრანსფუზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი, საქართველო;  
<sup>3</sup>უესტმინსტერის უნივერსიტეტი, ლონდონი, დიდი ბრიტანეთი

კვლევის მიზანს შეადგენდა ex vivo მონოციტების ფაგოციტური ფუნქციის და Fc $\gamma$ -რეცეპტორების და CD180 თოლ-მსგავსი რეცეპტორის (TLR) ექსპრესიის შეფასება ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიით (ქლლ) ავადმყოფებში. შესწავლილია 14 არანამკურნალები პაციენტის, Cyclophosphamide-ით, Adriamycin-ით და Prednisolone-ით (COP) ნამკურნალები 8 პაციენტის და შესაბამისი ასაკობრივი ჯგუფის 12 პრაქტიკულად ჯანმრთელი დონორის პერიფერული სისხლი. ფაგოციტური ფუნქცია ფასდებოდა ახლადიზოლირებული მონოციტების მიერ *Staphylococcus aureus*-ის ინტაქტური ან ოფსონიზებული ნაწილაკების მიერთებისა და შთანთქმის უნარით in vitro ციტოკინების (გრანულოციტ/მაკროფაგების კოლონიების მასტიმულერებელი ფაქტორის (GM-CSF) და ინტერფერონ  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-ის) თანაობისას, ან მათ გარეშე. ამავდროულად, ხორციელდებოდა მონოციტების იმუნოფენოტიპირება Fc $\gamma$ RI (CD64)-ის, Fc $\gamma$ RII (CD32)-ის, Fc $\gamma$ RIII (CD16)-ის და CD180-ის არსებობაზე. შედეგები ფასდებოდა გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით.

გამოვლინდა, რომ ქლლ-იანი პაციენტების პერიფერული სისხლიდან გამოყოფილი მონოციტების მიერ ოფსონიზებული და ინტაქტური *S. aureus* ნაწილაკების ფაგოციტოზი, საკონტროლო

ჯგუფთან შედარებით, მნიშვნელოვნად შემცირებულია და ვერ აღდგება GM-CSF და IFN $\gamma$  ციტოკინების გავლენით. პარალელურად, ქლლ-ით დაავადებულებში დადგინდა CD64 და CD180 ექსპრესიის სარწმუნო დეფიციტი; CD64-ის ექსპრესიის დაქვეითება კორელირებდა დაავადების პროგრესირებასა და Rai-ს გვიან სტადიებთან. ქლლ-ით დაავადებულების მკურნალობამ COP-ით გამოიწვია CD64-ის ექსპრესიის დეფიციტის გარდამავება. CD32 და CD16 ექსპრესია ექსპერიმენტის მსვლელობაში სარწმუნოდ არ შეცვლილა. CD64-ის და CD180-ის დაბალი ექსპრესიით შეიძლება აიხსნას ქლლ-ით დაავადებულთა მონოციტების ფაგოციტური ფუნქციის დაკნინება, ვინაიდან Fc $\gamma$ RI რეცეპტორების უნარი, დაუკავშირდენ IgG1 ქვეკლასის მათგონიზებელ ანტისხეულებს, ხოლო CD180-ისა კი - *S. aureus* ნაწილაკებს, გავლენას მოახდენდა მონოციტების მიერ ნაწილაკების მიერთების, შთანთქმის და პათოგენის ეფექტურად ელიმინაციის უნარზე.

მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით ავტორები გამოსთქვამენ ვარაუდს, რომ ქლლ-ის დროს მონოციტების ფუნქციური დეფიციტი იწვევს თერაპიული ანტისხეულების ეფექტურობის შემცირებას და მონაწილეობს ქლლ-ით დაავადებულებისთვის დამახასიათებელ იმუნოდეფიციტში.

## ПАТОГЕННО ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ГИПОКСИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ, В ОРГАНАХ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

<sup>1</sup>Мирошниченко М.С., <sup>2</sup>Шерстюк С.А., <sup>2</sup>Зубова Е.О., <sup>2</sup>Наконечная С.А.

<sup>1</sup>Харьковский национальный медицинский университет, кафедра патологической анатомии;

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, кафедра анатомии человека, Украина

В структуре заболеваемости детского населения одно из ведущих мест по сей день занимает патология органов мочевой системы [7], истоки которой в большинстве случаев кроются именно в антенатальном, интранатальном либо постнатальном периодах развития [1]. На основании некоторых исследований выдвинута теория «внутриутробного программирования», суть которой состоит в неблагоприятном воздействии на развитие органов плода в различные периоды, нарушая свойственные раннему онтогенезу закономерности формирования регуляторных механизмов на клеточном, тканевом и системном уровнях, что изменяет характер адаптивных реакций после рождения в новых условиях окружающей среды и способствует развитию патологических состояний [3,10].

Важнейшим повреждающим фактором, оказывающим влияние не только на состояние здоровья плода и новорожденного, но и на дальнейшее развитие ребенка, является кислородное голодание (гипоксия), которое развивается при генитальной и экстрагенитальной патологии беременной женщины, сопровождая большинство акушерских осложнений [1]. Внутриутробная гипоксия плода и асфиксия новорожденного занимают 21-45% в структуре всей перинатальной патологии [8]. Эффекты гипоксии на организм ребенка зависят от выраженности ее воздействия, индивидуальной толерантности организма и срока внутриутробного развития [1,8].

При гипоксии плода и новорожденного происходит нарушение жизненно важных систем организма, в том числе и мочевой системы. В результате гипоксического воздействия у новорожденных детей развивается ишемическая нефропатия, интерстициальный нефрит [5], острая почечная недостаточность, почечный дизэмбриогенез [12]. У детей, перенесших тяжелую гипоксию с сопутствующими заболеваниями, получающих массивную терапию, частота поражения почек возрастает, а у новорожденных, находящихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии, патология почек развивается примерно в 32% случаев [12,17].

Данные литературы о влиянии гипоксии на почки плода и новорожденного в большинстве случаев имеют клиническую направленность и не подтверждены морфологически. Остается нерешенным вопрос, касающийся влияния гипоксии на структурно-функциональные особенности мочеточников и мочевого пузыря плода и новорожденного. Вышеизложенное

указывает на актуальность вопроса и диктует необходимость проведения исследований в этом направлении.

Целью исследования явилось определение особенностей апоптоза в почках, мочеточниках и мочевом пузыре плода и новорожденного при моделировании хронической внутриутробной гипоксии, острой постнатальной гипоксии и смешанной гипоксии в эксперименте.

**Материал и методы.** В ходе исследования проведен эксперимент по моделированию высокогорной гипоксии (ВГ) на крысах линии WAG со строгим соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выведению их из эксперимента и последующей утилизации. ВГ моделировали с помощью герметичной барокамеры, из которой выкачивали воздух и создавали условия резкого уменьшения атмосферного давления. Крысы ежедневно на 20 минут в одно и то же время помещались в условия, характерные для высоты в 7500 метров, соответствующую давлению 287 мм.рт.ст.

Животные были разделены на четыре группы: I – контрольная – беременные крысы-самки (n=3) не подвергались ВГ, при этом часть самок выводили из эксперимента на поздних сроках гестации с целью извлечения плодов (n=7), а от остальной части самок получали потомство (n=11), которое в первые сутки с момента рождения выводили из эксперимента; II группа – моделирование хронической внутриутробной гипоксии (ХВГ) – беременные крысы-самки (n=4) на протяжении всей беременности подвергались ВГ, при этом часть самок выводили из эксперимента на поздних сроках гестации с целью извлечения плодов (n=6), а от остальной части самок получали потомство (n=10), которое в первые сутки жизни выводили из эксперимента; III – моделирование острой постнатальной гипоксии (ОПГ) – беременные крысы-самки (n=2) не подвергались ВГ, однако полученное от них потомство (n=8) в первые сутки жизни одноразово подвергали ВГ и затем выводили из эксперимента; IV – моделирование смешанной гипоксии (СГ) – беременные крысы-самки (n=3) на протяжении всей беременности подвергались ВГ, а затем полученное от них потомство (n=8) в первые сутки жизни одноразово подвергали ВГ и выводили из эксперимента.

Материалом исследования явилась ткань почки, мочеточника и мочевого пузыря плодов и новорожденных. Апоптотическую активность в органах моче-

вой системы экспериментальных животных изучали с помощью моноклональных антител (МКА) к ядерному маркеру p53. Микропрепараты изучали на микроскопе «Olympus BX-41» (Япония). Абсолютное количество клеток, экспрессирующих p53, подсчитывали в каждом микропрепарате в 5 случайно выбранных полях зрения микроскопа при увеличении  $\times 1000$ .

Для статистического анализа полученных величин в группах использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия между показателями считались достоверными при  $p < 0,05$ . Статистические расчеты проводили с использованием программы «Statistic Soft 6.0».

**Результаты и их обсуждение.** При анализе иммуногистохимической реакции с МКА к p53 в I группе отмечалось незначительное количество p53-положительных клеток в почках, мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных. Так, в почках плодов и новорожденных клетки, экспрессирующие p53, встречались в гломерулярном, тубулярном и стромально-сосудистом компонентах. В почках у животных данной группы выявлена более выраженная ядерная экспрессия p53 в незрелых структурах по сравнению со зрелыми структурами. Выявленная нами особенность также отмечена в работе P. Schmid с соавт. [21], в которой показано снижение уровня экспрессии p53 в головном мозге, печени, легких, тимусе и почках лабораторных животных с увеличением степени зрелости клеточных элементов данных органов. В почках плодов данной группы среднее значение количества p53-положительных клеток было значимо ( $p < 0,05$ ) большим -  $7,83 \pm 0,31$  в сравнении с новорожденными -  $5,40 \pm 0,28$ , что, по всей вероятности, обусловлено наличием большего количества незрелых структур в почках у плодов в сравнении с новорожденными.

В мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных I группы экспрессия p53 регистрировалась в ядрах эпителиоцитов слизистой оболочки, эндотелиальных клеток внутренней оболочки сосудов микроциркуляторного русла, гладких миоцитов, располагающихся как в стенке сосудов, так и в мышечной оболочке микроциркуляторного русла данных органов. Среди очаговой полиморфной клеточной инфильтрации, располагающейся в подслизистой основе, в мышечной и серозной оболочках также выявлены p53-положительные клетки. Среднее значение количества клеток, экспрессирующих p53, у плодов в мочеточнике и мочевом пузыре составило  $5,77 \pm 0,29$  и  $6,97 \pm 0,32$ , соответственно, у новорожденных -  $3,58 \pm 0,21$  и  $5,36 \pm 0,28$ . При анализе полученных данных выявлено значимое ( $p < 0,05$ ) преобладание среднего значения количества p53-положительных клеток в мочеточниках и мочевом пузыре у плодов в сравнении с новорожденными.

Выявленная в I группе экспрессия проапоптотического белка p53 в органах мочевой системы

плодов и новорожденных подтверждает известный факт о развитии апоптотических процессов в физиологических условиях, в ходе которых происходит удаление поврежденных клеток [9]. Апоптотное «самоочищение» является универсальным механизмом для поддержания генотипической и фенотипической однородности клеток и тканей. Известно, что клеточный гомеостаз тканей поддерживается за счет динамического равновесия между пролиферацией и апоптозом клеток. Обеспечение подобного баланса необходимо как для нормального развития, так и для выживания любого организма. [2]. В многочисленных фундаментальных исследованиях показана значимая роль апоптоза в морфогенезе органов мочевой системы [12,18,19].

Во II-IV группах экспрессия p53 выявлена в почках (рис. 1, 2), мочеточниках (рис. 3) и мочевом пузыре плодов и новорожденных, степень выраженности которой была различной в исследуемых группах.

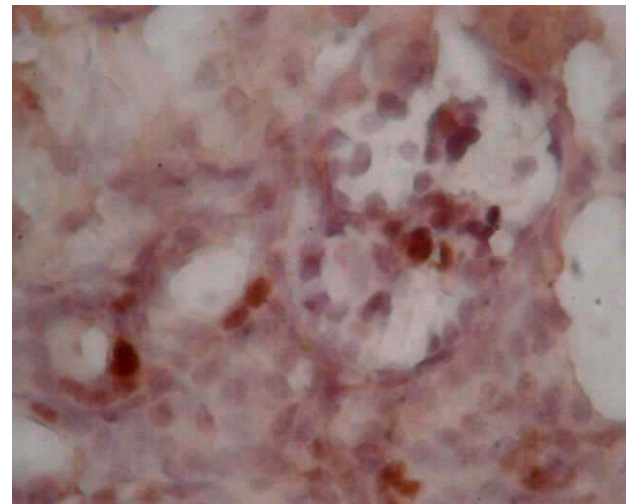


Рис. 1. Группа IV. Экспрессия p53 в почке новорожденной крысы. Пероксидазная реакция с МКА к p53,  $\times 1000$

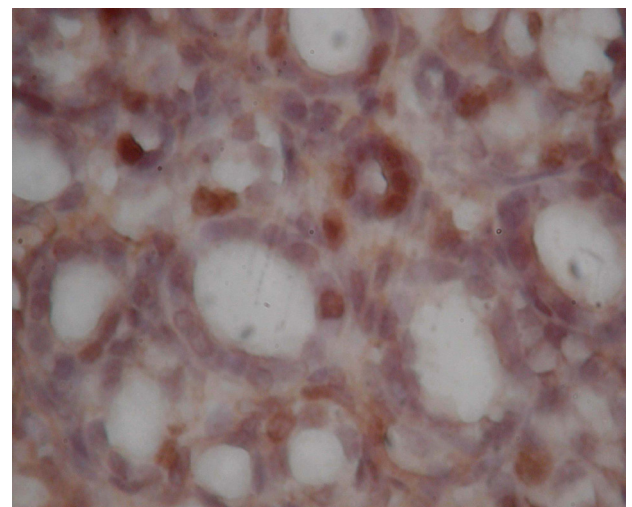


Рис. 2. Группа II. Экспрессия p53 в почке новорожденной крысы. Пероксидазная реакция с МКА к p53,  $\times 1000$

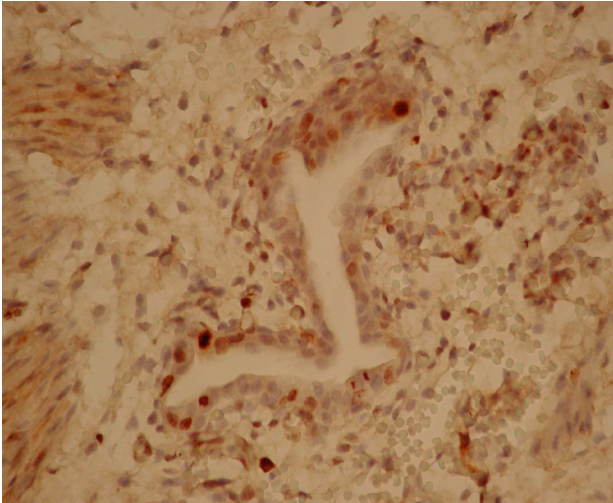


Рис. 3. Группа IV. Экспрессия p53 в мочеточнике новорожденной крысы. Пероксидазная реакция с МКА к p53,  $\times 400$

В почках у плодов II группы среднее значение количества p53-положительных клеток составило  $11,43 \pm 0,50$ , у новорожденных –  $21,72 \pm 0,58$ ; в III группе у новорожденных –  $15,03 \pm 0,63$ , в IV группе –  $33,33 \pm 0,72$ . Среднее значение количества p53-экспрессирующих клеток в мочеточнике и мочевом пузыре во II группе у плодов составило  $13,17 \pm 0,49$  и  $11,83 \pm 0,43$ , у новорожденных –  $16,24 \pm 0,37$  и  $15,38 \pm 0,37$ ; в III группе у новорожденных –  $7,25 \pm 0,27$  и  $8,68 \pm 0,3$ ; в IV группе у новорожденных –  $19,63 \pm 0,31$  и  $21,03 \pm 0,40$ . Анализируя полученные данные исследуемых групп и сравнивая их с группой контроля, во II-IV группах в органах мочевой системы выявлено значимо ( $p < 0,05$ ) большее количество клеток, экспрессирующих p53, что позволяет предполагать о наличии патогенно индуцированного апоптоза, обусловленного гипоксическим воздействием.

Патогенно индуцированный апоптоз, в отличие от апоптоза в физиологических условиях, является разновидностью селективной гибели специализированных клеток, которая досрочно инициируется генами при критическом молекулярном повреждении клетки, не исчерпавшей свой жизненный цикл. Патогенно индуцированный апоптоз специализированных клеток морфологически диагностируется в фазе его молекулярной инициации, в эффекторной фазе и в фазе упорядоченной дезинтеграции (апоптотической деградации) клетки [15].

Для изучения апоптотических процессов в органах мочевой системы плодов и новорожденных выбран ядерный маркер p53. Белок p53 играет ключевую роль в развитии апоптоза. Он способен не только активировать гены, участвующие в индукции апоптоза, но и принимает непосредственное участие в индукции митохондриального пути клеточной смерти. После активации способен поступать в митохондрии из цитоплазмы, минуя входение в ядро. В митохон-

дриях p53 подвергается быстрому ферментативному деубиквитинированию и превращению в активную форму. p53 вступает во взаимодействие с ВН4-доменом антиапоптотических белков BclXL и Bcl2. Связывание с антиапоптотическими белками высвобождает и активирует проапоптотические белки Bax и Bid. Все эти взаимодействия вызывают выброс цитохрома C и индукцию апоптоза даже без транскрипционной активации проапоптотических генов-мишеней p53. Прямая индукция апоптоза под действием p53 является первой и очень быстрой реакцией на повреждения. Вторая волна индукции апоптоза отмечается лишь 6-7 часов спустя; она связана с транскрипционной активностью p53 в ядре. Таким образом, действуя сразу на нескольких уровнях и путем использования совершенно разных механизмов, p53 осуществляет как быстрые реакции на сильные стрессы, так и реализует замедленную, однако весьма эффективную программу апоптоза поврежденных клеток [4,16].

Оценивая степень выраженности иммуногистохимической реакции по количеству p53-положительных клеток в почках, мочеточниках и мочевом пузыре у крыс II-IV групп выявлена умеренная иммуногистохимическая реакция при моделировании ОПГ, выраженная – при моделировании ХВГ и сильно выраженная – при моделировании СГ. Проведенные ранее исследования показали [13], что ХВГ и СГ замедляют морфогенез органов мочевой системы, что проявляется в наличии значительного количества незрелых структур, которые более чувствительны к гипоксическому повреждению, что в результате приводит к активизации апоптотических процессов. Кроме того, различная степень выраженности апоптотических процессов в исследуемых группах может быть еще обусловлена и длительностью действия гипоксии, так как при моделировании ХВГ и особенно СГ повреждающий фактор характеризуется продолжительным, длительным воздействием, а при моделировании ОПГ отмечается кратковременное гипоксическое повреждение.

В результате гипоксического повреждения во II группе апоптотические процессы в почках, мочеточниках и мочевом пузыре более выражены у новорожденных в сравнении с плодами, в то время как в I группе по направлению от плода к новорожденному количество p53-положительных клеток в органах мочевой системы уменьшалось. В мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных II-IV групп локализация клеток, экспрессирующих p53, была такой же, как и в I группе. В почках плодов и новорожденных II-IV групп, как и в I группе апоптотические процессы были более выраженными в незрелых структурах по сравнению со зрелыми.

Интерес представляет тот факт, что в почках у плодов и новорожденных II-IV групп апоптотические процессы более выражены в тубулярном компоненте по сравнению с гломерулярным и стромально-сосудистым компонентами. Следует отметить, что гибель

клеток канальцевого эпителия при экспериментальной гипоксии происходит не только за счет некроза, как ранее было показано [14], но и путем апоптоза. В литературе отмечено, что гипоксия, в первую очередь, вызывает канальцевое повреждение, так как канальца исключительно зависят от аэробного окислительного метаболизма и не способны эффективно переключаться на анаэробный гликолиз в условиях дефицита кислорода. Пораженные тубулярные клетки приводят к повреждению клубочкового аппарата за счет канальцевой обструкции и нарушению тубулогломерулярной обратной связи [6].

**Выводы.** 1. Экспериментальная гипоксия индуцирует апоптотические процессы в почках, мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных, степень выраженности которых была умеренной при моделировании острой постнатальной гипоксии, выраженной - при хронической внутриутробной гипоксии и сильно выраженной - при смешанной гипоксии.

2. Под влиянием острой постнатальной, хронической внутриутробной и смешанной гипоксий в мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных р53-положительные клетки располагались равномерно во всех слоях стенки исследуемых органов, тогда как в почках экспрессирующие р53 клетки преобладали в тубулярном компоненте.

3. При моделировании хронической внутриутробной гипоксии апоптотические процессы в почках, мочеточниках и мочевом пузыре нарастали у новорожденных в сравнении с плодами, в то время как в группе контроля апоптотическая активность снижалась от плода к новорожденному.

Перспективой дальнейших исследований является выявление особенностей экспрессии Ki-67 в почках, мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных при моделировании хронической внутриутробной гипоксии, острой постнатальной и смешанной гипоксии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева А.А., Опарина Т.И. Продукция окиси азота у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию. Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – № 26. – С. 30-34.
2. Бойко Т.А., Шаповалова Е.Ю. Апоптоз и пролиферация клеток обеспечивают расцвет и редукцию первичной почки у эмбрионов человек. Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т.12, № 4 (48). – С. 15-18.
3. Евсюкова И.И. Механизмы программирования заболеваний потомства при акушерской патологии. Журнал акушерства и женских болезней. – 2011. – Т. LX, Выпуск 3. – С. 197-202.
4. Камышный А.М., Гриневич И.В., Камышная В.А. Особенности экспрессии проапоптотического белка

р53 в селезенке крыс линии Wistar в норме и при экспериментальном сахарном диабете. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2011. – Випуск XXIV. – № 1. – С. 22-25.

5. Криштафович А.А., Вильчук К.У., Девялтовская М.Г., Леонович И.В. Диагностика нарушений гемодинамики мозга и почек у новорожденных при гипоксической энцефалопатии. Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. – 2015. – № 1. – С. 59-64.

6. Лисянская О.Ю. Гипоксия – ведущий фактор прогрессирования хронической болезни почек. Почка. – 2016. – № 1 (15). – С. 64-66.

7. Макарова Т.П., Мельникова Ю.С. Механизмы развития эндотелиальной дисфункции при хронической болезни почек у детей. Практическая медицина. – 2014. – № 9 (85). – С. 19-23.

8. Маслякова Г.Н., Палатова Т.В., Чехонацкая М.Л. Патологические факторы в становлении репродуктивной системы плода (обзор литературы). Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2016. – Т. 6, № 2. – С. 259-261.

9. Морозов Ю.А., Марченко Т.В. Патологические аспекты острого почечного повреждения. Почка. – 2012. – № 2. – С. 72-77.

10. Назаренко Л.Г., Сороклат Ю.В., Якимук Н.С. Внутриутробное программирование – новый вектор осмысления акушерской и перинатальной патологии. Архив клінічної та експериментальної медицини. – 2012. – Т. 21, № 2. – С. 177-179.

11. Пак Л.Б., Дубиков А.И., Кабанцева Т.А., Васильюк А.А., Григорян О.М. Апоптоз и патология почек. Нефрология. – 2013. – Т. 17, № 4. – С. 36-43.

12. Погодаева Т.В., Лучанинова В.Н. Прогнозирование формирования заболеваний почек у плода и новорожденного. Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2012. – № 4 (1). – С. 75-80.

13. Сорокина И.В., Марковский В.Д., Борзенкова И.В., Мирошниченко М.С., Плитень О.Н. Морфологические особенности гломерулярного аппарата почек плодов и новорожденных при действии различной гипоксии в эксперименте. Морфология. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 267-272.

14. Сорокина И.В., Мирошниченко М.С., Омельченко О.А., Плитень О.А. Структурные особенности тубулярного компонента нефрона у плодов и новорожденных при действии различных видов гипоксий в эксперименте. Материалы научно-практической конференции «Урология, андрология, нефрология – 2016», Харьков, 26-27 мая 2016 г. – Харьков, 2016. – С. 64-66.

15. Туманский В.А., Шебеко Ю.А. Патогенно индуцированный апоптоз гепатоцитов при хроническом вирусном гепатите: молекулярные механизмы и микроскопическая диагностика. Патология. – 2008. – Т. 5, № 3. – С. 29-33.

16. Чумаков П.М. Белок р53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3-52.

17. Шунькина Г.Л. Роль биохимических исследований

в оценке повреждения функции почек новорожденных после перенесенной гипоксии. Современные технологии в медицине. – 2010. – № 4. – С. 104-106.

18. Ho J. The regulation of apoptosis in kidney development: implications for nephron number and pattern? *Frontiers in pediatrics*. – 2014. – № 2. – doi: 10.3389/fped.2014.00128

19. Koseki C., Herzlinger D., Al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. *The Journal of Cell Biology*. – 1992. – Vol. 119, № 5. – P. 1327-1333.

20. Saifudeen Z., Dipp S., Stefkova J., Yao X., Lookabaugh S., S. El-Dahr S. p53 regulates metanephric development. *J Am Soc Nephrol*. – 2009. – № 20. – P. 2328-2337.

21. Schmid P., Lorenz A., Hameister H., Montenarh M. Expression of p53 during embryogenesis. *Development*. – 1991. – № 113. – P. 857-865.

## SUMMARY

### PATHOGENICALLY INDUCED APOPTOSIS CAUSED BY HYPOXIC EFFECTS IN THE URINARY SYSTEM ORGANS OF FETUSES AND NEWBORNS (EXPERIMENTAL STUDY)

<sup>1</sup>Myroshnychenko M., <sup>2</sup>Sherstiuk S., <sup>2</sup>Zubova Y., <sup>2</sup>Nakonechna S.

<sup>1</sup>Kharkiv National Medical University, Department of Pathological Anatomy; <sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Department of Human Anatomy, Ukraine

The purpose of the study was to identify the characteristics of apoptosis in the kidneys, ureters and bladder of fetuses and newborns in the modeling of chronic intrauterine hypoxia, acute postnatal hypoxia and mixed hypoxia. An experiment was conducted on WAG rats for modeling high altitude hypoxia. Experimental animals were divided into four groups: I – control – fetuses and newborns from healthy rats; II – modeling of chronic intrauterine hypoxia; III – modeling of acute postnatal hypoxia; IV – modeling of mixed hypoxia. The material of the study was the tissue of the kidneys, ureters and bladder of fetuses and newborns. In group I in the kidneys of fetuses the mean value of the number of p53-positive cells was  $7.83 \pm 0.31$ , newborns –  $5.40 \pm 0.28$ ; in the ureters and bladder of fetuses –  $5.77 \pm 0.29$  and  $6.97 \pm 0.32$ , newborns –  $3.58 \pm 0.21$  and  $5.36 \pm 0.28$ .

In the kidneys in group II the mean value of the number of p53-expressing cells in fetuses was  $1.43 \pm 0.50$ , in newborns –  $21.72 \pm 0.58$ ; in group III in newborns –  $15.03 \pm 0.63$ ; in group IV in newborns –  $33.33 \pm 0.72$ . The mean value of the number of p53-expressing cells in the ureters and bladder in group II in fetuses was  $13.17 \pm 0.49$  and  $11.83 \pm 0.43$ , in newborns –  $16.24 \pm 0.37$  and  $15.38 \pm 0.37$ ; in group III in newborns –  $7.25 \pm 0.27$  and  $8.68 \pm 0.32$ ; in group IV in newborns –  $19.63 \pm 0.31$  and  $21.03 \pm 0.40$ . As the result of the study it was found that experimental hypoxia

induced apoptotic processes in the kidneys, ureters and bladder of fetuses and newborns, the severity of which was moderate in the modeling of acute postnatal hypoxia, expressed in the modeling of chronic intrauterine hypoxia and strongly expressed in the modeling of mixed hypoxia. Under the influence of acute postnatal hypoxia, chronic intrauterine hypoxia and mixed hypoxia in the ureters and bladder of fetuses and newborns p53-positive cells were located evenly in all layers of the wall of these organs, whereas in the kidneys p53-positive cells prevailed in the tubular component. In the modeling of chronic intrauterine hypoxia apoptotic processes in the kidneys, ureters and bladder increased in newborns in comparison with fetuses.

**Keywords:** hypoxia, fetus, newborn, urinary system organs, apoptosis.

## РЕЗЮМЕ

### ПАТОГЕННО ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ГИПОКСИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ, В ОРГАНАХ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

<sup>1</sup>Мирошниченко М.С., <sup>2</sup>Шерстюк С.А., <sup>2</sup>Зубова Е.О., <sup>2</sup>Наконечная С.А.

<sup>1</sup>Харьковский национальный медицинский университет, кафедра патологической анатомии; <sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, кафедра анатомии человека, Украина

Целью исследования явилось определение особенностей апоптоза в почках, мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных при моделировании хронической внутриутробной и острой постнатальной и смешанной гипоксий.

В ходе исследования проведен эксперимент на крысах линии WAG по моделированию высокогорной гипоксии. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы: I – контрольная – плоды и новорожденные от здоровых самок; II – моделирование хронической внутриутробной гипоксии; III – моделирование острой постнатальной гипоксии; IV – моделирование смешанной гипоксии. Материалом исследования явилась ткань почки, мочеточника и мочевого пузыря плодов и новорожденных. Апоптотическую активность изучали с помощью моноклональных антител к p53.

В результате исследования установлено, что экспериментальная гипоксия индуцирует апоптотические процессы в почках, мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных, степень выраженности которых была умеренной при моделировании острой постнатальной гипоксии, выраженной – при хронической внутриутробной гипоксии и сильно выраженной – при смешанной гипоксии. Под влиянием острой постнатальной, хронической внутриутробной и

смешанной гипоксий в мочеточниках и мочевом пузыре плодов и новорожденных p53-положительные клетки располагались равномерно во всех слоях стенки исследуемых органов, тогда как в почках экспрессирующие p53 клетки преобладали в тубулярном компоненте. При моделировании хронической внутриутробной гипоксии апоптотические процессы в почках, мочеточниках и мочевом пузыре нарастали у новорожденных в сравнении с плодами.

### რეზიუმე

ჰიპოქსიური ზემოქმედებით გამოწვეული პათოგენინდუცირებული აპოპტოზი ნაყოფისა და ახალშობილის საშარდე სისტემის ორგანოებში (ექსპერიმენტული კვლევა)

<sup>1</sup>მ. მიროშნიჩენკო, <sup>2</sup>ს. შერსტიუკი, <sup>2</sup>ე. ზუბოვა,  
<sup>2</sup>ს. ნაკონენია

<sup>1</sup>ზარკოვის ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, პათოლოგიური ანატომიის კათედრა, უკრაინა;  
<sup>2</sup>ზარკოვის ვ.ნ. კარაზინის სახელობის ეროვნული უნივერსიტეტი, ადამიანის ანატომიის კათედრა, უკრაინა

კვლევის მიზანს შეადგენდა აპოპტოზის თავისებურებების გამოვლენა ნაყოფისა და ახალშობილის თირკმელში, შარდსაწვეთსა და შარდის ბუშტში ქრონიკული საშვილოსნოსშიდა ჰიპოქსიის, პოსტნატალური ჰიპოქსიის და შერეული ჰიპოქსიის მოდელირების პირობებში.

WAG ხაზის ვირთაგვებზე ჩატარებული

იყო ექსპერიმენტი მაღალმთიანი ჰიპოქსიის მოდელირებით. საცდელი ცხოველები დაიყო ოთხ ჯგუფად: I (საკონტროლო) – ჯანმრთელი მდედრი ცხოველების ნაყოფები და ახალშობილები; II – ქრონიკული საშვილოსნოსშიდა ჰიპოქსიის მოდელირებით; III – მწვავე პოსტნატალური ჰიპოქსიის მოდელირებით; IV – შერეული ჰიპოქსიის მოდელირებით. კვლევის მასალას წარმოადგენდა ნაყოფისა და ახალშობილის თირკმლის, შარდსაწვეთისა და შარდის ბუშტის ქსოვილი. აპოპტოზური აქტივობა შეისწავლებოდა მონოკლონური ანტისხეულების p53 საშუალებით.

დადგენილია, რომ ექსპერიმენტული ჰიპოქსია იწვევს აპოპტოზური პროცესების ინდუცირებას ნაყოფისა და ახალშობილის თირკმელში, შარდსაწვეთსა და შარდის ბუშტში, რომელიც ზომიერად არის გამოხატული მწვავე პოსტნატალური ჰიპოქსიის და ქრონიკული საშვილოსნოსშიდა ჰიპოქსიის მოდელირებისას, მკვეთრად გამოხატული - შერეული ჰიპოქსიის მოდელირების პირობებში. მწვავე პოსტნატალური, ქრონიკული საშვილოსნოსშიდა და შერეული ჰიპოქსიის გავლენით ნაყოფისა და ახალშობილის შარდსაწვეთსა და შარდის ბუშტში p53-დადებითი უჯრედები თანაბრად განლაგდებოდა ამ ორგანოების კედლების ყველა ფენაში, ხოლო თირკმელში p53-ის მაექსპრესირებელი უჯრედები სჭარბობდა ტუბულურ კომპონენტში. ქრონიკული საშვილოსნოსშიდა ჰიპოქსიის მოდელირების პირობებში თირკმელში, შარდსაწვეთსა და შარდის ბუშტში განვითარებული აპოპტოზური პროცესები ახალშობილებში უფრო ძლიერი იყო, ვიდრე ნაყოფში.

## AGE-RELATED SPECIFICITIES OF ENDOMETRIAL PROLIFERATION/STEM CELL INDEX DISTRIBUTION

Kikalishvili N., Beriashvili R., Muzashvili T., Burkadze G.

Tbilisi State Medical University, Georgia

Female reproductive system has the unique (paramount) abilities of regeneration, which presumably is conditioned by the presence and distribution of somatic stem cells in different components of tissues – the evident example of the latter seen in the human endometrium; as a dynamic cycling remodeling tissue, it accounts for more than 400 cyclic regeneration, differentiation and desquamation processes during the years of reproductive age of females. According to the recent hypothesis, exactly the adult stem cells are responsible for the cell production during cycling regeneration of endometrium [11].

Endometrial stem cells take the special place among somatic stem cells of female reproductive system, since their essence and nature still remains unclear – cellular complexity of endometrium, its hormone-dependence and cycling remodeling makes the study of endometrial stem cells exclusively complicated [2]. The following questions are still left actual and unanswered – and yet, how many different stem cell / progenitor cell types exist in the human endometrium? Is there any unique, singular “mother” endometrial stem cell, or the endometrial stem cells originally include the epithelial, stromal and endothelial stem cells in their clones? [1]

Consequently, the detection of endometrial stem cells and identification of their location in the complex cellular hierarchy still remains challenging [14]. Further study of endometrial stem cells will clarify their role in gynecologic pathologies associated with hyperproliferative states of endometrium [3]. This will not only improve the understanding of pathogenesis of such conditions as endometrial hyperplasia, endometriosis/adenomyosis, endometrial carcinoma, but also will greatly support to the development of new treatment approaches and strategies for these conditions, using the direct targeted therapeutic agents [12,15].

Chan et al. [2] have identified the clonogenic epithelial and stromal cells as first candidates for endometrial stem cells. Epithelial clonogenic cells were differentiating into wide glandular structures in vitro, while the singular stromal clonogenic cells showed multilinear differentiation in 4 mesodermal lines (adipocytes, chondrocytes, osteocytes and smooth muscle myocytes). Masunda et al. [12,13] provided the first marker set CD146+, PDGF-R $\beta$ +(platelet-derived growth factor receptor beta) for identification of clonogenic, multipotent stromal stem cells (MSCs), which are localized in perivascular space in both basal and functional layer of endometrium and are able to undergo mesenchymal multilinear differentiation. Kiesel et al. [7] demonstrated that endometrial stem cell population is markedly increased in proliferative phase of menstrual cycle (approximately 5.1% of total cell amount in normal endometrium), compared with secretory phase, which must be resulted from proliferative effect of estradiol in pre-ovulatory phase.

It was found out that namely endometrial stem cells have especially high proliferative capacity and can preserve totally stable karyotype even after 40-times division, whereas the mean time for their division is 20 hours, being two times lower than the division time index for bone marrow stem cells. [17,18] Their retrieval is much less invasive and therefore, they carry the potential for becoming powerful instrument both in clinical-diagnostic as well as therapeutic tools, in addition they can play important role in tissue regeneration and reconstructive therapy [16]. Taking into account all of the above mentioned, we think it would be very interesting to detect the relationship between stem cell distribution specificities and proliferative activity under the age norm and endometrial hyperplasia, which could become one of the possible assisting diagnostic criterion in morphology diagnostic algorithm.

The aim of our study was to explore the age-related specificities of endometrial proliferative/stem cell index distribution under normal and hyperplasia conditions.

**Material and methods.** The study represents a retrospective research. The coded and depersonalized

material data from Acad. N. Kipshidze Central University Clinic was used in the study. 2 study groups: 1<sup>st</sup> “Norm” (1.1 Reproductive age 15-44 years [WHO Women Health, Fact Sheet №3346 Updated September 2013]; 1.2 Menopause age 45-55 years; 1.3 Post menopause age 56 and more years) and 2<sup>nd</sup> “Endometrial Hyperplasia” condition (2.1 Reproductive age 15-44 years; 2.2 Menopause age 45-55 years; 2.3 Post menopause age 56 and more years) were selected from routine histopathologic tissue specimens of uterus. Hematoxylin-eosin technology and immunohistochemistry with proliferation marker ki67 (K2 bond RTU primary, Novocastra) and stem cell marker CD146 (rabbit polyclonal antibody, MUC18, Zytomed Systems GmbH) was performed in the study on 4 $\mu$ m sections of formalin fixed, paraffin embedded tissue samples. Following deparaffinization and rehydration of the tissues sections, antigen retrieval was performed at 100°C for 20 minutes with Tris-EDTA buffer, pH 6.0. Endogenous peroxidase was blocked with 3% peroxide for 5 minutes. Primary antibody detection was carried out using a polymer system (Bond Polymer Refine Detection, Leica). Staining development was achieved by incubation with DAB Enhancer (Leica).

The results of immunohistochemistry studies were evaluated by standard scheme, namely, by counting percentage of positive cell numbers in 20 randomly selected big magnification visual fields. Proliferative/stem cell index was calculated by the ratio of Ki67-positive cell percentage value divided by CD146-positive cell percentage value.

Quantitative data retrieved in the study was treated by Pearson’s correlation and X<sup>2</sup> test. Statistical analysis of acquired quantitative data was performed by use of SPSS V.19.0 program. The confidence interval of 95% was considered as statistically significant.

**Results and their discussion.** The study showed that in the 1<sup>st</sup> study group labeled as “Norm”, the proliferative/stem cell index ranges between 8 and 16.5. Its mean average value in the age distribution subgroups accounts for: 1.1) reproductive age – 10.6; 1.2) menopause – 4.5; 1.3) post-menopause – 1. Proliferative/stem cell index reaches its maximum in the samples retrieved from proliferation phase of menstrual cycle from reproductive age individuals, while in post-menopause age it decreases significantly and almost equals to 1.

In the 2<sup>nd</sup> study group labeled as “Endometrial Hyperplasia”, the proliferative/stem cell index markedly increases and ranges within the interval 15-23. Its mean average value in the age distribution subgroups accounts for: 2.1) reproductive age – 18; 2.2) menopause – 18.2; 2.3) post-menopause – 18.5. We should especially take into account the fact that proliferative/stem cell index in case of endometrial hyperplasia cases tends to increase with age, in contrast with the norm, where it is observed to progressively decrease with aging.



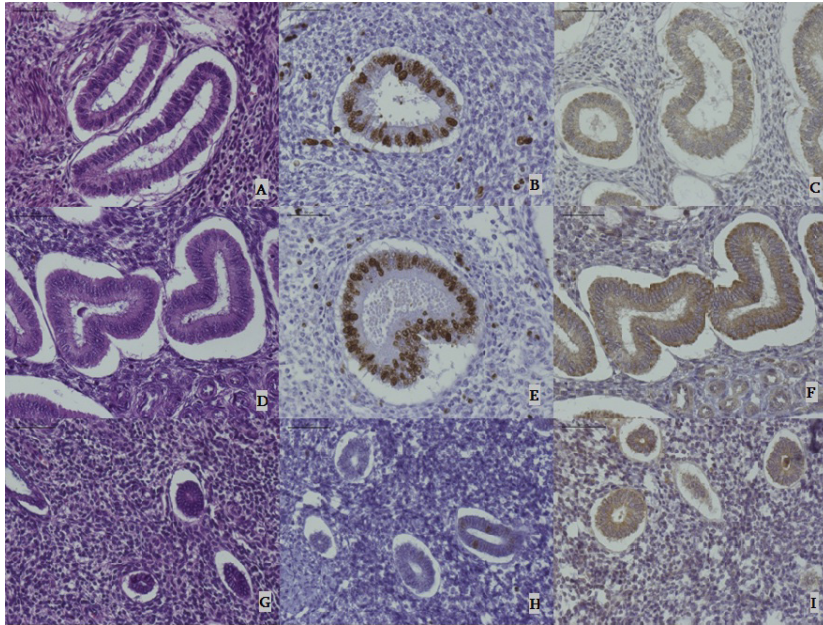


Fig. 1. 1<sup>st</sup> study group: A,D,G-HEX400, B,E,H-IHC(ki67)X400,C,F,I-IHC(CD146)X400;  
A,B,C-PR/ST IND-15; D,E,F-PR/ST IND-10; G,H,I-PR/ST IND-1

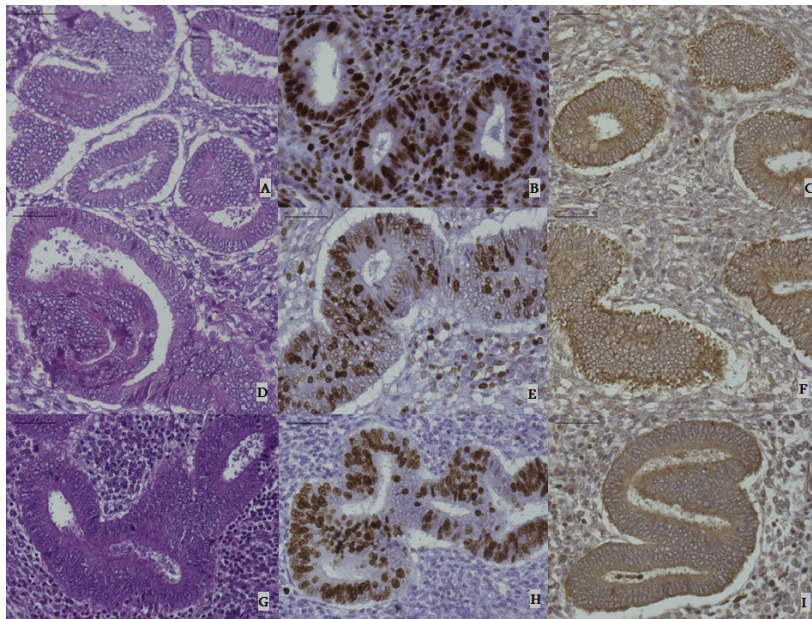


Fig. 2. 2<sup>nd</sup> study group: A,D,G-HEX400, B,E,H-IHC(ki67)X400,C,F,I-IHC(CD146)X400;  
A,B,C-PR/ST IND-17; D,E,F-PR/ST IND-18; G,H,I-PR/ST IND-20

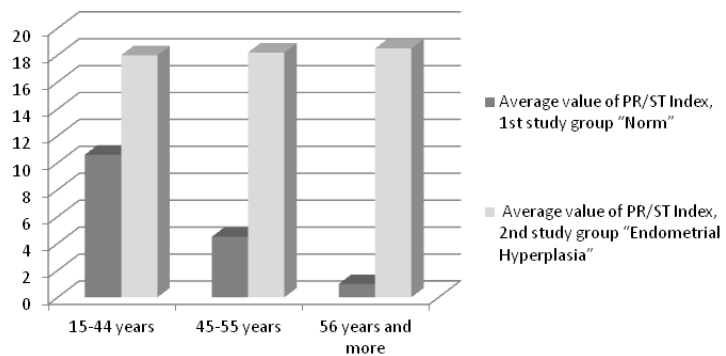


Diagram. Endometrial proliferative/stem cell index distribution under normal and hyperplasia conditions

**Conclusions.** It was found that proliferative/stem cell index in the 1<sup>st</sup> study group labeled as “norm” progressively decreases with aging, while in the 2<sup>nd</sup> study group labeled as “endometrial hyperplasia” it behaves opposite and increases with age. Moreover, it must be noted that proliferative/stem cell index in endometrial hyperplasia cases with regard to norm increases significantly, namely in the subgroups 1.1/1.2 (which is reproductive age) it increases 1.5 times, and in the subgroups 1.2/2.2 (which is menopause age) it increases 2.5 times, while in the subgroups 1.3/2.3 (which is post-menopause age) it increases 18.5 times. The high attention should be given to the fact that the mean average value of proliferative/stem cell index in endometrial hyperplasia most markedly differs from the norm in post-menopause period.

Project was supported by scientific grant PhDF2016\_42 for PhD scholarships of Shota Rustaveli National Science Foundation.

## REFERENCES

1. Allickson JG, Sanchez A, Yefimenko N, Borlongan CV, Sanberg PR. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood // *Open Stem Cell J.* 2011; 3(2011):4-10.
2. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE: Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells // *Biol Reprod* 2004, 70:1738-1750.
3. Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D, Stamenova M, Shterev A, Kostova P, Zlatkov V, Kehayov I, Kyurkchiev S: Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium // *Reproduction* 2008, 135:551-558.
4. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D: Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium // *Biol Reprod* 2009, 80:1136-1145.
5. Gargett CE, Nguyen HP, Ye L Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells // *Rev Endocr Metab Disord.* 2012 Dec; 13(4):235-51.
6. Gargett CE: Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells // *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006, 46:250-253.
7. Götte, L. Kiesel J Endocrine Aspects of Endometrial Stem Cell Function in Reproductive-Age Women // *Reproduktionsmed Endokrinol* 2013; 10 (Special Issue 1).
8. Janzen DM1, Cheng D, Schafenacker AM, Paik DY, Goldstein AS, Witte ON, Jaroszewicz A, Pellegrini M, Memarzadeh S. Estrogen and progesterone together expand murine endometrial epithelial progenitor cells // *Stem Cells.* 2013 Apr;31(4):808-22.
9. Kaitu'u-Lino, TJ, Ye, L., Gargett, CE (2010). Re-epithelialization of the uterine surface arises from endometrial glands - evidence from a functional mouse model of breakdown and repair // *Endocrinol* 151:3386-95.
10. Kato Kiyoko Stem cells in human normal endometrium and endometrial cancer cells: Characterization of side population cells // *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, January 25, 2012 Vol. 28, Issue 2, 63–71.
11. López A, Valdez-Morales FJ, Benítez-Bribiesca L, Cerbón M, Carrancá AG. Normal and cancer stem cells of the human female reproductive system // *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013; 11:53.
12. Masuda H1, Anwar SS, Bühring HJ, Rao JR, Gargett CE. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells // *Cell Transplant.* 2012;21(10):2201-14.
13. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, et al.: Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration // *PLoS One* 2010, 5:e10387.
14. Mirantes C1, Espinosa I, Ferrer I, Dolcet X, Prat J, Matias-Guiu X. Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer // *Hum Pathol.* 2013 Oct;44(10):1973-81.
15. Schuring AN, Schulte N, Kelsch R, Ropke A, Kiesel L, Gotte M: Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics // *Fertil Steril* 2011, 95:423-426.
16. Schwab KE, Gargett CE: Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium // *Hum Reprod* 2007, 22:2903-2911.
17. Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE: Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells // *Hum Reprod* 2008, 23:934-943.
18. Yanping Xu, Huiting Zhu, Dongni Zhao, and Jichun Tan. Endometrial stem cells: clinical application and pathological roles // *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(12).

## SUMMARY

### AGE-RELATED SPECIFICITIES OF ENDOMETRIAL PROLIFERATION/STEM CELL INDEX DISTRIBUTION

**Kikalishvili N., Beriashvili R., Muzashvili T., Burkadze G.**

*Tbilisi State Medical University, Georgia*

Endometrial stem cells take the special place among somatic stem cells of female reproductive system, since their essence and nature still remains unclear – cellular complexity of endometrium, its hormone-dependence and cycling remodeling makes the study of endometrial stem cells exclusively complicated. Consequently, the detection of endometrial stem cells and identification of their location in the complex cellular hierarchy still remains challenging. The aim of our study was to explore the age-related specificities of endometrial proliferative / stem cell index distribution under normal and hyperplasia conditions. The study represents a retrospective research. The coded and depersonalized material data from Acad. N. Kipshidze Central University Clinic was used in the

study. 2 study groups - 1<sup>st</sup> study group “Norm” (12 cases) and 2<sup>nd</sup> study group “Endometrial Hyperplasia” condition (18 cases) were selected from routine histopathology tissue specimens of uterus. Hematoxylin-eosin technology and immunohistochemistry with proliferation marker Ki67 and stem cell marker CD146 was performed. The proliferative/stem cell index was calculated by the ratio of Ki67-positive cell percentage value divided by CD146-positive cell percentage value. The study showed that in the 1<sup>st</sup> study group labeled as “norm”, the proliferative/stem cell index ranges between 8 and 16.5. Its mean average value in the age distribution subgroups accounts for: 1.1) reproductive age – 10.6; 1.2) menopause – 4.5; 1.3) post-menopause – 1. In the 2<sup>nd</sup> study group labeled as “endometrial hyperplasia”, the proliferative/stem cell index markedly increases and ranges within the interval 15-23. Its mean average value in the age distribution subgroups accounts for: 2.1) reproductive age – 18; 2.2) menopause – 18.2; 2.3) post-menopause – 18.5. It was found that proliferative/stem cell index in the 1st study group labeled as “Norm” progressively decreases with aging, while in the 2<sup>nd</sup> study group labeled as “Endometrial Hyperplasia” it behaves opposite and increases with age. Moreover, it must be noted that proliferative/stem cell index in endometrial hyperplasia cases with regard to norm increases significantly, namely in the subgroups 1.1/1.2 (which is reproductive age) it increases 1.5 times, and in the subgroups 1.2/2.2 (which is menopause age) it increases 2.5 times, while in the subgroups 1.3/2.3 (which is post-menopause age) it increases 18.5 times. The high attention should be given to the fact that the mean average value of proliferative/stem cell index in endometrial hyperplasia most markedly differs from the norm in post-menopause period.

**Keywords:** stem cells, endometrial hyperplasia, proliferative/stem cell index.

## РЕЗЮМЕ

### ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНО/СТВОЛОВОКЛЕТОЧНОГО ИНДЕКСА ЭНДОМЕТРИЯ

Кикалишвили Н.О., Бериашвили Р.В.,  
Музашвили Т.З, Буркадзе Г.М.

*Тбилисский государственный медицинский университет, Грузия*

На базе архивных материалов Центральной университетской клиники им. Н. Кипшидзе проведено ретроспективное, неперсонифицированное исследование и на основании данных рутинных гистопатологических обследований матки выделены 2 группы: I группа - норма (12 случаев), II группа - гиперплазия эндометрия (18 случаев) с тремя подгруппами (-.1 репродуктивный возраст, -.2 менопауза, -.3 постменопауза). Проведено иммуногистохимическое исследование с использованием

пролиферативного маркера Ki-67 и маркера стволовых клеток CD146. Пролиферативно/стволовоклеточный индекс эндометрия рассчитывался соотношением процентного показателя Ki-67-позитивных клеток с таковым CD146-позитивных клеток.

Пролиферативно/стволовоклеточный индекс эндометрия в I группе колебался в пределах от 8 до 16,5, среднее его значение по подгруппам составило: репродуктивный возраст – 10.6; группа менопаузы – 4,5, группа постменопаузы - 1. Пролиферативно/стволовоклеточный индекс эндометрия во II группе значительно увеличился, варьируя в пределах от 15 до 23, среднее значение по подгруппам составило: репродуктивный возраст – 18, группа менопаузы – 18.2, группа постменопаузы – 18.5.

В ходе проведенного исследования выявлено, что значение пролиферативно/стволовоклеточного индекса эндометрия в I группе с увеличением возраста прогрессивно уменьшается, а во II группе, наоборот, возрастет. Следует отметить, что значение пролиферативно/стволовоклеточного индекса эндометрия в условиях гиперплазии эндометрия в сравнении с нормой значительно увеличивается в репродуктивном возрасте в 1,5 раза, в группе менопаузы - в 2,5 раза, а в группе постменопаузы - в 18,5 раза. Разница между показателями пролиферативно/стволовоклеточного индекса в норме и при гиперплазии особенно ярко выражена в период постменопаузы.

## რეზიუმე

ენდომეტრიუმის პროლიფერაციულ/ღეროვანუჯრედოვანი ინდექსის განაწილების ასაკობრივი თავისებურებანი

ნ. კიკალიშვილი, რ. ბერიაშვილი, თ. მუზაშვილი,  
გ. ბურკაძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, საქართველო

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ენდომეტრიუმის პროლიფერაციულ/ღეროვანუჯრედოვანი ინდექსის (პღუი) ასაკობრივი თავისებურებების შეფასება ნორმისა და ჰიპერპლაზიის პირობებში.

ჩატარებულია რეტროსპექტიული, არაპერსონიფიცირებული კვლევა. შესწავლილია აკად. ნ. ყიფშიძის სახ. ცენტრალური საუნივერსიტეტო კლინიკის სარქივო მასალა. საშვილოსნოს რუტინული ჰისტოპათოლოგიური გამოკვლევებიდან შერჩეულ იქნა 2 საკვლევი ჯგუფი: I - ნორმა (12 შემთხვევა), II - ენდომეტრიუმის ჰიპერპლაზია (18 შემთხვევა). თითოეულში გამოიყო სამი ასაკობრივი ქვეჯგუფი: რეპროდუქციული, მენოპაუზის და პოსტმენოპაუზის. იმუნოჰისტოქიმიური კვლევისათვის გამოყენებული იყო პროლიფერაციის მარკერი Ki-67 და ღეროვანი უჯრედების მარკერი

CD146. პლუი განისაზღვრა Ki-67-პოზიტიური უჯრედების პროცენტული მაჩვენებლის შეფარდებით CD146-პოზიტიური უჯრედების პროცენტულ მაჩვენებელთან.

პლუი-ის მაჩვენებელი I საკვლევე ჯგუფში მერყეობდა 8-დან 15-მდე. მისი საშუალო მნიშვნელობა ასაკობრივი განაწილების მიხედვით ქვეჯგუფებში შეადგენს: რეპროდუქციული ასაკის ჯგუფში – 10.6, მენოპაუზის – 4.5, პოსტმენოპაუზისა – 1. პლუი-ის მაჩვენებელი II საკვლევე ჯგუფში მნიშვნელოვნად მომატებულია და მერყეობს 15-23-ის ფარგლებში. მისი საშუალო მნიშვნელობა ასაკობრივი განაწილების მიხედ-

ვით ქვეჯგუფებში ასეთია: რეპროდუქციულ ასაკში – 18, მენოპაუზის ჯგუფში – 18.2, პოსტმენოპაუზისა – 18.5.

დადგენილია, რომ პლუი-ის მაჩვენებელი I საკვლევე ჯგუფში ასაკის მატებასთან ერთად პროგრესულად მცირდება, ხოლო II საკვლევე ჯგუფში პირიქით - ასაკის მატებასთან ერთად მატულობს; კერძოდ, რეპროდუქციულ ასაკში გაიზარდა 1.5-ჯერ, მენოპაუზის ასაკში – 2.5-ჯერ, პოსტმენოპაუზის ასაკში - 18.5-ჯერ. პლუი-ის საშუალო მაჩვენებელი ენდომეტრიუმის ჰიპერპლაზიის დროს ნორმისგან ყველაზე მკვეთრად განსხვავდება პოსტმენოპაუზის პერიოდში.

## DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF RATS' ADENOHYPOPHYSIS IN BURN DISEASE

Kovalchuk O., Cherkasov E., Dzevulska I., Kaminsky R., Korsak A., Sokurenko L.

*Bogomolets National medical university, Kyiv, Ukraine*

Burn disease is one of the most prominent pathological lesions which causes severe stress for the body. On the background of this injury develops dysfunction of each body system caused by the influence of imbalance of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. This imbalance is expressed by acute reactions to skin burns such as activation of catecholamines, glucocorticoids and glucagon [7]. The pituitary gland responds to a number of stimuli by feedback mechanisms that may have both negative and adaptive (positive) effect.

Despite data on pituitary gland functioning peculiarities in different periods of burn disease, obtained by researchers with different methods, intracellular pathogenic mechanisms of disorders of the body at different stages of the thermal skin damage remain unclear [5,10,11]. Lack of pituitary research at burn disease with usage of DNA cytometry attracts attention. DNA cytometry is the most accurate way to detect changes in the function of cells, especially synthetic processes and apoptosis [13].

Aim of the work - determination of the cell cycle peculiarities and DNA fragmentation in adenohypophysis cells and their morphological features in 7-14, 21-30 days after second-third degree skin burns under the conditions of usage of 0.9% NaCl solution during first 7 days of intravenous infusion.

**Material and methods.** The research was conducted on 120 male Wistar rats that weigh in the range of 160-180 g. The animals under studies were kept in vivarium conditions on a standardized diet with drinking tap water ad libitum. The experiment was conducted in accordance to European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.

Committee of bioethics of Bogomolets National medical university, Kyiv, Ukraine found that the studies are not contrary to the fundamental bioethical standards of the Helsinki Declaration, the European Convention on Human Rights and Biomedicine (1977), the relevant provisions of the WHO and the laws of Ukraine.

There were defining features of structural change, indicators of cell cycle of rats' adenohypophysis cells with and without skin after burn injuries in 7 - 14 and 21-30 day [2] and given its correction of 0.9% NaCl solution. The first administration was done in one hour after modeling of the pathological condition; the following infusions were performed once a day during 7 days.

The experimental animals were divided into 3 groups with 15 animals in each group: Group I – intact animals; Group II – rats without thermal injury, administered with 10 ml/kg of 0,9% NaCl solution, Group III – animals with the burn, administered with 10 ml/kg of 0,9% NaCl solution.

*Anesthesia.* Shaving animals, causing burns, vessels catheterization, euthanasia of animals were carried out under conditions of intravenous anesthesia, with 6 mg of propofol per 100 g of animal.

The manipulations were performed according to all bioethical norms and rules of the "Regulations on the animal use in biomedical research", "European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes", "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

*Thermal injury.* After premedication according to burn injury modeling procedure [4], all rats had hair removed on side surfaces of the body with mechanical machine and a safety razor. Burn trauma of skin was per-

formed by applying to the side surfaces of animal body of four copper plates (two plates on each side), which were previously held for 6 minutes in water at a constant temperature of 100<sup>0</sup> C. The surface area of each copper plate was equal to 13.86 cm<sup>2</sup>.

Total area of skin burns in rats was 21-23% of body surface, exposure was 10 seconds, which is quite sufficient to form a second degree burn - superficial dermal burns (former A third degree) and development of mean severity of shock [1].

*Histological analysis.* In euthanized animals we performed section of cranial cavity and using razor took small pieces of anterior pituitary – adenohypophysis. Tissue blocks were fixed in 10% neutral formaldehyde solution. After fixing material was washed, dehydrated in series of increasing ethanol concentration, was carried through chloroform and put into paraplast. Histological sections of the body thickness of 5.6 mm were prepared on a rotary microtome, placed on subject glass, stained with hematoxylin and eosin and aldehyde-fuchsine by Gomori, than put in Canada balsam. Semi-thin sections were prepared on ultramicrotome LKB-3 (Sweden) and stained with methylene blue. Histological, morphometric studies and photographs of histological preparations and semi-thin sections were performed on Olympus microscope BX51 having appropriate software.

*Electron microscopy.* Ultrathin slices were prepared in the “LKB” ultramicrotome, analyzed and photographed on PEM-125K electron microscope. Semi-thin slices were stained with toluidine and methylene blue, analyzed and photographed, using Olympus BX51 microscope. The experiment was carried out on the basis of the Research Center at Pirogov Vinnitsa National Medical University. Electron microscope analysis was made on the basis of the Department of Electron Microscopy (supervisor, Professor L.A. Stechenko) at the Institute of Pathology Problems at Bogomolets National Medical University.

*DNA Cytometry.* Suspensions of rats' adenohypophysis cell nuclei were obtained using a special solution for the study of nuclear DNA CyStain DNA (Partec, Germany) according to the protocol-instruction from the manufacturer. Flow analysis was performed on the multifunctional cytometer «Partec PAS» (Partec, Germany) in Pirogov Vinnitsa National Medical University Research Center. Ultraviolet radiation was used for DAPI fluorescence excitation. From each sample of the nuclear suspension 20 thousands of events were analyzed. With the software FloMax (Partec, Germany) cyclical analysis of cells was conducted in full digital accordance to a mathematical model that included the definition of the following indicators:

- G0G1 - the percentage of cells in G0G1 phase to all cells of the cell cycle (DNA content = 2 c);
- S - percentage of DNA-synthesis phase to all cells of the cell cycle (DNA content > 2 and c < 4 c);

Determination of DNA fragmentation (apoptosis) was conducted by allocating SUB-G0G1 sites on DNA histogram RN1 before G0G1 peak, which indicates cell nuclei containing DNA < 2 c.

*Statistical analysis.* Statistical analysis of the results conducted in the package “STATISTICA 5,5” (belongs to Pirogov Vinnitsa National Medical University, license number AXX R 910A374605FA) using parametric and nonparametric methods. Statistical significance of differences between independent quantitative values that were obtained during the execution of the thesis was evaluated in the case of normal distribution by Student's test, in other cases - through U-Mann-Whitney criterion.

**Results and their discussion.** Structural features of microcirculatory changes were observed in the adenohypophysis parenchyma in the period of 7 and 14 days after the burn injuries of the skin. Hemodynamic violations in the form of stasis and thrombosis of blood cells, partial destruction of the vascular wall of blood capillaries and venues were marked, resulting in the development of perivascular edema and appearance of hemorrhage. Also, signs of region hemodynamic changes coincided with the emergence of structural evidence of spoiled energy and protein synthesis function of endocrinocytes. Due to the destruction of organelles appropriate secretory activity of most endocrinocytes has to decline that generally indicates the inhibition of synthetic processes in the cells.

Results of the DNA cytometry, applied for the first time to study adenohypophysis in rats with burn injuries, suggest that using 0.9% NaCl solution inhibited synthetic processes that manifest in values of S-phase index in 7 days (0,374 ± 0,030%) (Table).

In 14 days after skin burn injury values of the S-phase index 1,186 ± 0,215% (p < 0.01) are almost twice higher than of animals from the control group. SUB-G0G1 interval indicators gradually increase almost in a quarter in 7 days (0,918 ± 0,167%, p < 0.01), reaching a peak in 14 days (1,114 ± 0,199%, p < 0.01). The data is likely to show both the development of compensatory responses and continued pathological effects of burn injuries of the skin, which are fixed at the biochemical and histological levels by other researchers [5].

In 21- and 30-day terms after the burn injuries of the skin histological examination of adenohypophysis against the destruction of the walls of blood capillaries, endothelial desquamation in vascular lumen and development of paravasal hemorrhage (Fig. 1) effects of degenerative changes in endocrinocytes are found.

Cells with vacuoles and strong enlightened cytoplasm were observed on semi-thin sections as well as cell with signs of necrosis; a distinct dilation of blood capillaries, erythrocyte sludge, perivascular swelling and karyopyknosis in some endocrinocytes were also marked (Fig. 2).

Table. Cell cycle index changes of adenohypophysis cells in rats without and after skin burn injuries alongside the administration of 0.9% NaCl solution

Group	Day	Cell cycle index (%)	
		S	SUB-G0G1
II	7	0,518±0,066	0,548±0,118
	14	0,550±0,090	0,540±0,083
	21	0,568±0,101	0,590±0,108
	30	0,528±0,084	0,568±0,052
III	7	0,374±0,030 <sup>1</sup>	0,918±0,167 <sup>1</sup>
	14	1,186±0,215 <sup>1</sup>	1,114±0,199 <sup>1</sup>
	21	1,734±0,399 <sup>1</sup>	0,976±0,193 <sup>1</sup>
	30	1,036±0,093 <sup>1</sup>	0,792±0,169

notes: <sup>1</sup> – statistically significant differences compared to the II group without burn injuries ( $p \leq 0.01$ )

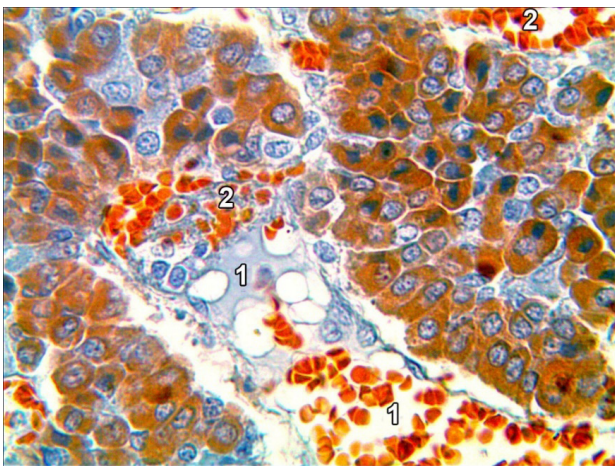


Fig. 1. Histological features of rat adenohypophysis from group with burn injuries of skin and NaCl solution in 21 days. The destruction of the walls of blood capillary, desquamation of endothelial cells in the vascular lumen (1), the development of paravasal hemorrhage (2). Aldehyde-fuchsin by Gomori. X200

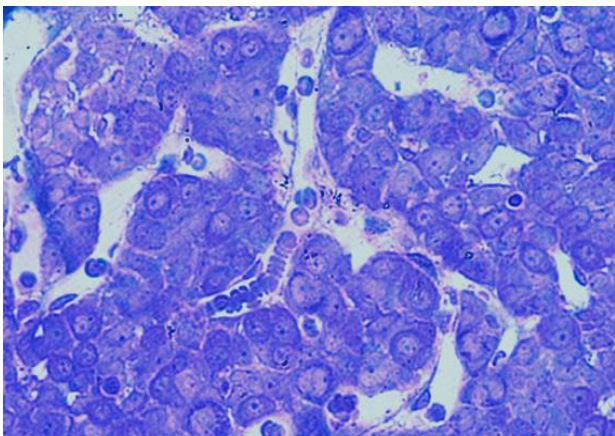


Fig. 2. Adenohypophysis histological changes in rat from the III group with burn injuries of skin and NaCl solution in 21 days. Semi-thin slice. Methylene blue. X200

Microcirculation changes were manifested in

expressed dilation and stasis of blood capillaries, the development of perivascular edema and in some areas - interstitial edema. Fenestrated blood capillaries with signs of endothelium deformation but without stasis of blood cells in their lumen and manifestations of angio-necrosis were identified.

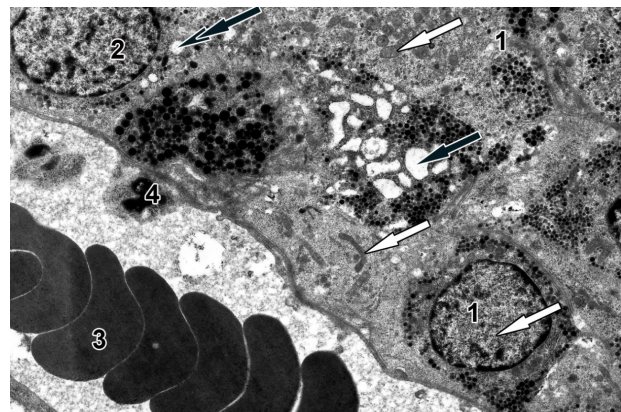


Fig. 3. Adenohypophysis electronmicroscopy changes in rat from the III group with burn injuries of skin and NaCl solution in 21 days. Erythrocyte stasis in the blood capillary. 1 - non-changed gonadotropocytes; 2 - somatotropocyte; 3 - sludge of erythrocytes; 4 - platelets; black arrow - expanding tubular endoplasmic reticulum; white arrow - intact mitochondria; double black arrow - swelling of mitochondria. X11000

The value of the S-phase index after burn injuries of skin and using 0.9% NaCl solution reaches a maximum in 21 days ( $1,734 \pm 0,399\%$ ), and in 30 days this index decreases to  $1,036 \pm 0,093\%$  ( $p < 0.01$ ) staying higher than the level recorded in the control group of rats. At this time indexes gradually decrease without reaching the level that was registered against infusion of 0.9% NaCl solution in the control animals (under  $0,976 \pm 0,193\%$ ,  $p < 0.01$ , and  $0,792 \pm 0,169\%$   $p = 0,076$  respectively). During this period, according to other researchers [3], hyperactivity of the adrenal glands

under lower tropic hormones of the adenohipophysis is marked, that probably indicates the recovery of receptor sensitivity of cells to glucocorticoids, and is a sign of gradual normalization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning.

The violation of the cell cycle and DNA fragmentation correlate with clinical signs of burn disease recorded by many researchers and indicate, in their view, the dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal system [5].

L. Palmieri et al. [9] found increased level of adrenocorticotrophic hormone within 24 hours after burn injuries, as well as a strong correlation between adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels. The researchers have also found significant correlation between levels of arginine-vasopressin and glucocorticoids, which indicates the role of this hormone in raising of corticosteroids level, which in its turn may increase the damaging effect of adrenocorticotrophic hormone stimulation.

It should also be noted that the level of various hormones of adenohipophysis against the burn disease, both in experimental and clinical studies, has been very individual indicator, that reflects, according to the researchers, spare capacities of the organism as a whole and adenohipophysis in particular [12] and indicates the degree of damage and the adaptive capacity of this organ.

**Conclusion.** So, on a 7-14 day maximal increase of cytoplasm and nucleus volume and richness of the cells with organelles were discovered for adenohipophysis corticotropocytes, thyrotrophocytes and somatotrophocytes. However, signs of plasmatic, nuclear and organelle membranes destruction increased.

In the period of 21-30 days after thermal skin injury destruction of membrane component increased, intracellular regeneration was inhibited, deep dystrophic and necrobiotic changes developed in pituitary cells.

Infusion of 0.9% NaCl solution is a good option for controlling the influence of components of complex colloidal hyperosmolar solutions on the adenohipophysis structure, when such factors of general impact as a way of infusion, volume of introduced substances and time parameters of their administration are excluded.

## REFERENCES

1. Гунас І. В., і соавт. Наслідки впливу опіку шкіри на показники клітинного циклу клітин тимусу та їх корекція лактопротеїном з сорбітоломабо НАЕС-LX-5%. *Biomedical and biosocial anthropology* 2012; 19:135–41.
2. Шано ВП, Гринь ВК., Э. Я. Фисталь и др. Ожоговый шок / – Донецк, Юго–Восток, 2006. – 176 с.
3. Cohen J. et al. Measurement of tissue cortisol levels in patients with severe burns: a preliminary investigation. *Crit Care*. 2009; 13(6): 189.
4. Gunas I. Dovgan I., Masur O. Method of thermal burn trauma correction by means of cryoinfluence. *Verhandlungen*

gen der Anatomischen Gesellschaft. 1997; 24 (27): 105.

5. Jeschke M.G. et al. Inflammation and the Host Response to Injury Collaborative Research Program. Morbidity and survival probability in burn patients in modern burn care. *Crit. Care. Med*. 2015; 43(4): 808–815.
6. Jeschke M. G. et al. Pathophysiologic Response to Burns in the Elderly *EBioMedicine*. 2015; 2(10): 1536–1548. DOI:10.1016/j.ebiom.2015.07.040
7. Jones B. J., Tan T., Bloom S.R. Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology*. 2012; 153: 1049–1054.
8. Levy-Shraga Y., Pinhas-Hamiel O. Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency in Children. *Horm. Res. Paediatr*. 2013; 80: 309–317.
9. Palmieri T.L. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to sustained stress after major burn injury in children. *J. Burn Care Res*. 2006; 27(5):742–748.
10. Ponticorvo A. et al. Quantitative long-term measurements of burn scar model using Spatial Frequency Domain Imaging (SFDI) and Laser Speckle Imaging (LSI). *Lasers Surg Med*. 2017 Feb 21.
11. Ponticorvo A. et al. Quantitative assessment of graded burn wounds in a porcine model using spatial frequency domain imaging (SFDI) and laser speckle imaging (LSI). *Biomed Opt Express*. 2014 Oct 1; 5(10): 3467–3481.
12. Scotland P.E. et al. Endogenous Prolactin Generated During Peripheral Inflammation Contributes to Thermal Hyperalgesia. *The European journal of neuroscience*. 2011; 34(5): 745–754. DOI:10.1111/j.1460-9568.2011.07788.x.
13. Wlodkowic D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol*. 2011; 103: 55–98.

## SUMMARY

### DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF RATS' ADENOHYPHYPHYSIS IN BURN DISEASE

**Kovalchuk O., Cherkasov E., Dzevulska I., Kaminsky R., Korsak A., Sokurenko L.**

*Bogomolets National medical university, Kyiv, Ukraine*

The article presents data relating to structural changes in rat adenohipophysis in experimental burn disease and its treatment. Experimental studies were conducted for defining peculiarities of structural changes in rats' adenohipophysis without and after skin burn injuries (in 7-14 and 21-30 days) alongside its correction with 0.9% NaCl solution. Application of DNA-cytometry allowed defining subtle mechanisms of pathogenic influence of burn injuries on the organism in general and the cells in particular.

**Keywords:** adenohipophysis, burn disease, cytoprotection, DNA-cytometry, electron microscopy.

## РЕЗЮМЕ

### ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АДЕНОГИПОФИЗА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Ковальчук А.И., Черкасов Э.В., Дзевульская И.В., Каминский Р.Ф., Корсак А.В., Сокуренько Л.М.

*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев, Украина*

Представлены данные, касающиеся структурных изменений аденогипофиза крыс при экспериментальной ожоговой болезни. Проведены экспериментальные исследования по определению особенностей структурных изменений, показателей клеточного цикла клеток аденогипофиза крыс без и после ожоговой травмы кожи спустя 7-14, 21-30 суток и в условиях его коррекции 0,9% раствором NaCl.

Применение метода ДНК-цитометрии позволило установить тонкие механизмы патогенетического воздействия ожоговой болезни на организм в целом и на клетки в частности.

## რეზიუმე

ვირთავების ადენოჰიპოფიზის სტრუქტურული ცვლილების დინამიკა ექსპერიმენტული დამწვრობითი დაავადების დროს

ა. კოვალჩუკი, ე. ჩერკასოვი, ი. ძეველსკაია, რ. კამინსკი, ა. კორსაკი, ლ. სოკურენკო

ა. ბოგომოლცის სახ. ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, კიევი, უკრაინა

წარმოდგენილია მონაცემები ვირთავების ადენოჰიპოფიზის სტრუქტურული ცვლილების შესახებ ექსპერიმენტული დამწვრობითი დაავადების დროს. ჩატარებულია ექსპერიმენტული კვლევა ვირთავების ადენოჰიპოფიზის უჯრედების სტრუქტურული ცვლილებების და უჯრედული ციკლის თავისებურებების შეფასებისათვის დამწვრობის გარეშე, კანის დამწვრობითი ტრავმის შემდეგ მე-7-14, 21-30-ე დღის შემდეგ და მისი NaCl 0,9%-იანი ხსნარით კორექციის პირობებში. დნმ-ციტომეტრიის მეთოდის გამოყენებით ავტორების მიერ დადგენილია დამწვრობითი დაავადების პათოგენური ზემოქმედების ნატიფი მექანიზმები მთლიან ორგანიზმსა და ცალკეულ უჯრედზე.

### ДИНАМИКА ЭНТЕРОПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

<sup>1</sup>Койшибаев Ж.М., <sup>1</sup>Тургунов Е.М., <sup>2</sup>Сандблум Г., <sup>1</sup>Лавриненко А.В., <sup>1</sup>Жумакаев А.М.

<sup>1</sup>Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан;

<sup>2</sup>Госпиталь Каролинского университета, отделение хирургии, Стокгольм, Швеция

Острая кишечная непроходимость (ОКН) - синдромная категория, которая характеризуется нарушением пассажа кишечного содержимого в направлении от желудка к прямой кишке. Осложненное течение различных по этиологии заболеваний и патологических процессов, формируют морфологический субстрат острой кишечной непроходимости.

Миграция бактерий или их продуктов из просвета кишки в мезентериальные лимфоузлы, а затем во внекишечную среду (печень, почки, сердце, легкие, мозг и др. органы) контролируется физиологическими процессами здорового организма. В то же время, контроль над этими процессами прогрессивно нарушается при развитии многих заболеваний, в том числе, кишечной непроходимости. Неконтролируемая бактериемия или токсемия, в свою очередь, резко утяжеляет состояние и часто является основной

причиной развития органной дисфункции и летального исхода [8,11,12].

В патогенезе развития ОКН и ее осложнений значительную роль играет бактериальная транслокация [2].

Острая кишечная непроходимость неизбежно сопровождается избыточной бактериальной колонизацией (ИБК) тонкой кишки. Под синдромом ИБК понимают патологическое заселение тонкой кишки более стабильными и более разнообразными бактериальными популяциями, схожими по количественному и качественному составу с микрофлорой ободочной кишки и фекалий [7,3]. Бактериологические исследования больных с нарушенной моторной функцией тонкой кишки позволили выделить до 20 видов бактерий с диапазоном бактериальных концентраций от  $10^7$  до  $10^{12}$  КОЕ/мл [1]. Наряду с другими патогенетическими факторами ИБК играет значимую роль в нарушении барьерной



функций кишечной стенки при острой непроходимости тонкой кишки (ОНТК) и способствует транслокации бактерий и их токсинов из просвета кишечника во внутренние среды [7]. Интерес ученых к проблеме трансинтестинальной транслокации объясняется предполагаемой возможностью проникающих бактерий и токсинов вызывать септические осложнения [9].

Микроорганизмы, населяющие кишечник, находятся в постоянном взаимодействии между собой и между макроорганизмом. Эта сложившаяся система представляет собой некую экосистему, которая в условиях кишечной непроходимости нарушается. Эти нарушения можно представить в виде нескольких последовательных звеньев. В результате нарушения перистальтики содержимое кишечника «застаивается», что приводит:

1. К росту и размножению микроорганизмов.
2. К миграции микрофлоры, свойственной дистальным отделам кишечника, в проксимальные, для которых она является чужеродной.
3. Нарушению проницаемости кишечной стенки ввиду развивающейся циркуляторной гипоксии [5,10].

При энтероперитонеальной бактериальной транслокации (БТ) в кишечнике накапливается большое количество жидкости, поступающей в результате экскреции из крови. Всасывание ее из растянутого сегмента кишки прекращается, кишечное содержимое инфицируется кишечной микробной флорой, представляя источник токсинов.

В случае, когда внутрикишечное давление достигает уровня артериального давления, происходит нарушение микроциркуляции кишечной стенки и возникает ее гангрена. Вследствие резкого повышения проницаемости гангренозной кишечной стенки жидкость из просвета кишки попадает в брюшную полость [6].

В клинических условиях изучение БТ затруднено, поэтому возникает необходимость проведения различных медико-биологических экспериментов.

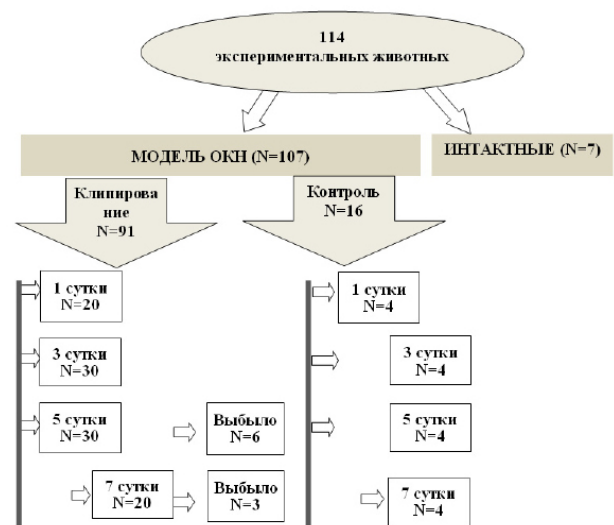
Изучение энтероперитонеальной транслокации возможно на модели ОКН, выполненной в асептических условиях, с минимальной инвазивностью и сохранением физической герметичности кишечной стенки на протяжении 5-7 суток.

Целью исследования явилось изучить динамику энтероперитонеальной транслокации бактерий на модели острой кишечной непроходимости у крыс.

**Материал и методы.** Исследование проводили на 114 половозрелых беспородных крысах (самцах), с массой 180-200 г. Животные наркотизировались путем инъекции кетамина в вену хвоста, в дозе, рассчитанной с учетом массы тела.

Животные разделены на 3 группы: I группа (n=7) – интактные крысы, II (n=16) – промежуточный контроль, животные, которым производилось вскрытие, участок тонкой кишки выводился из раны наружу и выполнялось ушивание брюшной полости. В зависимости от времени вскрытия, животные этой группы были разделены на 4 подгруппы (2А, 2Б, 2В, 2Г): вскры-

тие брюшной полости на первые сутки - подгруппа 2А (n=4), на третьи сутки - подгруппа 2Б (n=4), на пятые сутки - подгруппа 2В (n=4), на седьмые сутки - 2Г (n=4). III группа (n=91) - моделируется ОКН в «илеоцекальной области» тонкой кишки. В зависимости от времени вскрытия, животные этой группы также были разделены на 4 подгруппы (3А, 3Б, 3В, 3Г): вскрытие брюшной полости на первые сутки - подгруппа 3А (n=20), на третьи сутки - подгруппа 3Б (n=30), на пятые сутки - подгруппа 3В (n=24), на седьмые - подгруппа 3Г (n=17). Распределение животных на подгруппы в зависимости от времени вскрытия представлено на рис. 1.



Модель ОКН осуществляли по разработанной нами методике. Суть способа моделирования острой кишечной непроходимости в эксперименте – наложение клипсы на «илеоцекальный угол» тонкой кишки (Свидетельство о государственной регистрации прав на объект интеллектуальной собственности ИС 007385 от 15.02.2017) [4].

После обработки операционного поля, выполняется разрез в проекции правой боковой области живота, затем производится ревизия брюшной полости и определяется купол слепой кишки. Для моделирования кишечной непроходимости применен метод клипирования с использованием клипатора и пластиковых клипс (Hem-o-lok weck №544115) (рис. 2). Клипса накладывалась аподактильно на петлю тонкого кишечника в области илеоцекального угла слепой кишки.

Под микроскопическим увеличением зоны наложения клипсы, в области илеоцекального угла у крыс на первые и третьи сутки отсутствуют некротические изменения. Следовательно, транслокация бактерии происходит не через зону перфорации, а через биологически проницаемую и физически герметичную стенку кишки, т.е. происходит биологическая проницаемость микроорганизмов и колонизация брюшной полости.

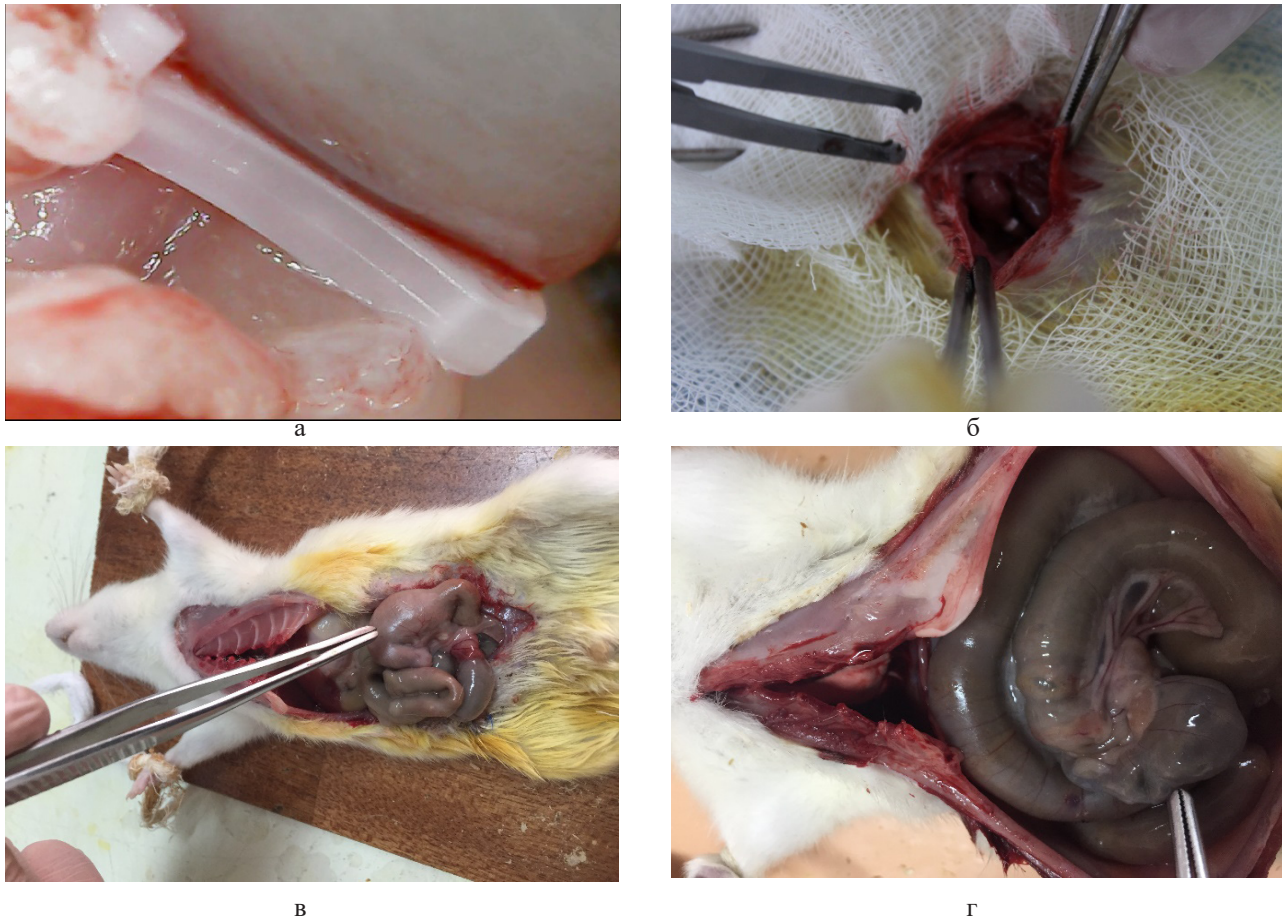


Рис. 2. Модель острой кишечной непроходимости

а - микроскопическое увеличение зоны наложения клипсы (300x); б - наложение клипсы аподактильно; в - третьи сутки после наложения клипсы; г - седьмые сутки после наложения клипсы

Интактные крысы были использованы для определения микрофлоры брюшной полости. Из 7 интактных крыс, ни в одном случае не было высева культур. Затем определяли микрофлору у крыс контрольной группы. У 16 крыс контрольной группы наблюдается отсутствие высева бактерий в брюшную полость, что объясняется отсутствием инфекции; эксперимент согласно нашей методике выполнен в стерильных условиях.

Материалом для микробиологического исследования являлся перитонеальный выпот и содержимое дистального отдела тонкой кишки над уровнем создания обструкции. В лабораторию материал доставляли с соблюдением температурного режима в течение одного часа. Первичный посев для высева аэробной культуры осуществляли бактериологической петлей  $d=2$  мм (0,005 мл) на кровяно-глюкозный агар методом секторных посевов. Температурный режим  $+37^{\circ}\text{C}$ , время инкубации – 3-4 суток. Количественный учет микроорганизмов производили путем подсчета количества выросших колоний в каждом секторе. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) рассчитывали по специальной таблице. Идентификация микроорганизмов проводилась методом MALDI-TOF с помощью масс-спектрометра Microflex (“Bruker

Daltonics”, Германия). При MALDI-TOF проводилось двукратное (дублированное) нанесение культуры, выросшей на кровяном агаре, на 96-клеточную стальную панель (“Bruker Daltonics”, Германия) с последующим высушиванием на воздухе. Затем добавляли 2 мкл матрицы: насыщенный раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50% ацетонитриле и 2,5% трифторуксусной кислоте («Bruker Daltonics”, Германия) и повторно подсушивали при комнатной температуре. Масс-спектры калибровались с использованием рибосомальных белков *Escherichia coli* (бактериальный стандарт). Белковые спектры оценивали посредством MALDI Biotyper (версия 3, “Bruker Daltonics”, Германия). Результаты выражали в виде оценочного коэффициента (score) в диапазоне от 0 до 3. При значениях score  $>1,7$  результат соответствует высокой степени достоверности идентификации до рода, а при значениях score  $>2,0$  — надежной идентификации до вида. В то же время значение score  $>1,7$  оценивается как минимальная величина оценочного коэффициента, требуемая для видовой идентификации. При значении score  $<1,7$  результат идентификации считали недостоверным и исследование повторяли.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась методами вариационной статистики с вычислением для каждого показателя средней величины (M), стандартного отклонения (SD) и дисперсии ( $\delta^2$ ). Достоверность различий в группах определяли посредством параметрических и непараметрических методов статистической оценки: критерий F однорангового дисперсионного анализа (ANOVA), критерий Пирсона  $\chi^2$ , критерий Краскела-Уоллеса для k-независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Статистический анализ проводился с использованием программы «SPSS Statistics 20.0».

Животных выводили из эксперимента путем обескровливания в состоянии наркоза в соответствии пункту М3.13.1 Руководства по эвтаназии животных Американской ассоциации ветеринаров “AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition”.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе эксперимента проведено 114 валидных исследований, из них контрольных - 16 (14,0%), интактных - 7 (6,1%), с созданием модели ОКН - 91 (79,8%), из эксперимента выбыло 9 животных, 6 из них умерли, у 3 животных ОКН не развилась.

В результате исследования содержимого дистального отдела тонкой кишки выше места обструкции из просвета кишки микробная культура высеяна у 111 (97,4%) из 114 крыс. Монокультура высеяна в 85 (76,6%) случаях из 111, по 2 микроорганизма в 26 (23,4%) наблюдениях, в 3 (2,7%) случаях высеяна ассоциация 3 бактерий. Из 140 определенных микроорганизмов преобладали грамотрицательные бактерии рода *Escherichia* – 71 (50,7%) и *Klebsiella* 41 (29,3%) (рис. 3).

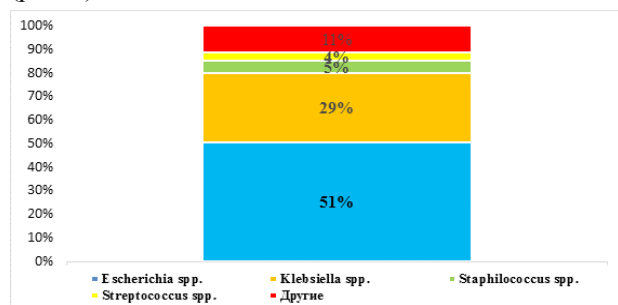


Рис. 3. Распределение микроорганизмов, высеянных из просвета кишечника

В посеве из просвета кишки 7 интактных крыс в 2 случаях роста микрофлоры не получено в остальных 5 случаях получен рост клостридий - 1, лактобактерий - 2 и стрептококков – 2 (рис. 4).

В контроле (лапаротомия без модели ОКН) у одной из 16 крыс роста микрофлоры не получено, у 15 крыс из просвета кишки получен рост 18 бактерий. Преобладала кишечная палочка 8 (44,4%) (рис. 5).

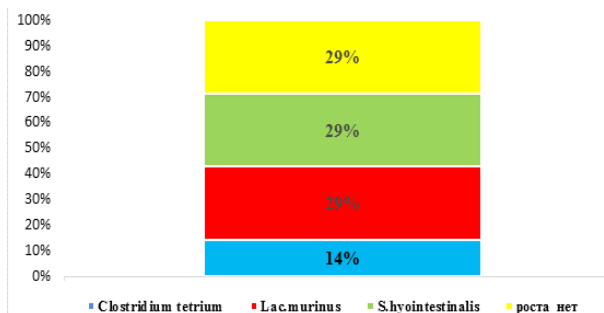


Рис. 4. Распределение микроорганизмов, высеянных из просвета кишечника, у интактных крыс

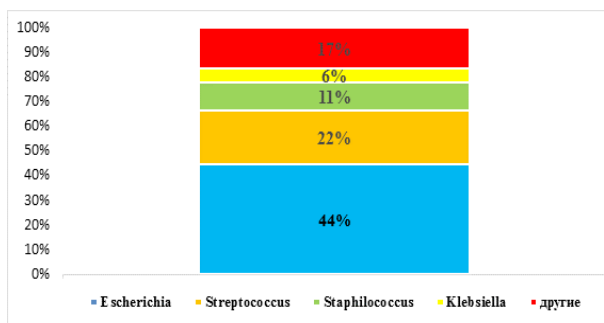


Рис. 5. Распределение микроорганизмов, высеянных из просвета кишечника, у крыс контрольной группы

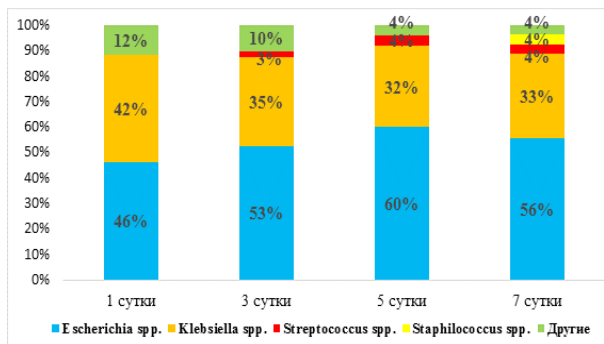


Рис. 6. Распределение микроорганизмов, высеянных из просвета кишечника, у группы крыс с ОКН на первые, третьи, пятые и седьмые сутки

На первые сутки развития ОКН у 20 крыс из просвета кишки выше места обструкции выявлена микрофлора - 25 различных микроорганизмов, в основном, грамотрицательных бактерий рода *Escherichia* и *Klebsiella*, составляющие вместе 88,5% всех обнаруженных микроорганизмов. На третьи сутки развития ОКН у 30 крыс из просвета кишки выше места обструкции выявлена микрофлора - в 10 случаях в ассоциациях, 40 различных микроорганизмов - преобладали грамотрицательные бактерии рода *Escherichia* (52,5%) и *Klebsiella* (35,0%). На 5 сутки развития ОКН у 24 крыс из просвета кишки выше места обструкции выявлена микрофлора: в 3 случаях в ассоциациях - 25 микроорганизмов, заметно преобладание грамотрицательных бактерий рода *Escherichia* (60,0%) и *Klebsiella* (32,0%). На 7 сутки развития ОКН у

Таблица 1. Показатели микроорганизмов, высеянных из брюшной полости

Микроорганизмы	абс.	%
Escherichia spp.	22	56,4
Klebsiella spp.	10	25,6
Streptococcus spp.	3	7,7
Другие	4	10,3
Всего	39	100,0

всех 17 крыс из просвета кишки выше места обструкции выявлена микрофлора, в 3 случаях в ассоциациях - 27 микроорганизмов, заметно преобладали грамотрицательные бактерии: Escherichia (60,0%) и Klebsiella (32,0%), грамположительные кокки - 7,4% (рис. 6).

Микробная культура в брюшной полости выделена у 34 (29,8%) из 114 крыс, причем в 5 (14,7%) наблюдениях - ассоциации 2 бактерий. Из 39 определенных микроорганизмов преобладали грамотрицательные бактерии рода Escherichia - 22 (56,4%) и Klebsiella - 10 (25,6%) (таблица 1).

В посеве из брюшной полости у 7 интактных крыс и у 16 крыс группы контроля роста микрофлоры не выявлено.

В группе с моделью ОКН на 1 сутки развития непроходимости в выпоте из брюшной полости получен рост микробов у 6 (30,0%) из 20 крыс, из них у 2 - в ассоциациях. Из 8 бактерий кишечная палочка выявлена в 4 случаях, клебсиелла, ацинетобактер, стафилококк и лактобацилла - по одному.

На 3 сутки развития ОКН в выпоте из брюшной полости получен рост микробов у 13 (43,3%) из 30 крыс, из них в 1 случае в ассоциации. Все 14 бактерий являются грамотрицательными: 57,1% - кишечная палочка и 42,9% - клебсиелла.

На 5 сутки развития ОКН в выпоте из брюшной полости получен рост микробов у 11 (45,8%) из 24 крыс, из них в 1 случае в ассоциации. Из 12 бактерий преобладала грамотрицательная флора: 58,3% - кишечная палочка и 16,7% - клебсиелла (рис. 7).

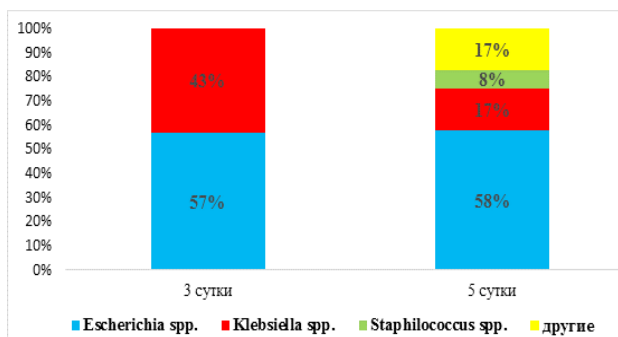


Рис. 7. Показатели микроорганизмов, высеянных из брюшной полости крыс группы с ОКН на третьи и пятые сутки

На седьмые сутки развития ОКН в выпоте из брюшной полости получен рост микробов у 4 (23,5%)

из 17 крыс, из них в 1 случае в ассоциации. Из 5 бактерий в 3 случаях - кишечная палочка, 1 - клебсиелла и в 1 - золотистый стафилококк.

По наличию микрофлоры в просвете кишечника значимых различий в группе интактных крыс, контроля и в группе ОКН не выявлено (рис. 8).

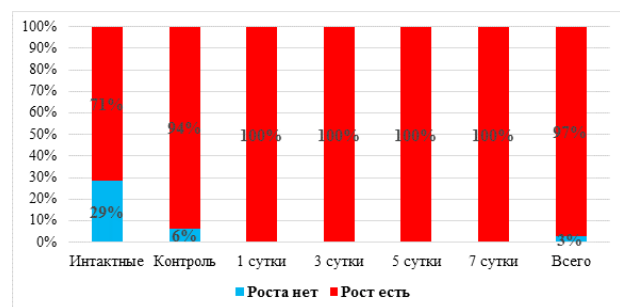


Рис. 8. Показатели роста микроорганизмов в просвете кишечника в группах

Исследование микрофлоры брюшной полости выявило высокий уровень энтероперитонеальной транслокации на третьи и пятые сутки - 43,3% и 45,8%, соответственно (рис. 9).

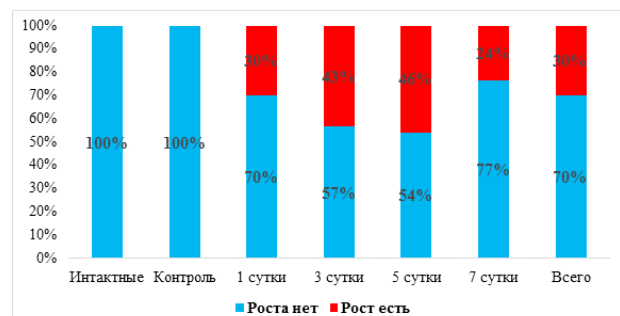


Рис. 9. Показатели роста микроорганизмов в брюшной полости в группах

Имеется статистически значимая разница ( $p=0,017$ ) в показателях микрофлоры в брюшной полости при ОКН в сравнении с контролем, а также в зависимости от длительности течения ОКН, что свидетельствует о наличии энтероперитонеальной транслокации (таблица 2).

Показатель микрофлоры в просвете кишки над уровнем обтурации при ОКН в сравнении с контролем резко возрастает на первые сутки, в среднем, с  $10^6$  до  $10^{10}$  и удерживается на уровне  $10^9$  на протяжении всего периода наблюдения (7 суток). Разница статистически значима  $p<0,0001$  (таблица 3).

Таблица 2. Показатели роста микрофлоры в брюшной полости в зависимости от длительности ОКН

Результат посева	контроль	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки	k	$\chi^2$	p
Роста нет	16	14	17	13	13	4	12,05	0,017
Рост есть	0	6	13	11	4			
Всего	16	20	30	24	17			

примечание: k-количество степеней свободы,  $\chi^2$ -критерий Хи-квадрат Пирсона

Таблица 3. Показатели колониеобразующих единиц (Lg КОЕ) в брюшной полости и кишке при экспериментальной ОКН в динамике

Период наблюдения	Lg КОЕ - БП		F	p	Lg КОЕ - кишка		F	p
	m	SD			m	SD		
Контроль (n=16)	0,0	0,0	2,19	0,07	6,56	3,33	8,03	
I сутки (n=20)	1,55	2,65			10,05	1,47		
III сутки (n=30)	1,77	2,19			9,40	1,40		
V сутки (n=24)	2,71	3,77			9,63	1,74		
VII сутки (n=17)	2,00	3,94			8,71	2,34		

Таблица 4. Показатели КОЕ брюшной полости в зависимости от длительности ОКН

Период наблюдения	Lg КОЕ - БП		F	p
	m	SD		
I сутки (n=6)	5,17	2,041	3,504	0,027
III сутки (n=13)	4,08	1,188		
V сутки (n=11)	5,91	3,448		
VII сутки (n=4)	8,50	3,000		

Таблица 5. Показатели КОЕ в просвете кишки в зависимости от длительности ОКН

Период наблюдения	Lg КОЕ - кишка		F	p
	m	SD		
I сутки (n=6)	10,17	0,983	1,06	0,381
III сутки (n=13)	9,46	1,127		
V сутки (n=11)	9,91	1,700		
VII сутки (n=4)	8,50	3,000		

Таблица 6. Показатели зависимости энтероперитонеальной транслокации при экспериментальной ОКН от уровня кишечной флоры

Группы	M Lg КОЕ в кишке	SD Lg(КОЕ) в кишке	F	p
Транслокации нет (n=57)	9,39	1,830	0,375	0,542
Транслокация есть (n=34)	9,62	1,596		

При изучении динамики показателя микрофлоры брюшной полости транслокация выявлена, в среднем, только в 29,8% случаев, ввиду чего значимой разницы в динамике уровня КОЕ на протяжении 7 суток не выявлено.

Анализ уровня КОЕ проведен только в группе с выявленной транслокацией. Установлена значимая разница уровня КОЕ в зависимости от длительности ОКН.

Количество КОЕ в брюшной полости резко возрастает к 7 суткам течения ОКН - до  $10^8$ , тогда как на первые и третьи сутки этот показатель варьирует в пределах  $10^5$ - $10^4$  (таблица 4).

В этой же группе с выявленной транслокацией значимых изменений в уровнях КОЕ в просвете кишки в динамике не выявлено (таблица 5).

Из таблицы 6 явствует, что средние значения и

распределения десятичного логарифма КОЕ в просвете кишки практически одинаковые в группе с выявленной транслокацией бактерий в брюшную полость и в группе, со стерильным посевом из брюшной полости, т.е. наличие энтероперитонеальной транслокации значительно не зависит от количества микроорганизмов в просвете кишки над уровнем ее обтурации.

В группе ОКН (n=34), в которой выявлена энтероперитонеальная транслокация, проведена корреляция между содержанием микроорганизмов в просвете кишки и брюшной полости. Полученные данные свидетельствуют, что значимой зависимости между уровнями КОЕ в просвете кишки и брюшной полости не отмечается (коэффициент корреляции – 0,062, p=0,727).

**Заключение.** В случаях развития ОКН у экспериментальных животных наибольший уровень энтероперитонеальной транслокации выявлен на третьи и пятые сутки – 43,3% и 45,8%, соответственно. Статистически значимый рост микрофлоры в просвете кишки над уровнем обтурации наблюдался на первые сутки с  $10^6$  до  $10^{10}$  и сохранялся на уровне  $10^9$  на протяжении всего периода наблюдения. Выявлено, что уровень КОЕ зависит от длительности ОКН и в брюшной полости. Он резко возрастает к седьмым суткам до  $10^8$ , тогда как на первые и третьи сутки колеблется на уровне  $10^5$ - $10^4$ , однако при этом значимой корреляционной связи между уровнями КОЕ в брюшной полости и в просвете кишечника при энтероперитонеальной транслокации не выявлено.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. М.: Изд-во «Триада», 2011, 88 с.
2. Бондаренко В.М. Механизмы транслокации бактериальной аутофлоры в развитии эндогенной инфекции // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). - 2013.-№3.-С. 1-21.
3. Жилина А.А. Синдром избыточного бактериального роста в кишечнике- современное состояние проблемы / А.А. Жилина, Е.В. Лузина, Е.А. Томина и др. // Российский медицинский журнал. -2014. -№6. -С. 14—18.
4. Наложение клипсы на «Илеоцекальный угол» тонкой кишки (Свидетельство о государственной регистрации прав на объект интеллектуальной собственности ИС 007385 от 15.02.2017).
5. Никитенко В.И. Роль транслокации бактерий в патогенезе хирургической инфекции / В.И. Никитенко, В.В. Захаров, А.В. Бородин и др. // Хирургия. -2001. - №2. -С. 63-65.
6. Парфенов А. И. «Энтерология». -М.: ТриадаХ, 2002. – 125 с.
7. Пеев Б.И. Бактериальная транслокация и нарушения моторно-эвакуаторной функции тонкой кишки в после-

операционном периоде у больных с острой кишечной непроходимостью / Б.И. Пеев, А.Н.Довженко // Український Журнал Хірургії. -2009.-№4.-С. 113-116.

8. Andrade ME, Araújo RS, de Barros PA, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. //Clin Nutr. 2015 Dec;34(6):1080-7.
9. Deitch, E.A. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymphphypothesis, a review / E.A. Deitch, D. Xu, V.L. Kaise // FrontBiosci. – 2006. – V. 11. – P. 520-528.
10. Lemaire L.C. Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. / L.C. Lemaire, J.J. vanLanschoot, C.P. Stoutenbeeketal. // Br. J. Surg. – 1997.-Vol. 84. – P. 1340-1350.
11. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. Gastroenterology. 2014;146:1513–1524.
12. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. J Hepatol. 2014;60:197–209.

## SUMMARY

### DYNAMICS OF ENTEROPERITONEAL TRANSLOCATION OF MICROORGANISMS ON THE EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE INTESTINAL OBSTRUCTION

<sup>1</sup>Koishibayev Zh., <sup>1</sup>Turgunov Ye., <sup>2</sup>Sandblom G., <sup>1</sup>Lavrinenko A., <sup>1</sup>Zhumakayev A.

<sup>1</sup>Karaganda State Medical University, Kazakhstan; <sup>2</sup>Department of Surgery, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

The article presents an analysis of the dynamics of enteroperitoneal translocation of bacteria on the model of acute intestinal obstruction (AIO) in rats by performing an experimental study on laboratory animals. Using the proposed model of AIO we have tried to determine the level of enteroperitoneal translocation as a function of the time of the impassable obstruction. The results which presented in the article clearly demonstrate that when AIO is developing in experimental animals the greatest level of translocation was revealed on the 3rd and 5th days. Statistically significant growth of the microflora in the lumen of the intestine above the level of obturation was observed on the 1st day and the whole period of observation was maintained, and it was also revealed that the level of CFU depends on the duration of the AIO and in the abdominal cavity it increases dramatically by 7 days, compared to 1 and 3 days. However, there is no significant correlation between enteroperitoneal translocation and the level of CFU in the lumen of the intestine and abdominal cavity.

**Keywords:** acute intestinal obstruction, enteroperitoneal translocation, bacterial translocation, aerobic bacteria.

РЕЗЮМЕ

**ДИНАМИКА ЭНТЕРОПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ  
ТРАНСЛОКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОСТРОЙ  
КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ**

**<sup>1</sup>Койшибаев Ж.М., <sup>1</sup>Тургунов Е.М., <sup>2</sup>Сандблум Г.,  
<sup>1</sup>Лавриненко А.В., <sup>1</sup>Жумакаев А.М.**

*<sup>1</sup>Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан; <sup>2</sup>Госпиталь Каролинского университета, отделение хирургии, Стокгольм, Швеция*

В статье представлен анализ динамики энтероперитонеальной транслокации бактерий на модели острой кишечной непроходимости (ОКН) у крыс путем проведения экспериментального исследования на лабораторных животных. Целью исследования явилось изучение динамики энтероперитонеальной транслокации бактерий на модели острой кишечной непроходимости у крыс.

Приведенные в статье результаты наглядно демонстрируют, что при развитии ОКН у экспериментальных животных наибольший уровень транслокации выявлен на третьи и пятые сутки. Статистически значимый рост микрофлоры в просвете кишки над уровнем обтурации наблюдался на первые сутки и сохранялся весь период наблюдения. Выявлено, что уровень колониеобразующих единиц (КОЕ) зависит от длительности ОКН, в брюшной полости он резко возрастает на седьмые сутки в сравнении с первыми и третьими сутками. Однако значимой корреляционной связи между энтероперитонеальной транслокацией и уровнями КОЕ в просвете кишечника и брюшной полости не выявлено.

რეზიუმე

მიკროორგანიზმების ენტეროპერიტონეული ტრანსლოკაციის დინამიკა ნაწლავების მწვავე გაუვალობის ექსპერიმენტულ მოდელზე

<sup>1</sup>ქ. კოიშიბაევი, <sup>1</sup>ე. ტურგუნოვი, <sup>2</sup>ჯ. სანდბლუმი, <sup>1</sup>ა. ლავრინენკო, <sup>1</sup>ა. ჟუმაკაევი

*<sup>1</sup>ყარაგანდის სახელმწოფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ყაზახეთი; კაროლინის უნივერსიტეტის ჰოსპიტალი, ქირურგიის განყოფილება, სტოკჰოლმი, შვედეთი*

სტატიაში წარმოდგენილია ბაქტერიების ენტეროპერიტონეული ტრანსლოკაციის დინამიკის ანალიზი მწვავე ნაწლავური გაუვალობის (მნგ) მოდელზე ვირთავებში.

კვლევის მიზანი იყო ბაქტერიების ენტეროპერიტონეული ტრანსლოკაციის შეფასება ვირთავებში მწვავე ნაწლავური გაუვალობის მოდელზე.

კვლევის შედეგად დადგენილია, რომ მნგ-ის განვითარების დროს ექსპერიმენტულ ცხოველებში ტრანსლოკაციის უმაღლესი დონე აღინიშნა მე-3 და მე-5 დღეს. მიკროფლორის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი მატება ნაწლავის სანათურში ობტურაციის დონის ზემოთ აღინიშნა პირველი დღე-ღამის განმავლობაში და შენარჩუნდა დაკვირვების მთელ პერიოდში. დადგენილია, რომ კოლონიაწარმოქმნელი ერთეულების (კწე) დონე დამოკიდებულია მნგ-ის ხანგრძლივობაზე. მუცლის ღრუში იგი მკვეთრად იმატებს მეშვიდე დღეს, პირველ და მესამე დღესთან შედარებით. სარწმუნო კორელაციური კავშირი ენტეროპერიტონეულ ტრანსლოკაციისა და კწე-ს დონეს შორის ნაწლავის სანათურსა და მუცლის ღრუში არ გამოვლინდა.

**CHARACTERIZATION OF SULPHIDE SILT PELOIDS IN SOME LAKES  
WITHIN ADJARA REGION AND DETERMINATION  
OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS CONTENT**

**<sup>1</sup>Masiukovich T., <sup>3</sup>Jokhadze M., <sup>1</sup>Murtazashvili T., <sup>2</sup>Bakuridze A.**

*<sup>1</sup>Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;*

*<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Technology; <sup>3</sup>LEPL Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia*

Medicinal muds, so called Peloids in the last decade attract attention in many countries as effective means for the treatment- preventive and perfumery-cosmetic purposes. It has been established that the possibilities of this formation of nature are not limited to the many-year experience of the mankind. In terms of further improvement

of the human social sphere, nowadays peloids are referred to as XXI century material.

Georgia, along with other mineral resources, is one of the richest countries in peloids as well. Therefore, for the purpose of the economic development of the country, the interest to the studying and application of medicinal muds is great.

Table 1. The main physical-chemical characteristics of the sulphide silt peloids of some Adjara region lakes

Name of the sample	Ardagani	Niphi	Gasaliani	Nurigeli	Mtsvane	Shratiani
Humidity, %	68,783	76,560	40,582	27,035	36,908	38,775
Ash content, %	24,443	18,546	53,333	76,761	56,396	50,786
pH	6,8	7,2	7,05	7,1	7,21	7,25
Bulk (volumetric) density, g/cm <sup>3</sup>	0,81	0,74	0,72	0,97	0,86	0,93
Organoleptic properties: Colour, odour	Dark gray, without characteristic odor	Dark gray, with the odor of hydrogen sulphide	Dark brown, without characteristic odor	Dark gray, with the odor of hydrogen sulphide	Dark brown, without characteristic odor	Brown, without characteristic odor
Consistence	Soft, plastic	Soft, plastic	Loose	Loose	Soft, plastic	Soft, plastic

Adjara is one of the regions of Georgia, rich in peloids resources, which can be found on the seacoasts, as well as in the mountains [10]. These resources have been known to the local population since the ancient times and used for treatment and prevention of various diseases. From the literary data it is known that the components of the peloids (humic acids) have a significant biological activity, namely antibacterial, antifungal, immunomodulating and photo-protective properties, therefore they represent a potential interest in dermatology and cosmetology [2,5].

It is established that the sulphide silt peloids contain lipids and organic acids, produced by algae. They have a special role in the development of the human organism and the formation of protective-compensating mechanisms in the process of aging in development of metabolic disorders, atherosclerosis and other pathogenic processes. In addition, the lipid complex has a pronounced antibacterial activity against the typhoid, paratyphoid, dysentery and diphtheria microbes. It is the lipids that play a significant role in the anti-inflammatory activity of medicinal muds [4].

Despite the diversity and abundance of mineral resources, only insignificant part of them has been assimilated; therefore, their further study and implementation in medical practice will give a powerful stimulus to the development of the region's resort and tourism business [7,9].

The aim of the research was to study the physical-chemical characteristics of sulphide silt peloids of some Adjara region lakes (Mtsvane, Gasaliani, Shratiani, Nurigeli, Ardagani and Niphi), as well as to determine the content of mineral and organic compounds.

**Material and methods.** The objects of the study were the sulphide silt peloids of the Adjara region lakes: Mtsvane, Gasaliani, Shratiani, Nurigeli, Ardagani and Niphi. The main good quality indicators of the sulphide silt peloids: humidity, pH, ash content, bulk (volumetric) density and organoleptic properties, have been determined according to the methods described in the State Pharmacopoeia XI.

The mineral and organic compounds in the research objects have been determined using the modern

instrumental methods of analysis described in the literature [1,3,4,8].

The organic acids have been identified by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC/MS) method. The analysis was conducted under the following conditions:

Device: Agilent Technologies GC - 7890 A, MS - 7000 A Triple Quadrupole;

Injector temperature: 250°C;

Oven temperature: Temperature gradient: 60°C/min; 60°C → 250°C 15°C/min; 250°C → 300°C 10°C/min;

Transfer line temperature: 300°C;

Injecting volume: 1 µl;

Column: 5 MS 30 m x 250 µm x 0.25 µm;

Ionization: 70 eV;

Gas carrier: Helium;

Gas flow speed: 1 ml / min.

Detection in TIC (*Total Ion Current*) regimen, using NIST database.

**Results and their discussion.** The results of determining the main physical-chemical characteristics of the sulphide silt peloids are given in Table 1.

The content of the minerals in the samples of sulphide silt peloids have been studied by the X-ray diffraction analysis, by using X-ray diffractometer DRON-3M. The copper Cu K $\alpha$  radiation was used as a source of X-rays. As a result, in the study objects was established the mineral content such as: Ca-Na Feldspar, K Feldspar, Ca- Montmorillonite, Hematite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Quartz (SiO<sub>2</sub>), Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), Chlorite.

The isolation of the humic acids from the samples of sulphide silt peloids was carried with 0.25mol KOH solution as an extragent. The samples were previously dried to the permanent weight and hold on for 24 hours with the extragent. Then the solution was centrifuged at 6000 r.p.m. for 15 min and the solution above the precipitate was filtered, to the remained precipitate was again added the extragent 0.25 mol KOH solution and heated on the water bath at 70°C for 2 hours. After cooling the obtained solution was again centrifuged (6000 r.p.m., 15 min) and filtered



Table 2. The content of humic acids of sulphide silt peloids of some Adjara region lakes

Name of the sample	The content of humic acids, %
Ardagani	1,22
Niphi	1,72
Gasaliani	1,33
Nurigeli	0,43
Mtsvane	0,24
Shratiani	0,62

the solution above the precipitate. The insoluble part was washed with 0.25mol KOH until the solution was clear.

For precipitation of humic acids the received solutions were acidified with 10% HNO<sub>3</sub> solution to pH 1-2 and allowed to stand overnight. The precipitated humic acids were separated by centrifugation at 6000 r.p.m. for 15 min and the content was determined by gravimetric method. The results obtained are provided in Table 2.

The identification of humic acids has been performed by spectrophotometric method of analysis. The alkaline solutions of humic acids, isolated from the study objects and of the standard substance (Humic acid, Sigma-Aldrich), have the similar absorption maximums at 320-330 nm (Fig. 1).

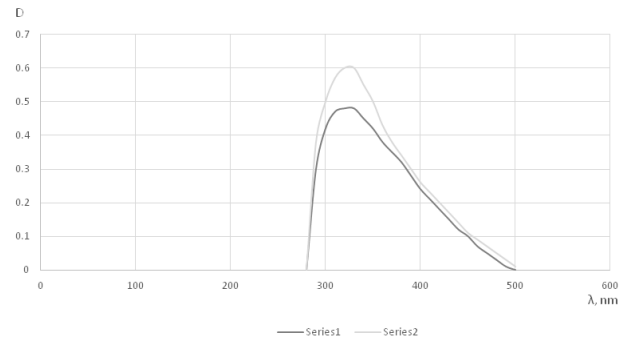


Fig. 1. The absorption spectra of the alkaline solutions of humic acids, isolated from sulphide silt peloid of Niphi lake and of the standard substance (Humic acid, Sigma-Aldrich)

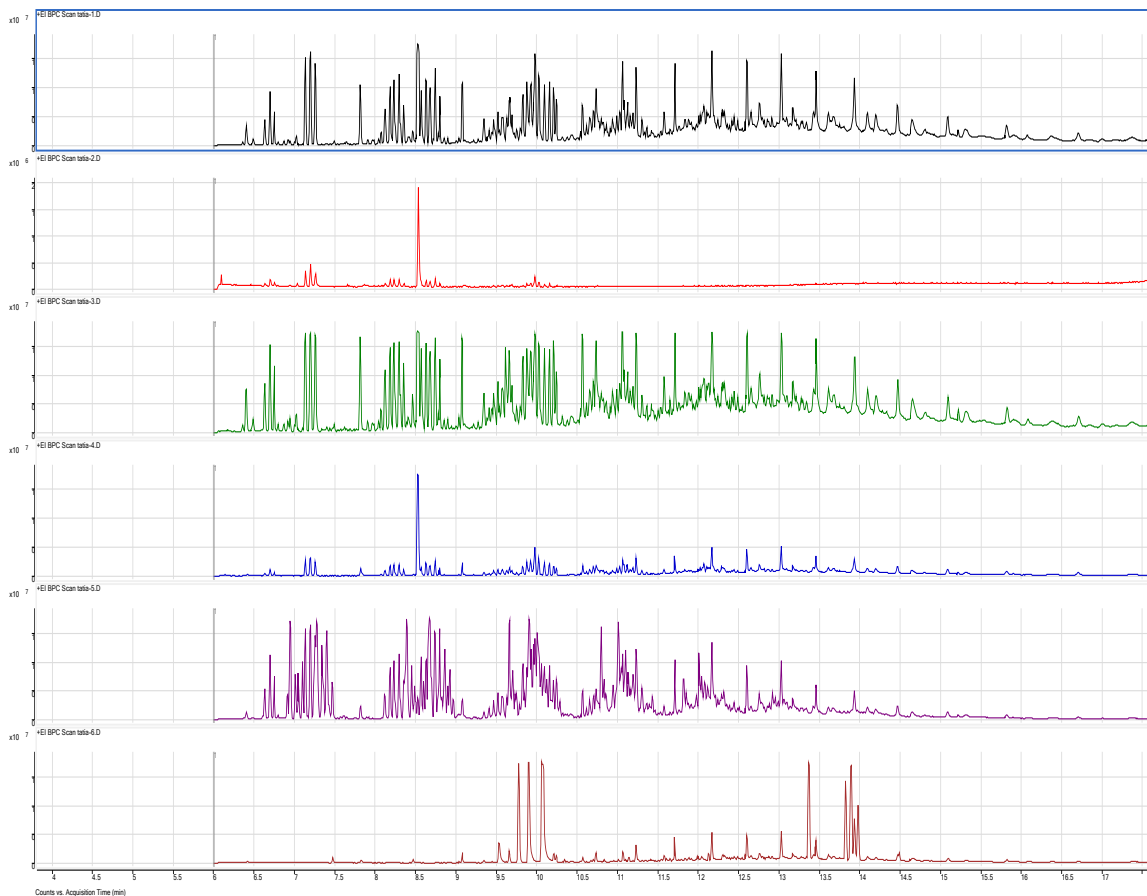


Fig. 2. GC/MS chromatograms of ethanol-hexane extracts of sulphide silt peloids of the Adjara region lakes (Ardagani '1', Gasaliani '2', Mtsvane '3', Niphi '4', Nurigeli '5', Shratiani '6')

The absorption spectra of sulphide silt peloids of other lake samples were similar to the one of Niphi lake sample.

The extraction of organic acids from sulphide silt peloids was carried on magnetic mixer with ethanol-hexane mixture (1:6), the sample and extragent taken by 1:3 ratio, at 26°C temperature, during 60 min. The obtained extract was filtered through a filter paper. The determination of organic compounds in the filtrate was carried by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC/MS) method.

The results of the chromatographic analysis are given on Fig. 2.

The results show that the sulphide silt peloid of the Ardagani lake contains the complex ethers of the following organic acids: Stearic acid (Octadecanoic acid, C18), Caprylic acid (Octanoic acid, C8), Phthalic acid, Palmitic acid (Hexadecanoic acid, C16).

In the sulphide silt peloid of Gasaliani lake there are detected: Valeric acid (Pentanoic acid, C5), Caprylic acid (Octanoic acid, C8).

In the sulphide silt peloid of Mtsvane lake there are identified: Phthalic acid, Palmitic acid (Hexadecanoic acid, C16).

The sulphide silt peloid of Niphi lake contains: Lauric acid (Dodecanoic acid, C12); Caprylic acid (octanoic acid, C8); Myristic acid (C14); Palmitic acid (Hexadecanoic acid, C16).

The content of Fumaric and Phthalic acids have been detected in the sulphide silt peloid of Nurigeli lake.

The sulphide silt peloid of Shratiani lake contains: Fumaric, Phthalic and Oxalic acids.

**Conclusions.** Based on the performed studies, the main physical-chemical characteristics of sulphide silt peloids of some Adjara region lakes (Mtsvane, Gasaliani, Shratiani, Nurigeli, Ardagani and Niphi) have been studied and their mineral contents (Ca-Na Feldspar, K Feldspar, Ca- Montmorillonite, Hematite, Quartz, Magnetite, Chlorite) established.

The humic acids contents are identified in the study objects by the spectrophotometric and gravimetric methods of analysis. The sulphide silt peloids of the lakes Ardagani (1,22%), Niphi (1,72%) and Gasaliani (1,33%) are distinguished by relatively higher content of humic acids.

By the Gas Chromatography-Mass Spectrometry - method of analysis, there is established the contents of complex ethers of the following organic acids: Stearic, Palmitic, Caprylic, Myristic, Valeric, Lauric, Oxalic, Phthalic and Fumaric acids.

**Acknowledgment.** The authors gratefully acknowledge to LEPL Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Chemical Toxicological Laboratory, Tbilisi, Georgia, for providing necessary facilities to carry out this work.

The studies have been conducted with the financial support of the grant funding of Doctoral Education

Programs PhDF2016\_156 of LEPL Shota Rustaveli National Science Foundation.

## REFERENCES

1. Дычко К.А., Рыжова Г.Л., Тюнина М.А., Хасанов В.В., Данекер В.А., Определение липидов в пелоидах методом хромато-масс-спектрометрии с применением водной вибромагнитной экстракции / Известия Томского политехнического университета / 2012. Т. 321. N3. С. 100-103.
2. Исмадова Р.Р., Зиганшин А.У., Дмитрук С.Е. Влияние гумата натрия из торфа Томской области на аллергические реакции // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т.70, № 6. – С.29-31.
3. Колесова О.В., Леонтьева Г.В., Вольхин В.В., Экстракция липидов из состава активного ила после микробиологической очистки сточных вод / Вестник ПГТУ /Пермский гос. техн. ун-т. - Пермь, 2011. - № 12: Химическая технология и биотехнология. - С. 162-171.
4. Саратиков А.С., Буркова В.Н., Венгеровский А.И., Кураколова Е.А., Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пелоидов. Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2004; 178.
5. Dos Santos A., Botero W. G., Bellin I. C., Camargo de Oliveira L., Rocha J.C., Mendonca A. G., and Godinho A. F. Interaction between humic substances and metallic ions: a selectivity study of humic substances and their possible therapeutic application. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2007, 18(4), 824-830.
6. Fong S. S., Seng L., Chong W. N., Asing J., Nor M. F. b Md, Pauznan A. S. bt Mohd. Characterization of the coal derived humic acids from Mukah, Sarawak as soil conditioner / Journal of the Brazilian Chemical Society / v. 17, n° 3, p. 582-587.
7. Gaprindashvili A., Masiukovich T., Abuladze I., Kakulia N., Bakuridze L., Bakuridze A., Emine Akuz Turumtay “The study of the mineral resources of Beshumi resort for their use in medical practice”. The clinical and experimental medicine № 5, 2013( p. 14-16).
8. Masiukovich T., Bakuridze A., Murtazashvili T., The study of mineral composition of sulphide silt peloids spread in Adjara region by using X-ray phase method of analysis / Proceedings of The Georgian National Academy of Sciences, Chemical Series / Tbilisi, 2016 №4, V. 42. P. 541-545.
9. Masiukovich T., Gaprindashvili A., Kakulia N., Berashvili D., Bakuridze A. “The study of mineral composition of peloids spread in Kobuleti Region”. Georgian Medical News, Tbilisi. № 3 (216) March 2013) ( p. 60-64).
10. Phutkaradze N., Gotsiridze R., Mepharishvili N., Berashvili D., Bakuridze A. Search for sulfide peloids in Adjara region and their characteristics / Allergology and Immunology. Tbilisi. 2012. V. 13, N3. P. 273.

## SUMMARY

### CHARACTERIZATION OF SULPHIDE SILT PELOIDS IN SOME LAKES WITHIN ADJARA REGION AND DETERMINATION OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS CONTENT

<sup>1</sup>Masiukovich T., <sup>3</sup>Jokhadze M., <sup>1</sup>Murtazashvili T.,  
<sup>2</sup>Bakuridze A.

<sup>1</sup>Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry; <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Technology; <sup>3</sup>LEPL Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia

Medicinal muds, so called Peloids in the last decade attract attention in many countries as effective means for the treatment- preventive, and perfumery-cosmetic purposes. It has been established that the possibilities of this formation of nature are not limited to the many-year experience of the mankind. In terms of further improvement of the human social sphere, nowadays peloids are referred to as XXI century material.

The aim of the research was to study the physical-chemical characteristics, such as: humidity, pH, ash content, bulk (volumetric) density and organoleptic properties of sulphide silt peloids of some Adjara region lakes, as well as to determine the content of mineral and organic compounds (humic and organic acids).

The objects of the study were the sulphide silt peloids of some Adjara region lakes: Mtsvane, Gasaliani, Shratiani, Nurigeli, Ardagani and Niphi. The main good quality indicators of the sulphide silt peloids have been determined according to the methods described in the State Pharmacopoeia XI. The mineral and organic compounds in the research objects have been determined using the modern instrumental methods of analysis described in the literature. Based on the performed studies, the main physical-chemical characteristics of sulphide silt peloids of some Adjara region lakes (Mtsvane, Gasaliani, Shratiani, Nurigeli, Ardagani and Niphi) have been studied and their mineral contents (Ca-Na Feldspar, K Feldspar, Ca-Montmorillonite, Hematite, Quartz, Magnetite, Chlorite) determined.

By the spectrophotometric and gravimetric methods of analysis there is established, that the sulphide silt peloids of the lakes Ardagani (1,22%), Niphi (1,72%) and Gasaliani (1,33%) are distinguished by relatively higher content of humic acids. By the Gas Chromatography-Mass Spectrometry - method of analysis, in the study objects there is established the content of complex ethers of the following organic acids: Stearic, Palmitic, Caprylic, Myristic, Valeric, Lauric, Oxalic, Phthalic and Fumaric acids.

**Keywords:** sulphide silt peloids, humic acids, physical-chemical characteristics, Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS).

## РЕЗЮМЕ

### ХАРАКТЕРИСТИКА СУЛЬФИДНЫХ ИЛОВЫХ ПЕЛОИДОВ НЕКОТОРЫХ ОЗЕР АДЖАРСКОГО РЕГИОНА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

<sup>1</sup>Масюковичи Т.В., <sup>3</sup>Джохадзе М.С.,  
<sup>1</sup>Муртазашвили Т.Ж., <sup>2</sup>Бакуридзе А.Дж.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный медицинский университет, департамент фармацевтической и токсикологической химии; <sup>2</sup>департамент фармацевтической технологии; <sup>3</sup>ЮЛПП Национальное бюро судебной экспертизы им. Л. Самхараули, Тбилиси, Грузия

Лекарственные грязи, т.н. пелоиды за последнее десятилетие во многих странах привлекают внимание как эффективные профилактические, лечебные и парфюмерно-косметические средства.

Целью исследования явилось изучение физико-химических характеристик: влажности, pH, зольности, насыпной (объемная) плотности, органолептических свойств иловых сульфидных пелоидов некоторых озер Аджарского региона и определение содержания минеральных и органических веществ (гуминовые и органические кислоты).

Объектами исследования являлись иловые сульфидные пелоиды озер Аджарского региона: Мцване, Гасалиани, Шратиани, Нуригели, Ардагани и Нифи.

Определены основные показатели доброкачественности иловых сульфидных пелоидов методами, приведенными в Государственной фармакопее XI. Выявлены минеральные и органические вещества в исследуемых объектах с использованием современных инструментальных аналитических методов.

На основе проведенных исследований получены основные физико-химические характеристики иловых сульфидных пелоидов озер Аджарского региона - Мцване, Гасалиани, Шратиани, Нуригели, Ардагани и Нифи и установлено содержание в них минералов Са-На полевой шпат, К полевой шпат, Са-монтмориллонит, гематит, кварц, магнетит, хлорид.

Спектрофотометрическим и гравиметрическим методами установлено, что высоким содержанием гуминовых кислот выделяются иловые сульфидные пелоиды озер Ардагани (1,22%), Нифи (1,72%) и Гасалиани (1,33%).

Методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии в исследуемых объектах установлено содержание сложных эфиров органических кислот: стеариновой, пальмитиновой, каприловой, миристиновой, валериановой, лауриловой, щавелевой, фталовой и фумаровой.

## რეზიუმე

აჭარის რეგიონის ზოგიერთი ტბის ლამიანი სულფიდური პელოიდების დახასიათება და ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების შემცველობის განსაზღვრა

<sup>1</sup>თ. მასიუკოვინი, <sup>3</sup>მ. ჯოხაძე, <sup>1</sup>თ. მურთაზაშვილი, <sup>2</sup>ა. ბაკურიძე

<sup>1</sup>თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი; <sup>2</sup>ფარმაცევტული ტექნოლოგიის დეპარტამენტი; <sup>3</sup>სსიპ - ლევან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიურო, თბილისი, საქართველო

სამკურნალო ტალახები, ე.წ. პელოიდები, როგორც სამკურნალო-პროფილაქტიკური და პარფიუმერიულ-კოსმეტიკური დანიშნულების ეფექტური საშუალებები უკანასკნელი ათწლეულის განმავლობაში მრავალ ქვეყანაში იპყრობს ყურადღებას.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა აჭარის რეგიონის ტბების ლამიანი სულფიდური პელოიდების ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლების (ტენიანობა, pH, ნაცრიანობა, ნაყარი სიმკვრივე, ორგანოლექტიკური თვისებები) შეფასება, ასევე, მინერალური და ორგანული ნივთიერებების (ჰუმინური და ორგანული მჟავები) შემცველობის განსაზღვრა.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა აჭარის რეგიონის ტბების - მწვანე, გასალიანის, შრატია-ნის, ნურიგელის, არდაგანის და ნიფის, ლამიანი-სულფიდური პელოიდები. ლამიანი სულფიდური პელოიდების კეთილხარისხოვნების ძირითადი მაჩვენებლები განისაზღვრა XI სახელმწიფო ფარმაკოპეაში აღწერილი მეთოდების შესაბამისად. საკვლევი ობიექტებში მინერალური და ორგანული ნივთიერებები გამოკვლეულია თანამედროვე ინსტრუმენტული მეთოდების გამოყენებით.

ჩატარებული კვლევების საფუძველზე გამოვლინილია აჭარის რეგიონის ტბების - მწვანე, გასალიანი, შრატია-ნის, ნურიგელის არდაგანი და ნიფი, ლამიანი სულფიდური პელოიდების ძირითადი ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები და დადგენილია მათში მინერალების (Ca-Na მინდვრის შპატი, K მინდვრის შპატი, Ca-მონტმორინოლიტი, პემატიტი, კვარცი, მაგნეტიტი, ქლორიდი) შემცველობა.

სპექტროფოტომეტრული და გრავიმეტრული მეთოდებით დადგენილია, რომ ჰუმინური მჟავების მაღალი შემცველობით გამოირჩევა არდაგანის (1,22%), ნიფის (1,72%) და გასალიანის (1,33%) ტბის ლამიანი სულფიდური პელოიდები.

გაზური ქრომატოგრაფიით - მას-სპექტრომეტრული მეთოდით საკვლევი ობიექტებში დადგენილია სტეარინის, პალმიტინის, კაპრილის, მირისტინის, ვალერიანის, ლაურილის, მჟაუნმჟავას, ფტალისა და ფუმარის ორგანული მჟავების რთული ეთერების შემცველობა.

## EFFECTS OF EXPOSURE TO RADIOACTIVE <sup>56</sup>MnO<sub>2</sub> POWDER ON HYALURONAN SYNTHASE 2 IN THE LUNGS OF RATS

<sup>1</sup>Kairkhanova Y., <sup>1</sup>Saimova A., <sup>1</sup>Uzbekov D., <sup>1</sup>Chaizhunusova N., <sup>2</sup>Fujimoto N.

<sup>1</sup>Semey State Medical University, Kazakhstan; <sup>2</sup>Hiroshima University, Japan

For a better understanding of the radiation effects of atomic bombs, radiation from neutron-induced radioisotopes should be considered. Manganese-56 (<sup>56</sup>Mn), which emits both β particles and γ-rays, was one of the major radioisotopes produced in the aftermath of the atomic bomb explosion in Hiroshima in 1945 [12]. This isotope potentially contributed to the radiation exposure of survivors, in addition to the initial acute radiation exposure in the wake of the explosion [5]. To assess the radiation effect of <sup>56</sup>Mn, we previously examined Wistar rats exposed to neutron-activated <sup>56</sup>MnO<sub>2</sub> powder. Our dosimetry data showed that the highest dose of internal irradiation from <sup>56</sup>Mn was in the digestive system, followed by the lungs and skin [10, 11]. In the small intestine, the enhancement of mitosis was

observed in the crypt area, while significant pathological changes including hemorrhage and emphysema were found in the lung [9].

Since the pathological change in the lung was eminent, we investigated the expression of a series of radiation-induced lung injury related genes and found that the reduction of transforming growth factor β receptor gene expression that is involved in the regulation of extracellular matrix deposition and lung fibrosis [6]. In the present study, to further assess the biological effects of the internal exposure to <sup>56</sup>Mn, we examined the expression levels of hyaluronan synthase 2 (Has2) and hyaluronidase 2 genes (Hyal2), both of which regulate the level of hyaluronan (HA), an important constituent of lung tissue. Quantita-

tive reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to compare the gene expressions in the  $^{56}\text{Mn}$ -exposed group and in those exposed to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -irradiation.

**Materials and methods.** Ten-week-old male Wistar rats were purchased from Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases, Almaty, Kazakhstan. These were maintained with free access to basal diet and tap water. In experiment 1, rats were divided into four groups, L- $^{56}\text{Mn}$  group (n = 12), H- $^{56}\text{Mn}$  (n = 10),  $^{60}\text{Co}$  group (n = 9) and control group (n = 9). L- $^{56}\text{Mn}$  and H- $^{56}\text{Mn}$  groups were exposed to two different doses of  $^{56}\text{MnO}_2$  powder.  $^{60}\text{Co}$  group received 2 Gy of external  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray whole body irradiation. Three rats each of the  $^{56}\text{Mn}$  groups were sacrificed for dosimetry 3–4 hours after exposure. Three rats from each group were sacrificed on days 3, 14, and 60 post-exposure (two rats were used on days 3 and 14 in H- $^{56}\text{Mn}$  group). Animals were euthanized by an overdose of ketamine administered by intraperitoneal injection followed by whole blood collection from an abdominal artery. Pieces of lung tissues were stored in the RNA Save solution (Biological Industries, Cromwell, CT, USA) for RNA extraction. In experiment 2, rats were divided into two groups, non-radioactive Mn and control (n = 9 for both). Rats in the Mn group were exposed to  $\text{MnO}_2$  powder in a manner similar to that used for  $^{56}\text{MnO}_2$  exposure. Three rats from each group were sacrificed on 3, 14, and 60 days post-exposure and the lung tissues were collected. Although the exposure to non-radioactive Mn was performed separately as experiment 2, the data were combined with those of experiment 1 and presented.

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. The animal experiment was approved by the Animal Experiment Committee of Semey Medical University, Republic of Kazakhstan, and conducted in accordance with the Institutional Guide for Animal Care and Use.

*Irradiation and dosimetry of rat organs.* Details of irradiation using  $^{56}\text{MnO}_2$  and the corresponding internal dose estimation have been described previously [10]. In brief,  $^{56}\text{MnO}_2$  was obtained by neutron activation of 100 mg of  $\text{MnO}_2$  powder using the Baik-1 nuclear reactor at the national nuclear center, Kurchatov, Kazakhstan. A thermal neutron fluence of  $8 \times 10^{14}$  n/cm<sup>2</sup> and  $1.6 \times 10^{15}$  n/cm<sup>2</sup> (for L- $^{56}\text{Mn}$  and H- $^{56}\text{Mn}$ , respectively) was applied to produce  $^{56}\text{Mn}$ . Activated  $\text{MnO}_2$  powder was sprayed into sealed boxes which contained five or six rats per box. After 1 hour, rats were removed from the exposure boxes and housed in fresh cages, cooled down for 1 hour. Then, three of the animals were euthanized. A piece of each organ was dissected, and weighed. Radioactivity of  $^{56}\text{Mn}$  in each sample was measured with a gamma spectrometer. Absorbed fractions from  $\beta$ - and  $\gamma$ - irradiation in the lung as well as that for the whole

body were calculated based on the Monte Carlo code (version MCNP-4C) and the mathematical phantom of a rat.

Whole-body  $\gamma$ -ray irradiation of 2 Gy was performed using a Teragam K-2 unit (UJP Praha, Praha-Zbraslav, Czech Republic). The rats were irradiated at 1 m distance from the  $^{60}\text{Co}$  source at a dose rate of 2.6 Gy/min. At each irradiation, half of the radiation dose was administered from the top and the other half was administered from the bottom. A radiophotoluminescence glass dosimeter, GD-302M (Chiyoda Technol Co., Tokyo, Japan), was used for measurement of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray dose.

*Determination of mRNA levels by quantitative RT-PCR.* Total RNA was prepared using Isogen II (Nippon Gene Co., Tokyo, Japan) from a piece of lung tissues stored in RNA Save solution. First strand cDNA was synthesized by incubating 2  $\mu\text{g}$  total RNA with 200 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen/Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) with 100 pmol oligo-dT(24) primer. A quantitative PCR instrument, StepOnePlus (Applied Biosystems/Life Technologies Co.), was employed for measurement of cDNA with a KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA). Specific primer sets were designed for Has2 (5'-GGCACCTTACCAACAGGGTA and 5'-AGCCACTCTCGGAAGTAGGA) and Hyal2 (5'-TGTGTACCGGCAGTCTTCAC, 5'-CTGCCTTGACGTAACGGAGT). GenBank Accession numbers are NM\_013153 and NM\_172040, respectively. Prior to quantitative analysis, the PCR products were prepared separately and purified by gel electrophoresis. The DNA sequences were confirmed using a capillary DNA sequencer (310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems/Life Technologies Co.). The extracted fragments were used as standards for quantification. PCR conditions were 30 s initial denaturation followed by 40 cycles of 5 s at 95°C and 35 s at 60°C. The measured mRNA levels were normalized with reference to the levels of  $\beta$ -actin mRNA [2].

All values are presented as mean  $\pm$  standard error (SEM). Student's *t*-test was performed to compare between the control and the radiation- exposed groups.

**Results and their discussion.** *Internal irradiation doses in the lung.* The estimated mean internal radiation of the lung in the L- $^{56}\text{Mn}$  and H- $^{56}\text{Mn}$  groups was  $51 \pm 11$  mGy and  $110 \pm 23$  mGy, respectively. The estimated mean whole-body irradiation dose was  $91 \pm 26$  mGy and  $140 \pm 30$  mGy, respectively. The external irradiation dose from  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray exposure was 2.0 Gy.

*Changes in lung weights.* The relative lung weights on days 3, 14, and 60 after radiation exposure are shown in Table 1. There were no significant differences in the relative lung weights in the non-radioactive Mn,  $^{60}\text{Co}$  and control groups on each examined day, although the relative lung weights decreased as rats grew. However, they increased significantly over the control levels in the L- $^{56}\text{Mn}$  and H- $^{56}\text{Mn}$  groups on day 14 after  $^{56}\text{Mn}$  exposure, which returned to the control levels on day 60.

Table 1. Relative weights of the lung in rats internally exposed to <sup>56</sup>Mn powder or externally irradiated with <sup>60</sup>Co γ-rays

Group	days after the exposue		
	3	14	60
Control	5,5±0,62	4,7±0,21	3,8±0,40
Cold Mn	4,8±0,33	4,2±0,22	4,6±1,16
L- <sup>56</sup> Mn	4,8±0,65	6,9±0,51*	4,6±0,83
H- <sup>56</sup> Mn	5,5±0,59	6,7±0,09**	4,5±0,36
<sup>60</sup> Co γ-rays	5,1±0,32	4,8±0,39	4,7±0,59

note: each value shows relative lung weight (g/kg body weight, mean±SEM) \* and \* indicate significantly different from each contol level by p<.05 (\*) and p<.01 (\*\*)

Table 2. Has2 mRNA levels in the lung in rats internally exposed to <sup>56</sup>Mn powder or externally irradiated with <sup>60</sup>Co g-rays

Group	days after the exposue		
	3	14	60
Control	3.50±0.73	3.39±1.22	4.62±2.58
Cold Mn	3.26±1.07	5.11±0.44	7.77±0.39
L- <sup>56</sup> Mn	0.34±0.08*	0.61±0.13	1.93±0.54
H- <sup>56</sup> Mn	0.18±0.30*	0.96±0.63	0.61±0.08
<sup>60</sup> Co γ-rays	3.69±1.05	1.76±0.65	4.67±2.60

note: each value shows mRNA level (fmol/pmol bactin, mean±SEM) \* indicates significantly different from each contol level by p<.05

Table 3. Hyal2 mRNA levels in the lung in rats internally exposed to <sup>56</sup>Mn powder and externally irradiated with <sup>60</sup>Co g-rays

Group	days after the exposue		
	3	14	60
Control	23.6±7.1	24.5±6.8	19.4±1.5
Cold Mn	27.3±3.8	22.1±2.9	19.2±9.5
L- <sup>56</sup> Mn	12.1±4.9	29.0±0.7	23.1±8.1
H- <sup>56</sup> Mn	17.0±3.7	19.8±4.2	16.5±3.1
<sup>60</sup> Co γ-rays	12.0±3.4	30.3±1.7	26.6±6.0

note: each value shows mRNA level (fmol/pmol bactin, mean±SEM)

#### Expressions of Has2 and Hyal2 in lung tissue.

Changes in mRNA expression of Has2 and Hyal2 genes in lung tissue on days 3, 14, and 60 after radiation exposure are shown in Tables 2 and 3, respectively. In the control and non-radioactive Mn groups, there were no significant changes in the expression of either gene through day 60 post-exposure. The expression of Has2 was significantly decreased in both H-<sup>56</sup>Mn and L-<sup>56</sup>Mn groups on day 3. There were no significant changes in Has2 expression in the <sup>60</sup>Co group. The expression of Hyal2 was not changed either by <sup>56</sup>Mn or <sup>60</sup>Co γ-rays.

Because <sup>56</sup>Mn and other neutron-activated radioisotopes were present in dust after the atomic bombings, the victims may have inhaled these radioactive materials and were internally exposed to the radiation [5,12]. This is particularly important to understand the radiation effects on the individuals who returned early to Hiroshima and Nagasaki after the atomic bombing in 1945. Similar attentions should be paid to analyze

the effects on those who were exposed to the radiation near the nuclear test sites in Semipalatinsk and other areas. Therefore, we recently started to investigate the biological effects of the internal exposure of <sup>56</sup>Mn powder in laboratory animals. In our previous study, we reported the pathological changes in Wistar rats exposed to neutron-activated <sup>56</sup>MnO<sub>2</sub> powder [9]. In the small intestine, mitosis was enhanced for an extended period after <sup>56</sup>Mn exposure. The lungs were severely damaged by <sup>56</sup>Mn, with histological changes, including hemorrhage and emphysema, which were unexpected since the dose was only 0.1 Gy and there were no pathological changes induced by external <sup>60</sup>Co γ-rays irradiation at a dose of 2 Gy. These effects were more clearly demonstrated when the expressions of radiation-induced-injury-related genes were examined [6]. In the lung, the expression of transforming growth factor β receptor 1 decreased, while that of Smad 7 and aquaporin 5 increased after <sup>56</sup>Mn exposure.

In the present study, to further examine the effect of  $^{56}\text{Mn}$  exposure on the lung, we focused on the gene expression of Has2 and Hyal2. In the lung, the products of these two genes, HAS2 and HYAL2 regulated the level of HA by synthesizing and degrading it in the tissue [3]. HA is a glycosaminoglycan that is expressed ubiquitously in the extracellular matrix including lung tissue in both man and rat. An accumulation of HA in lung tissues is related to the development of fibrotic lung injury [13]. In contrast, a decrease in lung HA could cause pulmonary edema in a rat model [1]. A recent study revealed that the expression of Has2 gene was upregulated in the lung exposed to a high dose of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays, which may be involved in the radiation induced lung fibrosis [7]. In the present study, however, the expression of Has2 significantly decreased on day 3 after  $^{56}\text{Mn}$  exposure, while the Hyal2 expression was not affected. Significant increases in relative lung weights on day 14 may be the consequence of this reduction in Has 2. Since HA provides cellular support and stabilization of structures in the lung, the reduction of its synthesis may lead morphological changes as we previously reported [9].  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray irradiation did not change the expression of either of the genes. This may be due to the lower dose of  $\gamma$ -ray irradiation, 2 Gy in the present study vs. 30 Gy in the literature [7]. Nevertheless, our data suggest that the effects of the internal exposure of  $^{56}\text{Mn}$  on the lung are very different from those of the external irradiation of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays.

Since  $^{56}\text{Mn}$  emits both  $\beta$  particles and  $\gamma$  rays, the biological effects observed in our study may be due to  $\beta$  emission. However, previous studies which compared rats exposed to the  $\beta$ -emitter,  $^{144}\text{Ce}$ , with those exposed to X-ray irradiation showed comparable biological effects, while the  $\alpha$ -emitter,  $^{238}\text{Pu}$ , had 20 times higher influence [4,8]. Further studies are needed to understand the underlying mechanisms of the change in gene expressions brought about by  $^{56}\text{Mn}$  exposure as well as to know if these changes have long-term physiological and pathological impact.

**Acknowledgements.** We thank Profs. Hoshi M. of Hiroshima University, Japan, Prof. Stepanenko V. of A. Tsyb Medical Radiological Research Center - National Medical Radiological Research Center, Russia and Rector Rakhypbekov T. of Semey State Medical University, Kazakhstan for supervising the study.

This work was supported by Semey State Medical University, Kazakhstan, and Grant-in-Aids (#26257501 and #23510064) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

## REFERENCES

1. Ahn C.M., Sandler H., Saldeen T. Decreased lung hyaluronan in a model of ARDS in the rat: effect of an inhibitor of leukocyte elastase // *Upsala J Med Sci.* 2012; 117: 1-9.
2. Fujimoto N., Suzuki T., Ohta S., et al. Identification of rat prostatic secreted proteins using mass spectrometric analysis and androgen-dependent mRNA expression. *J Androl.* 2009; 30: 669-678.
3. Garantziotis S., Brezina M., Castelnovo P. et al. The role of hyaluronan in the pathobiology and treatment of respiratory disease // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 310, L785-795.
4. Hahn F.F., Scott B., Lundgren D.L. Comparative stochastic effects of alpha, beta or x-irradiation of the lung of rats // *Health Phys* 2010; 99: 363-366.
5. Imanaka T., Endo S., Tanaka K., et al. Gamma-ray exposure from neutron-induced radionuclides in soil in Hiroshima and Nagasaki based on DS02 calculations // *Radiat Environ Bioph* 2008; 47: 331-336.
6. Kairkhanova Y., Saimova A., Uzbekov D. et al. Changes in mRNA genes expression in the lungs tissue of the rats exposed to dispersed neutron-activated  $^{56}\text{MnO}_2$  powder: first results of international study. *Rad Risk* 2017; *In press.*
7. Li Y., Rahmanian M., Widstrom C. et al. Irradiation-induced expression of hyaluronan (HA) synthase 2 and hyaluronidase 2 genes in rat lung tissue accompanies active turnover of HA and induction of types I and III collagen gene expression // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23, 411-418.
8. Scott B.R., Hahn F.F., Snipes M.B. et al. Predicted and observed early effects of combined alpha and beta lung irradiation // *Health Phys* 1990; 59: 791-805.
9. Shichijo K., Fujimoto N., Uzbekov D. et al., Internal exposure to neutron-activated  $^{56}\text{Mn}$  dioxide powder in Wistar rats—Part 2: Pathological effects // *Radiat Environ Biophys.* 2016; 56: 55–61.
10. Stepanenko V., Ivanov S., Kolyzhenkov T. et al. Irradiation of laboratory animals by neutron activated dust: development and application of the method – first results of international multicenter study // *Radiat Risk.* 2016; 25: 111-125.
11. Stepanenko V., Rakhypbekov T., Otani K. Internal exposure to neutron-activated  $^{56}\text{Mn}$  dioxide powder in Wistar rats—Part 1: Dosimetry // *Radiat Environ Bioph.* 2017; 56: 47-54.
12. Tanaka K, Endo S, Imanaka T, et al. Skin dose from neutron-activated soil for early entrants following the A-bomb detonation in Hiroshima: Contribution from  $\beta$  and  $\gamma$  rays // *Radiat Environ Bioph.* 2008; 47: 323-330.
13. Teder P., Nettelbladt O., Heldin P. et al. Characterization of the mechanism involved in bleomycin-induced increased hyaluronan production in rat lung // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 12:181-9.

## SUMMARY

### EFFECTS OF EXPOSURE TO RADIOACTIVE $^{56}\text{MnO}_2$ POWDER ON HYALURONAN SYNTHASE 2 IN THE LUNGS OF RATS

<sup>1</sup>Kairkhanova Y., <sup>1</sup>Saimova A., <sup>1</sup>Uzbekov D., <sup>1</sup>Chaizhunosova N., <sup>2</sup>Fujimoto N.

<sup>1</sup>Semey State Medical University, Kazakhstan; <sup>2</sup>Hiroshima University, Japan

Manganese-56 ( $^{56}\text{Mn}$ ) is among the predominant radioisotopes produced in soil by neutrons from atomic bombs.

Previously, we examined the effects of the internal exposure of this radioisotope in Wistar rats and reported significant pathological changes in the lung and small intestine. In the present study, we focused on its effects on hyaluronan synthase 2 (Has2) gene expression that may related to pathological changes in the lung. Ten-week-old male Wistar rats were exposed to neutron-activated  $^{56}\text{MnO}_2$  powder, non-radioactive  $\text{MnO}_2$  powder or external  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays (2 Gy, whole body). Animals were examined on days 3, 14, and 60 post-exposure. Absorbed doses in the lung of rats exposed to  $^{56}\text{Mn}$  were 55-110 mGy. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis revealed that  $^{56}\text{Mn}$  exposure significantly reduced the expression of Has2 gene in the lung, while  $\gamma$ -rays did not change it. Our findings suggest that internal exposure to  $^{56}\text{Mn}$ , even at low doses, has a significant biological impact on the lung compared with external radiation.

**Keywords:** manganese-56, residual radiation, internal exposure, lung gene expression.

## РЕЗЮМЕ

### ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАДИОАКТИВНОГО ПОРОШКА $^{56}\text{MnO}_2$ НА ГЕНГИАЛУРОНАН-СИНТАЗЫ ТИПА 2 В ЛЕГКИХ У КРЫС

<sup>1</sup>Кайрханова Ы.О., <sup>1</sup>Саимова А.Ж., <sup>1</sup>Узбеков Д.Е.,  
<sup>1</sup>Чайжунусова Н.Ж., <sup>2</sup>Фуджимото Н.

<sup>1</sup>Государственный медицинский университет города Семей, Казахстан, <sup>2</sup>Университет Хиросимы, Япония

Марганец-56 ( $^{56}\text{Mn}$ ) относится к числу преобладающих радиоизотопов, образующихся после нейтронной активации частиц почвенной пыли после взрыва атомных бомб. Ранее нами исследовано влияние внутреннего облучения данного радиоизотопа у крыс линии Wistar и установлены значительные патологические изменения в легких и тонком кишечнике. Целью исследования явилось определение влияния  $^{56}\text{MnO}_2$  на экспрессию гена гиалуронан-синтазы 2 (Has2), вызывающего патологические изменения в легких. Десятидневные самцы крыс линии Wistar подвергались воздействию нейтронно-активированного порошка  $^{56}\text{MnO}_2$ , нерадиоактивного порошка  $\text{MnO}_2$  и внешнего облучения  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -лучами. Животных исследовали на 3, 14 и 60 сутки после воздействия. Поглощенные дозы в легких крыс, подвергшихся воздействию  $^{56}\text{Mn}$ , составили 55-110 мГр. Анализ количественной обратной транс-

крипционной полимеразной цепной реакции показал, что воздействие  $^{56}\text{Mn}$  значительно уменьшает экспрессию гена Has2 в легких, тогда как  $\gamma$ -лучи его экспрессию не изменяют. Результаты исследования показали, что внутреннее облучение  $^{56}\text{Mn}$  даже при низких дозах, оказывает значительное биологическое воздействие на легкие в сравнении с внешним облучением.

## რეზიუმე

$^{56}\text{MnO}_2$ -ს რადიოაქტიური ფხვნილის ზემოქმედების ეფექტი ჰიალურონან-სინთაზას ტიპი 2 გენზე ვირთაგვების ფილტვებში

<sup>1</sup>ი. კაირხანოვა, <sup>1</sup>ა. საიმოვა, <sup>1</sup>დ. უზბეკოვა,  
<sup>1</sup>ნ. ჩაიჯუნუსოვა, <sup>2</sup>ნ. ფუჯიმოტო

<sup>1</sup>ქ. სემეის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ყაზახეთი; <sup>2</sup>ნიროსიმას უნივერსიტეტი, იაპონია

მანგანუმი-56 ( $^{56}\text{Mn}$ ) მიეკუთვნება იმ უპირატესი რადიოიზოტოპების რიცხვს, რომელიც ნიადაგის მტვრის ნაწილაკების ნეიტრონული აქტივაციის შედეგად წარმოიქმნება ატომური ბომბის აფეთქების შემდეგ. ავტორების მიერ აღრე გამოკვლეულია ამ იზოტოპის შინაგანი გამოსხივების გავლენა Wistar-ის ჯიშის ვირთაგვებზე და დადგენილია მნიშვნელოვანი პათოლოგიური ცვლილებები ფილტვებსა და წერილ ნაწლავში. წარმოდგენილ კვლევაში ყურადღება გამახვილებულია მის გავლენაზე ჰიალურონან-სინთაზას ტიპი 2 გენის (Has2) ექსპრესიაზე, რაც შეიძლება დაკავშირებული იყოს პათოლოგიურ ცვლილებებთან ფილტვებში. Wistar-ის ჯიშის ათი კვირის მამრი ვირთაგვები იმყოფებოდა  $^{56}\text{MnO}_2$ -ის ნეიტრონულ-აქტივირებული ფხვნილის,  $\text{MnO}_2$ -ის არარადიოაქტიური ფხვნილის და გარეგანი  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -სხივების ზემოქმედების ქვეშ. ცხოველები გამოკვლეულია ზემოქმედების შემდეგ მე-3, მე-14 და მე-60 დღეს.  $^{56}\text{Mn}$ -ის ზემოქმედების ქვეშ მყოფი ვირთაგვების ფილტვებში შთანთქმის დოზა შეადგენდა 55-110 მგრ-ს. შებრუნებითი ტრანსკრიპციული პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის რადენობრივმა ანალიზმა აჩვენა, რომ  $^{56}\text{Mn}$ -ის მოქმედება მნიშვნელოვნად ამცირებს Has2-გენის ექსპრესიას ფილტვებში,  $\gamma$ -სხივები კი მას არ ცვლიან. კვლევის შედეგები მიუთითებს, რომ დასხივება  $^{56}\text{Mn}$ -ის მცირე დოზებითაც კი, გარეგანი დასხივებისაგან განსხვავებით, გამოხატულ ბიოლოგიურ გავლენას ახდენს ფილტვებზე.



## THE MECHANISMS OF APOPTOSIS INITIATION IN RATS WITH CHRONIC ENTEROCOLITIS COMBINED WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

Marushchak M., Lisnianska N., Krynytska I., Chornomydz I.

*I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine*

Diabetes mellitus is a multifactorial metabolic disease, characterized by hyperglycemia due to insulin deficiency or insulin resistance [14,28]. Epidemiology of diabetes is influenced by multiple host and environmental factors. Recent data on the prevalence of diseases indicate a steady increase in the number of patients with diabetes mellitus [13]. Prevalence of diabetes is seen to vary in different populations with different ethnic and racial backgrounds. Prevalence of type 2 DM varies greatly across various geographic location and races, e.g. from 10 % in Japan to 40 % in Pima Indians [24]. It has been established that prevalence of diabetes is increasing among the population of the world depending on the region, level of economic development of the country, gender and age. It should be noted that about 75% of these patients live in countries with low and middle income [11]. The constant increase in the prevalence of diabetes in the world and in Ukraine is due to urbanization, aging of the population, stress, an increase in the percentage of obese people, sedentary lifestyles, increased use of foods containing hidden fats and carbohydrates, genetically modified components as well as fastfood [12,15,16]. A large number of experimental studies emphasizes the key role of apoptosis in the pathogenesis of diabetes [21,22,27,29]. The toxic effects of certain chemicals (e.g., alloxan, streptozotocin) that are used to induce diabetes mellitus, are acting through the alkylation of DNA and the formation of toxic compounds such as superoxide anion, peroxy nitrite and nitric oxide. Damaging to DNA and intracellular structures causes necrosis and activates apoptosis of  $\beta$ -cells of the pancreas [4].

The aim of the research - to study the mechanism of cell death initiation in rats with chronic enterocolitis combined with diabetes mellitus induced by streptozotocin.

**Material and methods.** The experiments were performed on 48 white nonlinear mature male rats, which were kept on a standard diet at the vivarium of I. Horbachevsky Ternopil State Medical University. The animals were kept and experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [23].

The animals were divided into 4 groups: the 1<sup>st</sup> - control group (n=12), the 2<sup>nd</sup> - animals with diabetes mellitus (n=12), the 3<sup>rd</sup> - animals with chronic enterocolitis (n=12), the 4<sup>th</sup> - animals with diabetes mellitus and chronic enterocolitis (n=12).

Diabetes mellitus (DM) was modeled by a single intraperitoneal administration of streptozotocin (Sigma Aldrich, USA, at a dose of 60 mg/kg body weight) to animals [19]. Immediately prior to the administration, streptozotocin

was dissolved in 0.1 molar citrate buffer (pH 4.5); The control group received a corresponding amount of citrate buffer. The experiment included animals with glucose level of at least 10.8 mmol/L 2 weeks after streptozotocin administration. Chronic enterocolitis (CEC) was modeled by free access of animals to 1.0% solution of carrageenan in drinking water for 1 month [9, 17]. Euthanasia of animals was performed by heart puncture under deep anesthesia, in accordance with the requirements of the Animal Care Committee [23].

Blood serum and blood leukocyte suspension were used for our investigation. Blood glucose was measured by the method of O-toluidine using the modified reagent [25].

Annexin V (V) binding assays were performed using Annexin V Apoptosis Kit (Sigma Aldrich, USA). Apoptotic cells of blood leukocyte suspension were identified by flow cytometry using flow cytometer Epics XL (Beckman Coulter, USA). To distinguish cells that had lost membrane integrity, propidium iodide (PI) was added to a final concentration of 10 mg/mL before analysis. The results were expressed as a percentage of the total number of cells as follows: live cells - not stained (V/PI<sup>-</sup>), cells with early signs of apoptosis - stained with annexin (V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), cells with late signs of apoptosis - positive double fluorescence staining, cells with signs of necrosis - stained with propidium iodide (V/PI<sup>+</sup>).

Analysis of cell samples to determine reactive oxygen species (ROS) of blood leukocyte suspension was evaluated by the method of flow laser cytometry, using 2.7-dichlorodihydrofluorescein diacetate ("Sigma Aldrich", USA) [2]. The value of the studied parameter was expressed as a percentage (intensity of luminescence per cell).

Concentration of TNF- $\alpha$  in blood serum was determined by solid-phase immunoassay analysis using kit of DRG company (Germany) [26]. To determine the cytokine, the absorbance of the samples was measured by the apparatus "Stat Fax Plus". The concentration of TNF- $\alpha$  was expressed in pg/ml.

Statistical analysis: The results were analysed using Statistica 7.0 software and presented as mean with standard error of mean. The differences between all groups were determined using one-way ANOVA, followed by post hoc Least Significant Difference test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant. Correlation analysis was performed between all the studied indices. Coefficient of linear correlation (r) and its fidelity (p) was calculated that was accordingly denoted in the tables (correlation matrices). If the index r=0 the linkage was considered as absent, in the range 0-0.3 - the linkage was considered as weak correlation, interval of index 0.3-0.7 described

linkage as medium strength and interval 0.7-1.0 pointed to strong correlation interaction. The correlation coefficient was significant at  $p < 0.05$ .

**Results and their discussion.** It has been established that in case of modeling of chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats, the number of annexin-positive cells increased reliably as compared to the control values (Table 1). It was found that the percentage of leukocytes with early signs of apoptosis in experimental group 2 increased reliably by 4.8 times, in group 3 – by 3.1 times and in group 4 – by 5.9 times, compared to the control values. It should be noted that the highest values of  $V^+/PI^-$  leukocytes were detected in group 4, which were higher by 24.2% than those in DM group ( $p < 0.01$ ) and by 88.1% in CEC group ( $p < 0.001$ ). The obtained data indicate an increase in the externalization of phospholipids on the leukocyte surface. The formation of phosphatidylserine hydroperoxides disrupts its interaction with proteins of the cytoskeleton, which facilitates its migration from the inner to the outer side of the membrane bilayer [20]. Phosphatidylserine binds to the cell surface of the annexin V protein, which is determined by cytometry.

The percentage of leukocytes with late signs of apoptosis in experimental group 2 increased reliably by 1.9 times, in group 3 – by 1.5 times and in group 4 – by 2.2 times, compared to the control values. It should be noted that the highest values of  $V^+/PI^+$  leukocytes were detected in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes, which were reliably higher by 50% than those in CEC group. The obtained data indicate the degradation of DNA.

The percentage of leukocytes with signs of necrosis also increased with all experimental models reproduced in the study. It was found that the index of  $V^+/PI^+$  of leukocytes in experimental group 2 increased reliably by 2.6 times, in group 3 – by 1.4 times and in group 4 – by 3.3

times, compared to the control values. It should be noted that the highest values of the percentage of leukocytes with the phenomena of necrosis were detected in group 4, which were higher by 29.1% than those in DM group ( $p < 0.01$ ) and by 137.2% than those in CEC group ( $p < 0.001$ ). The obtained data indicate a disruption in the integrity of the leukocyte membrane.

Taking into account the high values of apoptotic death of cells in case of chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats, the next stage of our work was studying mechanisms for initiating cell death in these pathologies. For this purpose, the level of ROS and the concentration of  $TNF-\alpha$  were determined.

In the group of animals with DM, the percentage of ROS increased by 3.0 times, in the group with CEC – by 2.0 times, and in the group with the CEC combined with DM – by 3.4 times, as compared with the control values (Fig. 1, A) At the same time, the percentage of ROS was the highest in experimental group 4. Against the background of hyperglycemia, various ways of glucose conversion are known to get activated resulting in hyperproduction of ROS [3, 5, 6, 8]. Hridneva S.V. notes that in chronic enterocolitis endothelial functions are impaired, which manifests itself in the activation of free radical oxidation processes against the background of a decrease in the activity of the antioxidant system, which explains the excessive production of ROS [10]. The results presented in experimental group 4 suggest that the activation of free radical oxidation reactions is an important non-specific mechanism for the development of inflammation in the tissues of the small and large intestine in case of diabetes mellitus.

The concentration of  $TNF-\alpha$  in blood serum of experimental group 2 increased by 1.4 times, in group 3 – by 5.3 times and in group 4 – by 8.0 times. At the same time, the value of  $TNF-\alpha$  was higher by 2.8 times, compared to that of DM group and by 51.3% compared to

Table 1. The indices of cell death in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes, Me (Q25–Q75)

Index	Control	DM (group 2)	CEC (group 3)	DM+CEC (group 4)
Alive leukocytes, %	97.21 (96.68;97.64)	88.21* (87.49;89.02)	92.38* (91.73;93.23)	85.28* (84.80;86.01) $p_2 < 0,001$
Leukocytes with early signs of apoptosis, %	2.11 (1,58;2,65)	10.06* (9.40;10.63)	6.64* (6.05;7.33)	12.49* (11.83;12.88)* $p_{1,2} < 0,01$
Leukocytes with late signs of apoptosis, %	0.08 (0.05;0.10)	0.15* (0.12;0.18)	0.12* (0.09;0.14)	0.18* (0.15;0.21) $p_2 < 0,001$
Leukocytes with signs of necrosis, %	0.61 (0.53;0.76)	1.58* (1.41;1.90)	0.86* (0.73;0.98)	2.04* (1.88;2.17) $p_{1,2} < 0,001$

note: \* - The difference between the control and the experimental group is statistically significant ( $p < 0.05-0.001$ );  
 $p_1$  - The reliability value between groups 2 and 4;  $p_2$  - The reliability index between groups 3 and 4

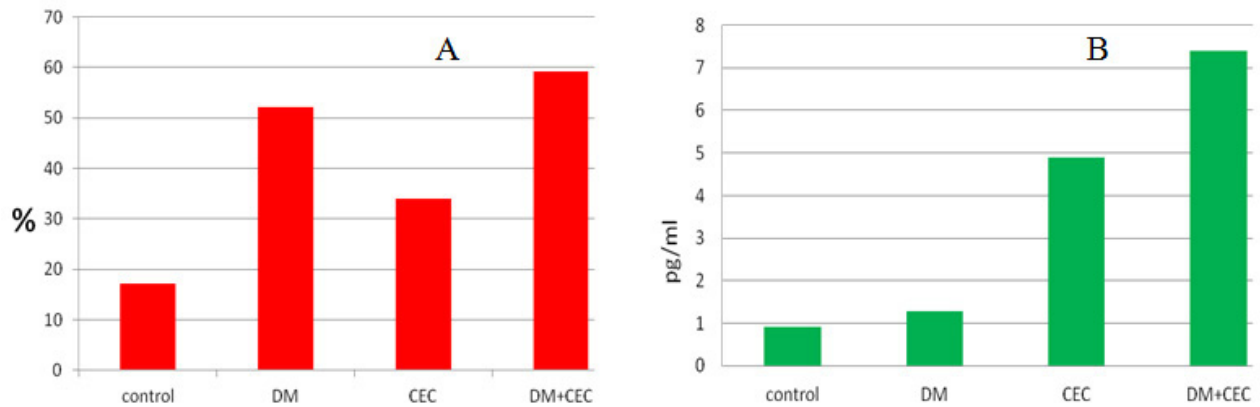


Fig. 1. The results of the percentage of ROS in the leukocyte suspension (A) and the concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  (B) in the blood of control and experimental rats

Table 2. Correlative linkages between the indices of leukocyte cell death, the percentage of ROS and the concentration of TNF- $\alpha$  in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes

Correlations		DM (group 2)	CEC (group 3)	CEC+DM (group 4)
<b>Correlation coefficient, <math>r_{xy}</math></b>				
V <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> leukocytes, %	Percentage of ROS	0.91; p<0.001	0.75; p<0.05	0.86; p<0.01
V <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> leukocytes, %		0.86; p<0.01	0.52	0.89; p<0.001
V <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> leukocytes, %		0.68; p<0.05	0.52	0.64; p<0.05
V <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> leukocytes, %	Concentration of TNF- $\alpha$	0.78; p<0.01	0.92; p<0.001	0.72; p<0.05
V <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> leukocytes, %		0.61	0.64; p<0.05	0.65; p<0.05
V <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> leukocytes, %		0.43	0.69; p<0.05	0.57

note: p – The reliability of the correlation coefficient

CEC group (Fig. 1, B). Therefore, TNF- $\alpha$  is very important in the development of both DM and CEC. Cytokines are known to be produced by a large number of cells (monocytes, macrophages, T and B cells) and are markers of the inflammatory process that develops in both pathologies. Chronic hyperglycemia can directly contribute to inflammation, where increased cytokine concentrations lead to the destruction of pancreatic beta cells and damage to the endocrine function of the pancreas in types 1 and 2 diabetes mellitus [7]. The mechanisms by which TNF- $\alpha$  initiates and enhances inflammation in the intestine are very complex and have so far been poorly understood. A direct negative effect of TNF- $\alpha$  is associated with damaging enterocytes, which leads to increased permeability of the epithelium. In addition to direct effects on the integrity of the intestinal epithelial barrier, TNF is a powerful inducer of matrix metalloproteinases in stromal cells of the intestine; it induces the production of keratinocyte growth factor, leading to hyperplasia of crypts and causing increased expression of the major histocompatibility, complex class II antigens [18].

In diabetes mellitus, advanced glycation end products have a damaging effect on the DNA of cells and tissues, accumulating in ganglia, villi and membranes of enterocytes of the jejunum and ileum [1]. The development of chronic carrageenan-induced enterocolitis in case of diabetes is characterized by a more pronounced inflammatory syndrome.

Analysing the correlations suggests that in case of streptozotocine-induced diabetes, hyperproduction of ROS causes initiation and death of leukocytes by apoptosis and necrosis types, while TNF- $\alpha$  is involved in the initiation of apoptotic death (Table 2). In case of chronic enterocolitis in rats, the initiation and implementation of cell death is reliably associated with an increase in the concentration of TNF- $\alpha$ , whereas reactive oxygen species have an effect on the enhancement of the externalization of phospholipids on the surface of leukocytes. Both free radical processes and the inflammatory process take part in the development of apoptotic death of leukocytes in case of chronic enterocolitis combined with streptozotocine-induced diabetes, but a stronger association is established with reactive oxygen species (Table 2).

**Conclusions.** 1. Development of chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats is accompanied by an increase in the number of leukocytes with signs of apoptosis: the percentage of V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> leukocytes is greater by 24.2%, as compared to the group with diabetes (p<0.01) and by 88.0%, compared to that with chronic enterocolitis (p<0,001); The value V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> of leukocytes exceeds the results of the CEC-group by 50.0%.

2. The factors causing apoptotic death in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes include reactive oxygen species ( $r_{xy}=0,86$ ; p<0,01) and tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $r_{xy}=0,72$ ; p<0,05); but a stron-

ger association is established with reactive oxygen species.

**Conflict of interest statements.** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## REFERENCES

1. Babu K, Babu S, Walker J, Walker AB, Pappachan JM. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus // *World J Diabetes*. – 2013. – V. 4(3): 51–63.
2. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation // *J Immunol*. -1983. – V. 130(4): 1910–1917.
3. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. - 2006. – V. 290(1): 1–8.
4. Daisy M, Rashmi V, Akila G, Gunasekaran S. Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets // *Microsc Res Tech*.- 2004. – V. 63(5): 274–281.
5. Drel VR. The main mechanisms of the onset and development of diabetic complications: the role of nitrate stress // *Biological Studies*. – 2010. - V. 4(2): 141–158.
6. Drummond GR, Selemidis S, Sobey CG Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets // *Nat Rev Drug Discov*. – 2011. - 10(6): 453–471.
7. Francés DE, Ingaramo PI, Ronco MT, Carnovale CE. Diabetes, an inflammatory process: Oxidative Stress and TNF-alpha involved in hepatic complication // *J Biomedical Science and Engineering*. – 2013. –V. 6: 645–653
8. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circ Res*. -2010. – V.107(9): 1058–1070.
9. Gubina-Vakulik GI, Koluseva NG, Ivanenko TO, Korobchansky VO, inventor; Kharkiv National Medical University, assignee. Method of modeling chronic gastroenterocolitis. Ukraine patent A201014510. 2012 Jan 25.
10. Hridneva SV, The role of nitric oxide and lipoperoxidation processes in the development of chronic non-ulcerative colitis // *Modern Gastroenterology*. – 2003. -№ 2: 43–46.
11. Hwang CK, Han PV, Zabetian A, Ali MK, Narayan KMV. Rural diabetes prevalence quintuples over twenty-five years in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis // *Diabetes Res Clin Pract*. – 2012. – V. 96(3): 271–285.
12. ICES Atlas Primary care in Ontario. Chapter 12. Indicators of Primary care based on administrative data. – Ontario, 2011; 210.
13. International Diabetes Federation. IDF Diabetic Atlas 7th Edition. <http://www.idf.org/idf-diabetes-atlas-seventh-edition>. Accessed 30 Aug 2016.
14. Kajaia M, Butsashvili M, Gulbiana L, Khatiashvili Kh, Knowledge, Attitude Toward Disease and Practice Survey on Diabetes in Gardabani District // *Georgian Medical News*. – 2016. - №9(258): 68–72.
15. Lippincott W, Lippincott W. Diabetes Management in the Primary Care Setting/ 2nd Edition. - Unger, Jeff , 2013; 473.
16. Marushchak M, Krynytska I, Milevska L, Miz A, Mialiuk O. The changes of activity of effector caspase cascade components in case of alimentary obesity in rats // *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2017; 16(2): 188–193.
17. Moyana TN, Lalonde JM. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat-a model for inflammatory bowel disease // *Ann Clin Lab Sci*. 1990; 20(6): 420–426.
18. Mueller C. Tumour necrosis factor in mouse models of chronic intestinal inflammation // *Immunology*. 2002; 105(1): 1–8.
19. Ordodi VL, Paunescu V, Ionac M, et al. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes // *Artificial organs*. 2008; 32(1): 66–70.
20. Petrishchev NN, Vasina LV, Lugovaya AV. The content of soluble markers of apoptosis and circulating annexin of V-linked apoptotic cells in the blood of patients with acute coronary syndrome // *Bulletin of St. Petersburg University*. 2008; 1: 14–23.
21. Pisarev VB, Snigur GL, Spasov AA, et al. Mechanisms of toxic action of streptozotocin on pancreatic  $\beta$ -cell islets // *Bull Exper Biol and Med*. 2009; 148(12): 700–702.
22. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus // *Diabet Med*. 2005; 22(4): 359–370.
23. Reznikov O. General ethical principles of experiments on animals // *Endokrynology*. 2003; 8(1): 142–145.
24. Riyaz MSU, Rather MK, Koul PA. Diabetes in Immigrant Tibetan Muslims in Kashmir // *North India J Immigrant Minority Health*. 2017; 5(1): 18–30.
25. Sasaki T, Matsy S, Sorae A. Effect of acetic acid concentration on the color reaction in the O-toluidine boric acid method for blood glucose estimation. Japanese // *Journal of Clinical Chemistry*. 1972; 1: 346–353.
26. Sennikov SV, Silkov AN. Methods for determining cytokines // *Cytokines and Inflammation*. 2005; 4(1): 22–27.
27. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview // *Indian J Med Res*. 2007; 125(3): 451–472.
28. Tripathy JP, Thakur JS, Jeet G, Chawla S, Jain S, Pal A, Saran R, Saran P. Prevalence and risk factors of diabetes in a large community-based study in North India: results from a STEPS survey in Punjab, India // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2017; 9:8.
29. Islam S, Loots DT. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review // *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2009; 4(31): 249–261.

## SUMMARY

### THE MECHANISMS OF APOPTOSIS INITIATION IN RATS WITH CHRONIC ENTEROCOLITIS COMBINED WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

**Marushchak M., Lisnianska N., Krynytska I., Chornomydz I.**

*I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine*

Diabetes mellitus is a multifactorial metabolic disease, characterized by hyperglycemia due to insulin

deficiency or insulin resistance. A large number of experimental studies emphasizes the key role of apoptosis in the pathogenesis of diabetes. A deeper understanding of the apoptosis mechanisms, identifying of the predictors that positively or negatively influence on the cell death initiation, the correlation between some indices will improve therapeutic strategies for patients with diabetes and comorbidities, which makes the actuality of this study.

The aim of the research was to study the mechanism of cell death initiation in rats with chronic enterocolitis combined with diabetes mellitus induced by streptozotocin.

The experiments were performed on 48 white nonlinear mature male rats. The animals were divided into 4 groups: the 1<sup>st</sup> – control group (n=12), the 2<sup>nd</sup> - animals with diabetes mellitus (n=12), the 3<sup>rd</sup> - animals with chronic enterocolitis (n=12), the 4<sup>th</sup> - animals with diabetes mellitus and chronic enterocolitis (n=12). Apoptotic cells of blood leukocyte suspension and reactive oxygen species were identified by flow cytometry method.

Correlation analysis was performed between all the studied indices. Coefficient of linear correlation (r) and its fidelity (p) was calculated that was accordingly denoted in the tables (correlation matrices). The correlation coefficient was significant at  $p < 0.05$ .

Development of chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats is accompanied by an increase in the number of leukocytes with signs of apoptosis: the percentage of V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> leukocytes is greater by 24.2%, as compared to the group with diabetes ( $p < 0.01$ ) and by 88.0%, compared to that with chronic enterocolitis ( $p < 0.001$ ); The value V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> of leukocytes exceeds the results of the chronic enterocolitis-group by 50.0%.

Conducted correlative analysis showed that in case of chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes both free radical oxidation processes and the inflammatory process take part in the development of apoptotic death of leukocytes, but a stronger association is established with reactive oxygen species.

**Keywords:** chronic enterocolitis, diabetes, apoptosis, reactive oxygen species, correlation.

## РЕЗЮМЕ

### МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ АПОПТОЗА У КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНТЕРОКОЛИТОМ НА ФОНЕ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА

Марущак М.И., Лиснянская Н.В., Криницкая И.Я., Черномыдз И.Б.

Тернопольский государственный университет им. И. Горбачевского, Украина

Целью исследования явилось изучение механизмов инициирования клеточной смерти у крыс с

хроническим энтероколитом в сочетании с сахарным диабетом, вызванным стрептозотоцином.

Эксперименты проводились на 48 белых нелинейных зрелых крысах-самцах. Животные были разделены на 4 группы: I - контрольная группа (n=12), II - животные с сахарным диабетом (n=12), III - животные с хроническим энтероколитом (n=12), IV - животные с сахарным диабетом и хроническим энтероколитом (n=12). Апоптотические клетки суспензии лейкоцитов крови и активные формы кислорода идентифицированы методом проточной цитометрии.

Корреляционный анализ проводился между всеми изученными показателями. Вычислен коэффициент линейной корреляции (r) и его вероятность (p). Коэффициент корреляции считался значимым при  $p < 0,05$ .

Развитие хронического энтероколита в сочетании с индуцированным стрептозотоциновым диабетом у крыс сопровождается увеличением количества лейкоцитов с признаками апоптоза: процент V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> лейкоцитов больше на 24,2% в сравнении с группой с диабетом ( $p < 0,01$ ) и на 88,0% в сравнении с группой с хроническим энтероколитом ( $p < 0,001$ ). Величина V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> лейкоцитов при сочетании исследуемых заболеваний превышает результаты группы с хроническим энтероколитом на 50,0%.

Проведенный корреляционный анализ показал, что в случае хронического энтероколита в сочетании с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, в процессе развития апоптотической гибели лейкоцитов участвуют как свободнорадикальное окисление, так и воспалительный процесс, однако с активными формами кислорода выявлена более сильная корреляционная связь.

## რეზიუმე

აპოპტოზის ინიციაციის მექანიზმები ვირთავებში ქრონიკული ენტეროკოლიტით სტრეპტოზოტოცინ-ინდუცირებული დიაბეტის ფონზე

მ. მარუშჩაკი, ნ. ლისნიანსკაია, ი. კრინიცკაია, ი. ჩერნომიძე

ი. გორბაჩევსკის სახ. ტერნოპილის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, უკრაინა

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა უჯრედის სიკვდილის მექანიზმების კვლევა ვირთავებში ქრონიკული ენტეროკოლიტით და სტრეპტოზოტოცინ-ინდუცირებული დიაბეტით. ექსპერიმენტები ჩატარდა 48 თეთრ ზრდასრულ მდედრ ვირთავაზე. ცხოველები დაიყო 4 ჯგუფად: I – საკონტროლო (n=12), II - ცხოველები შაქრიანი დიაბეტით (n=12), III - ცხოველები ქრონიკული ენტეროკოლიტით (n=12), IV - ცხოველები შაქრიანი დიაბეტით და ქრონიკული ენტეროკოლიტით (n=12). ლეიკოციტების სუსპენზიის აპოპტოზური

უჯრედები და ჟანგბადის აქტიური ფორმები იდენტიფიცირებული იყო გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდით. კორელაციური ანალიზი ჩატარდა ყველა შესწავლილ პარამეტრს შორის. გამოთვლილია ხაზოვანი კორელაციის კოეფიციენტი (r) და მისი ალბათობა (p). კორელაციის კოეფიციენტი სარწმუნოდ ითვლებოდა  $p < 0.05$ -ის შემთხვევაში.

სტრეპტოზოტოცინ-ინდუცირებულ დიაბეტთან შერწყმული ქრონიკული ენტეროკოლიტის განვითარებას ვირთაგვებში თან ახლავს აპოპტოზის ნიშნების მქონე ლეიკოციტების რაოდენობის ზრდა;  $V^+/PI$ -ლეიკოციტების რაოდენობა,

დიაბეტის ჯგუფთან შედარებით, მეტია 24,2%-ით ( $p < 0.01$ ), ქრონიკული ენტეროკოლიტის ჯგუფთან შედარებით კი - 88,0%-ით ( $p < 0.001$ ).

ჩატარებული კორელაციური ანალიზის მეშვეობით გამოავლინდა, რომ სტრეპტოზოტოცინ-ინდუცირებულ დიაბეტთან შერწყმული ქრონიკული ენტეროკოლიტის დროს ლეიკოციტების აპოპტოზური კვდომის პროცესის განვითარებაში მონაწილეობს როგორც თავისუფალ რადიკალური ჟანგვის, ასევე, ანთებითი პროცესები, თუმცა, ჟანგბადის აქტიურ ფორმებთან გამოხატულია უფრო ძლიერი კორელაციური კავშირი.

## GENERAL HEALTH STATUS AMONG FIREFIGHTERS AND RESCUE OPERATIONS WORKERS

**<sup>1</sup>Ibrayeva A., <sup>1</sup>Turdaliev B., <sup>1</sup>Aimbetova G., <sup>2</sup>Pleva L.**

*<sup>1</sup>Kazakh National Medical University named after S. D. Asfendiyarov, Department of Policy and Management of Health Care with a Course of the Medical Right and Forensic Medicine, Almaty, Kazakhstan;*

*<sup>2</sup>Traumatology Centre, University Hospital Ostrava, Czech Republic*

Implementation of the state and target (departmental) programs providing protection of the population and territories against emergency situations of natural and technogenic character places great demands on a state of health of staff of rescue services of the Republic of Kazakhstan.

Work of staff of rescue services belongs to dangerous types of work and is characterized by high risk of loss of health and life. The expert of a dangerous profession is a professional with high, very high and exclusively high risk level of death owing to professional activity ( $10^{-5}$ - $10^{-2}$  in an hour or  $10^{-3}$ -more than  $10^{-2}$  in a year) at which implementation it is necessary to take security measures and protection [11].

Annually 96% of emergency situations of technogenic character in the Republic of Kazakhstan make the production and household fires, 14,5 thousand fires on average are registered [5]. The adverse, and at times and extreme working conditions connected with mitigation of consequences of the fires have significant effect on the level of health and professional reliability of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations.

Conditions of performance of professional duties of staff of service of fire extinguishing department are various: high deviations in temperatures, limited visibility, strong concentration of smoke, toxic agents, etc. According to data of literature at fire extinguishing and elimination of its consequences the organism of the rescuer is exposed to toxic influence of mix of particles, carbon monoxide, polycyclic aromatic hydrocarbons that leads to sharp pulmonary dysfunctions [12,13,17], and serves change of warm rhythm, vascular tone [16,20], aggregate state of blood [15], dehydration of an organism [18,19] as risk for development of cardiovascular diseases [13]. Only after two

hours after fire extinguishing the rescuers obtain the initial level of indicators of arterial pressure, warm rhythm and body temperature is restored [18,19]. All this is followed by continuous threat to life and to health: collapses of the burning designs, explosions of vapors and gases, poisoning with the toxic agents which are emitted as a result of burning are possible. At a third of persons whose professional activity is connected with high risk, the nonspecific deviations which are followed by moderate decrease in functional reserves of an organism, a condition of psychological tension and in general, tension of mechanisms of adaptation [2,3,9,10] can be observed. High frequency of occurrence of depression and post-traumatic mental disorders is noted at liquidators of consequences of crash of the New York shopping center [14].

Character and weight of the leading pathology at rescuers and firefighters is defined by intensity of professional activity and reaches the maximum values at length of service of the 2nd and more than 6 years that is caused by violation of adaptable mechanisms during these periods [7].

Modern medical literature on problems of the state of health of staff of rescue services is small and devoted, generally to studying of influence of factors of professional activity [1,4,6,8].

Thus, the problem of preservation of health and ensuring reliability of professional activity of staff of rescue services is one of the leading problems of social hygiene, public health and health care.

Research objective: to study the state of health of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department for definition of the priority directions of rendering the treatment-and-prophylactic help and rehabilitation of employees.

**Materials and methods.** By means of an information and analytical method the retrospective analysis of reports about the registered diseases, their result and the reasons of temporary disability of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department of Department on emergency situations of Almaty in 2011-2016 is carried out.

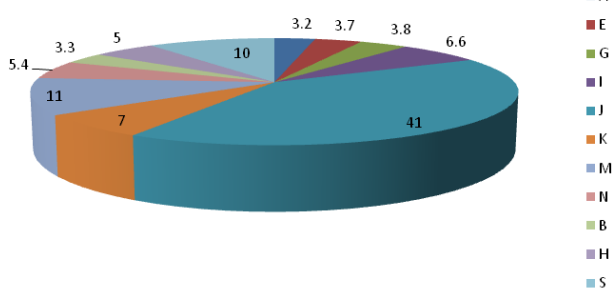
The average annual number of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department for the specified period made 1,3 thousand people, of them 87% - are men, 13% - are women. Absolute quantity of primary diseases for the studied period - 3406, days away from work - 85116 days.

Statistical processing of the received results of research is carried out by means of Student's t-criterion.

**Results and their discussion.** In structure of the general incidence of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department the main classes of diseases were ranged as follows: the 1st place (41%) - diseases of respiratory organs; the 2nd place (11%) - diseases of bone and muscular system and connective tissue; the 3rd place (10%) - injuries, poisonings and some other consequences of influence of the external reasons.

The share of diseases of digestive organs, the blood circulatory systems, urinogenital system, diseases of an eye and its appendages made from 7 to 5% - the 4th and 7th place respectively.

The listed 7 classes of diseases made 84,0% of the general incidence of staff of service of fire extinguishing department. Level of primary incidence in this group decreased statistically authentically (in relative sizes of presentation - by 45),  $p < 0,001$ .



*A – some infectious and parasitic diseases; B – viral infections; E – diseases of endocrine system; G - diseases of nervous system; H – diseases of an eye and its appendages; I – diseases of blood circulatory systems; J – diseases of respiratory organs; K – diseases of digestive organs; M – diseases of bone and muscular system; N – diseases of urinogenital system; S – injuries, poisonings and some other consequences of influence of the external reasons.*

*Fig. Structure of the general incidence of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department*

Level of the general incidence of staff of service of fire extinguishing department during supervision decreased

statistically significantly (in relative sizes of presentation - by 67),  $p < 0,001$ .

In structure of primary incidence of staff of service of fire extinguishing department with the most significant classes there were diseases of respiratory organs (57%); injuries, poisonings and some other consequences of influence of the external reasons (16%); diseases of bone and muscular system and connecting tissue (6%). The share of diseases of urinogenital system, system of a blood circulation, digestive organs made 3%. The listed 4 classes of diseases made 87,3% of primary incidence of staff of service of fire extinguishing and rescue operations department.

Average annual level of days away from work also statistically significantly decreased in dynamics ( $p < 0,001$ ). In structure of days away from work the 1st place was taken by diseases of respiratory organs (36%); the 2nd place - injuries, poisonings and some other consequences of the external reasons (23%); the 3rd place - diseases of bone and muscular system and connecting tissue (10%). Places from the 4th to the 6th were taken by pregnancy, childbirth and the postnatal period, diseases of the blood circulatory system and illnesses of a gastrointestinal tract. Their share in structure of the general incidence made from 6 to 4,6%. The specified 6 classes of diseases gave 86,0% of all days away from work.

Dynamics of level of an invalidization of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department for the specified period was not statistically reliable. At the same time blood circulatory system diseases - 47,2% were the most frequent reasons resulting in disability; diseases of bone and muscular system and connecting tissue - 11,1; tuberculosis, diseases of endocrine system and blastemas - by 8,3%. The specified 3 classes of diseases made 88,9% of total of cases of disability of staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department.

Dynamics of death rate was also not statistically reliable. In structure of mortality by classes of diseases 50% of cases fell to the share of death of firefighters from injuries; 21,4% - to mortality from blastemas; 20% of cases - to coronary heart disease mortality. The share of diseases of endocrine system, diseases of blood and pneumonia made 3,6%. Specified classes of diseases defined death rate of employees.

In structure of the general, primary incidence and days away from work diseases of respiratory organs had the greatest importance (X class). Dynamics of primary incidence of diseases of this class during supervision had wavy character with statistically reliable decrease (in presentation indicators - by 43),  $p < 0,001$ .

Injuries, poisonings and some other consequences of influence of the external reasons (the XIX class) took an important place in structure of mortality, primary incidence and days away from work of the staff of service of fire extinguishing and accident rescue operations department. For the studied period statistically significant decrease in

Table. Medical and static indicators of the state of health of staff of service of fire extinguishing and accident rescue service of Department on emergency situations of Almaty in 2011-2016, %

Year	Incidence		Cases of days away from work	Days away from work	Disability	Mortality
	The general	primary				
Indicators of a state of health according to 19 classes of diseases						
2011	1045,02	624,34	756,97	11159,38	1,61	1,01
2012	760,27 ***	474,77 ***	591,46 ***	9308,62 ***	0,68	1,21
2013	734,87 *	493,73	580,95	8342,68 ***	0,71	0,36
2014	669,67 ***	408,57 ***	565,72	8378,86	1,67	1,27 **
2015	714,50 ***	408,82	564,47	8521,98 *	0,63	0,25 *
2016	550,26 **	344,55 ***	378,28 ***	4872,98 ***	0,46	0,34
Average annual data	745,77	459,13	572,98	8430,76	0,96	0,74
CLASS IX. Blood circulatory system diseases						
2011	48,88	8,68	29,52	408,13	1,01	-
2012	50,30	6,76	31,76	495,19 ***	-	-
2013	57,69 *	18,99 ***	33,51	496,16	-	-
2014	40,11 ***	11,62 *	23,52 **	399,81 ***	1,03	0,51
2015	62,04 ***	14,66	42,71 ***	675,90 ***	0,25	0,12
2016	38,84 ***	9,89 **	21,34 ***	360,22 ***	-	-
Average annual data	49,64	11,77	35,82	472,57	0,38	0,11
CLASS X. Diseases of respiratory organs						
2011	391,40	352	365,13	4644,69	-	-
2012	318,30 ***	288 ***	301,78 ***	3482,17 ***	-	-
2013	212,83 ***	202 ***	211,51 ***	2714,93 ***	-	-
2014	302,54 ***	216	285,41 ***	2868,45 *	-	-
2015	290,01	249 ***	260,25 ***	2667,63 **	-	-
2016	233,44 ***	202 ***	171,74 ***	1833,65 ***	-	0,11
Average annual data	291,42	251,43	242,81	3035,25	-	0,02
CLASS XIII. Diseases of bone and muscular system and connecting tissue						
2011	87,28	21,19	85,23	1082,08	0,20	-
2012	78,06	19,76	59,21 ***	864,91 ***	-	-
2013	83,12	49,80 ***	52,56	549,75 ***	0,36	-
2014	67,27	22,03 ***	65,02 ***	1015,32 ***	0,13	-
2015	97,13 ***	19,05	76,52 *	1069,68	0,13	-
2016	67,09 ***	33,61 ***	36,9 ***	566,13 ***	-	-
Average annual data	79,99	27,57	62,5	857,98	0,14	-
CLASS XIX. Injuries, poisonings and some other influences of external environment						
2011	149,73	139,89	140,21	2761,05	-	0,40
2012	89,16 ***	86,50 ***	88,75 ***	2087,53 ***	0,17	0,87
2013	85,94	84,92	85,01	1988,55 ***	-	-
2014	89,01	84,04	87,65	2023,46 ***	-	0,64
2015	39,73 ***	39,35 ***	39,73 ***	2204,29 *	-	0,13
2016	39,58	34,06	35,01	782,06 ***	-	0,11
Average annual data	77,52	78,13	76,35	1974,49	0,03	0,39

note: In comparison with previous year: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



level of traumatism was observed. Average rate of decrease is 29% per year (in presentation indicators – by 76),  $p < 0,001$ . In only 6 years of supervision 12 cases of death from injuries, poisonings and some other consequences of influence of the external reasons have been registered.

Diseases of bone and muscular system and connecting tissue (the XIII class) were significant in structure of the general and primary incidence, days away from work and disability. Dynamics of primary incidence of diseases of this class had wavy character with statistically significant growth ( $p < 0,01$ ).

Blood circulatory system diseases (the IX class) were the most significant reasons of disablement. The essential role belonged to this class of diseases and in structure of mortality. Primary incidence of blood circulatory system diseases, in general, increased ( $p < 0,001$ ). In total 15 cases of disablement and 4 cases of mortality owing to diseases of the IX class were registered. Statistically significant dynamics of indicators of disablement and mortality for the analyzed period is not revealed.

The conducted research allowed to establish classes of the diseases representing the greatest importance for this contingent basic of which are: diseases of respiratory organs, bone and muscular system and connecting tissue, blood circulatory system, trauma, poisoning and some other consequences of influence of the external reasons.

Studying of structure of incidence, days away from work, disability and mortality of employees allowed to establish that the high level of primary incidence is characteristic of the staff of service of fire extinguishing and accident rescue services department. Despite essential decrease in incidence and days away from work, indicators of disablement and mortality in dynamics significantly did not change.

The analysis of indicators of the state of health of staff of service of fire extinguishing and accident rescue services department on the main classes of diseases in dynamics showed the remaining relevance of diseases of respiratory organs and traumatism, and also growth of primary incidence of diseases of the blood circulatory system, bone and muscular system and connecting tissue that testifies to need of active work on prevention of these diseases. Absence of statistically significant dynamics of disablement from diseases of the blood circulatory system, bone and muscular system and connecting tissue, and also absence of dynamics of mortality from cardiac vascular diseases defines expediency of their early identification and adequate treatment.

Thus, studying of the state of health of staff of service of fire extinguishing and rescue services allowed to establish the priority directions of rendering the treatment-and-prophylactic help and rehabilitation, namely:

- primary prevention of diseases of respiratory organs, blood circulatory systems and injury prevention;
- timely diagnostics and treatment of diseases of the blood circulatory system, bone and muscular system and connecting tissue, digestive organs and blastomas;

- the complex medical and psychological rehabilitation directed to restoration of the lost professional qualities and working capacity and the prevention of disability of staff of service of fire extinguishing and accident rescue services.

Definition of the priority directions of rendering the treatment-and-prophylactic help and rehabilitation of the specified contingent is essential, both from the position of professional longevity, and from the position of increase of professional reliability of staff of rescue services.

## REFERENCES

1. Алексанин С.С., Астафьев О.М. Состояние здоровья специалистов опасных профессий МЧС России//Матер. междунар. науч.-практич. конф. «Медико-психологическая помощь в чрезвычайных ситуациях». Спб:ВЦЭРМ, 2010.С3-11.
2. Белевитин А.Б. Современные взгляды на медицинскую реабилитацию лиц опасных профессий / Белевитин А.Б., Фесюн А.Д., Божченко А.А., Сухонос Ю.А., Федосеев В.М. // Медицина катастроф. - 2011. - № 2. - С. 14-17.
3. Бодурова Д.Ф. Исследование адаптивных способностей пожарных-спасателей в условиях чрезвычайных ситуаций // Наука и бизнес: пути развития. – 2012. – № 6(12). –С. 14–20.
4. Гребенюк А.Н., Кушнир Л.А. Оценка профессионального риска здоровью пожарных от воздействия химических веществ//Медиц. труда и промышлен. экология.2010.№ 12.С.10-14.
5. Комитет по чрезвычайным ситуациям Министерства внутренних дел Республики Казахстан. Официальный Интернет-ресурс / emer.gov.kz.
6. Кушнир Л.А., Бояринцев В.В, Гребенюк А.Н. Обьективная оценка профессионального химического риска и его восприятие сотрудниками Государственной противопожарной службы//Воен.-мед. журн. 2009.Т.330.№2.С.63-64.
7. Михайлова Л.А. Гигиенические и физиологические аспекты деятельности специалистов экстремальных профессий.//Фундаментальные исследования.- 2014. - №10. С.- 1627-1628.
8. Порошин А.А. Состояние заболеваемости и объема боевой работы сотрудников ГПС МЧС России по субъектам Российской Федерации: Информ.-аналит. обзор /Всерос. науч.-исслед. ин-т противопожарн. обороны МЧС Росс.М.:ВНИИПО, 2005.С.52.
9. Преображенский В.Н. Возможность ранней диагностики адаптационных нарушений у лиц опасных профессий / В.Н.Преображенский, Т.В. Беганова, Г.Е.Филиппова // Развитие санаторно-курортной помощи, восстановительного лечения и медицинской реабилитации: Всероссийский форум. – М., 2010. – С. 503–504.
10. Пронина Г.А. Оценка изменений личностных характеристик и качества жизни, ассоциированных с метаболическим синдромом, у спасателей МЧС Рос-

- сии / Г.А. Пронина, Е.Д. Пятибрат, С.С. Бацков и др. // Вестник психотерапии. – 2013. – № 48 (53). – С. 52–56.
11. Санников М.В., Андреев А.А. Характеристика состояния здоровья спасателей и специалистов Государственной противопожарной службы МЧС России // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2007. №1. С.19-26.
12. Banes C.J. Firefighters' cardiovascular risk behaviors // Workplace Health Saf. – 2014. – Jan; № 62(1). – P. 27–34.
13. Baxter C.S. Exposure of Firefighters to Particulates and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons/ C.S. Baxter, J.D. Hoffman, M.J. Knipp et al. // J. Occup. Environ. Hyg. 2014 – Feb. – 10.
14. Biggs Q.M. Acute stress disorder, depression, and tobacco use in disaster workers following 9/11/ Q.M. Biggs, C.S. Fullerton, J.J. Reeves et al. // Am. J. Orthopsychiatry. – 2010. – Oct; № 80(4). – P. 586–92.
15. Burgess J.L., Acute cardiovascular effects of firefighting and active cooling during rehabilitation / J.L. Burgess, Hu C. Duncan // J. Occup. Environ. Med. – 2012. – Nov; № 54(11). – P. 1413–20.
16. Choi B. Very Long (> 48 hours) Shifts and Cardiovascular Strain in Firefighters: a Theoretical Framework / B. Choi, P.L. Schnall, M. Dobson et al. // Ann. Occup. Environ. Med. – 2014. – Mar 6; № 26(1). – P. 5.
17. Gaughan D.M. Exposures and Cross-shift Lung Function Declines in Wildland Firefighters / D.M. Gaughan, C.A. Piacitelli, B.T. Chenet et al. // J. Occup. Environ. Hyg. – 2014.
18. Horn G.P. Quantifying dehydration in the fire service using field methods and novel devices / G.P. Horn, J. DeBlois, I. Shalmyeva et al. // Prehosp. Emerg. Care. – 2012. – Jul-Sep; № 16(3). – P. 347–55.
19. Horn G.P. Physiological recovery from firefighting activities in rehabilitation and beyond / G.P. Horn, S. Gutzmer, C.A. Fahs et al. // Prehosp. Emerg. Care. – 2011. – Apr-Jun; № 15(2). – P. 214–25.
20. Ratchford E.V. Usefulness of Coronary and Carotid Imaging Rather than Traditional Atherosclerotic Risk Factors to Identify Firefighters at Increased Risk for Cardiovascular Disease / E.V. Ratchford, K.A. Carson, S.R. Jones et al. // Am. J. Cardiol. – 2014. – Feb 12.

## SUMMARY

### GENERAL HEALTH STATUS AMONG FIREFIGHTERS AND RESCUE OPERATIONS WORKERS

<sup>1</sup>Ibrayeva A., <sup>1</sup>Turdaliev B., <sup>1</sup>Aimbetova G., <sup>2</sup>Pleva L.

<sup>1</sup>Kazakh National Medical University named after S. D. Asfendiyarov, Department of Policy and Management of Health Care with a Course of the Medical Right and Forensic Medicine, Almaty, Kazakhstan; <sup>2</sup>Traumatology Centre, University Hospital Ostrava, Czech Republic

Research objective - to study the state of health of staff of service of fire extinguishing and accident rescue

services department for definition of the priority directions of rendering the treatment-and-prophylactic help and rehabilitation of employees.

By means of an information and analytical method the retrospective analysis of reports about the registered diseases, their result and the reasons of temporary disability of staff of service of fire extinguishing and accident rescue services department of Department on emergency situations of Almaty in 2011-2016 has been carried out. Statistical processing of the received results of research is carried out by means of Student's t-criterion.

The conducted research showed that the high level of primary incidence is characteristic of the staff of service of fire extinguishing and accident rescue services department, at the same time the most significant are diseases of respiratory organs, traumas, poisoning and some other consequences of influence of the external reasons, diseases of bone and muscular system and connecting tissue, blood circulatory system illness.

Studying of the state of health of staff of service of fire extinguishing and rescue services allowed to establish the priority directions of rendering the treatment-and-prophylactic help and rehabilitation. Their contents are defined by need of concentration of efforts on prevention, treatment and rehabilitation of the most widespread diseases causing the maximum damage to health.

**Keywords:** health of firefighters, workers of the accident rescue operations, prevention, rehabilitation.

## РЕЗЮМЕ

### СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ СОТРУДНИКОВ СЛУЖБЫ ПОЖАРОТУШЕНИЯ И АВАРИЙНО-СПАСАТЕЛЬНЫХ РАБОТ

<sup>1</sup>Ибраева А.Ш., <sup>1</sup>Турдалиева Б.С., <sup>1</sup>Аимбетова Г.Е., <sup>2</sup>Плева Л.

<sup>1</sup>Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, кафедра политики и управления здравоохранением с курсом медицинского права и судебной медицины, Алматы, Казахстан; <sup>2</sup>Университетская больница Острава, Травматологический центр, Чехия

Целью исследования явилось изучение состояния здоровья сотрудников службы пожаротушения и аварийно-спасательных работ, определение приоритетных направлений оказания лечебно-профилактической помощи и реабилитации сотрудников.

С помощью информационно-аналитического метода проведен ретроспективный анализ данных отчетов о зарегистрированных заболеваниях, их исходах и причинах временной нетрудоспособности сотрудников службы пожаротушения и аварийно-спасательных работ Департамента по чрезвычайным ситуациям г. Алматы за 2011-2016 гг. Статистическая обработка

полученных результатов проведена с применением t-критерия Стьюдента.

Анализ результатов проведенного исследования выявил, что для сотрудников службы пожаротушения и аварийно-спасательных работ характерен высокий уровень первичной заболеваемости, при этом наиболее значимыми являются болезни органов дыхания, травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин, болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани, болезни системы кровообращения.

Изучение состояния здоровья персонала службы пожаротушения и спасательных служб позволило установить приоритетные направления оказания лечебно-профилактической помощи и реабилитации:

- первичная профилактика травматизма, заболеваний

органов дыхания и системы кровообращения;

- своевременная диагностика и лечение костной и мышечной системы, соединительной ткани, органов пищеварения;

- комплексная медико-психологическая реабилитация, направленная на восстановление утраченных профессиональных качеств и работоспособности, профилактика инвалидности персонала службы пожаротушения и аварийно-спасательных служб.

Определение приоритетных направлений оказания лечебно-профилактической помощи и реабилитации указанного контингента имеет важное значение как с точки зрения профессиональной пригодности, так и повышения профессиональной надежности персонала спасательных служб.

### რეზიუმე

სახანძრო და ავარიულ-სამაშველო სამსახურის თანამშრომლების ჯანმრთელობის მდგომარეობის შეფასება და პრიორიტეტული სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღონისძიებების შემუშავება

<sup>1</sup>ა. იბრაევა, <sup>1</sup>ბ. ტურდალიევა, <sup>1</sup>გ. აიმბეტოვა, <sup>2</sup>ლ. პლევა

<sup>1</sup>ყაზახეთის ს. ასვენდიაროვის სახ. ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, ჯანდაცვის მართვის და პოლიტიკის კათედრა სამედიცინო სამართალის და სასამართლო მედიცინის კურსით, ალმატი, ყაზახეთი; <sup>2</sup>ოსტრავას საუნივერსიტეტო საავადმყოფო, ტრავმატოლოგიის ცენტრი, ჩეხეთი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა სახანძრო და ავარიულ-სამაშველო სამსახურის თანამშრომლების ჯანმრთელობის მდგომარეობის შეფასება სამკურნალო-პროფილაქტიკური დახმარების და რეაბილიტაციის პრიორიტეტული მიმართულებების შემუშავების ჭრილში.

ინფორმაციულ-ანალიტიკური მეთოდის გამოყენებით ჩატარებულია სახანძრო და ავარიულ-სამაშველო სამსახურის ანგარიშების მონაცემების რეტროსპექტული ანალიზი თანამშრომელთა რეგისტრირებული დაავადებების, მათი გამოსავლის და დროებითი შრომისუნარიანობის დაკარგვის მიზეზების შესახებ. მიღებული მონაცემები დამუშავდა სტიუდენტის t-კრიტერიუმის მეშვეობით.

კვლევის შედეგებმა გამოავლინა სახანძრო და ავარიულ-სამაშველო სამსახურის თანამშრომლების დაავადების მაღალი დონე; ყველაზე ხშირი იყო სასუნთქი ორგანოების დაავადებები, ტრავმები, მოწამვლა და გარემოს ზემოქმედების

ზოგიერთი სხვა შედეგები, ძვალ-კუნთოვანი სისტემის, შემავრთებელი ქსოვილის და სისხლის მიმოქცევის სისტემის დაავადებები.

აღნიშნული კატეგორიის მუშაკების ჯანმრთელობის მდგომარეობის შეფასების საფუძველზე ავტორების მიერ შემუშავებულია პრიორიტეტული სამკურნალო-პროფილაქტიკური ღონისძიებები:

- სასუნთქი ორგანოების და სისხლის მიმოქცევის სისტემის დაავადებათა და ტრავმატიზმის პროფილაქტიკა;

- ძვალ-კუნთოვანი სისტემის, შემავრთებელი ქსოვილის, საჭმლის მონელების ტრაქტის დაავადებათა დროული დიაგნოსტიკა და მკურნალობა;

- დაკარგული პროფესიული თვისებებისა და შრომისუნარიანობის აღდგენისაკენ მიმართული კომპლექსური სამედიცინო-ფსიქოლოგიური რეაბილიტაცია, ხანძარსაწინააღმდეგო და ავარიულ-სამაშველო სამსახურის პერსონალის ინვალიდობის პროფილაქტიკა.

## IMPACT OF PHARMACY REFORM ON THE DYNAMICS OF THE USE OF DRUGS AND PSYCHOACTIVE SUBSTANCES ACCORDING TO THE 2013-2016 CLINICAL DATA FROM THE “CENTER FOR MENTAL HEALTH AND PREVENTION OF ADDICTION”

Kiladze L., Todadze Kh., Balkhamishvili T., Gadelia E., Lezhava G.

“Center for Mental Health and Prevention of Addiction”, Tbilisi, Georgia

During the last several years in Georgia like in many other countries the practice of the use of medications, including psychoactive substances, without a doctor’s prescription was established. The point of our interest represents the use of psychoactive substances without a doctor’s prescription.

The most harmful drugs for health were those home-made ones produced of such preparations like Codeine and Ephedrine. To this, the drug-addicted persons used potassium permanganate, phosphorus, acetic acid, iodine and other chemicals in the process of making Desomorphine (the so-called “Krokodil”), Ephedrine and Methamphetamines (the so-called “Jeff” and “Vint”) in domestic conditions. In addition to the narcotic influence, these solutions were causing significant damage to the body – shortly leading to disability and, in some cases, death of the users. Availability of psychoactive substances for teenagers represented another social threat. Mass consumption of these preparations promoted damage of central nervous system and formation of drug-addiction syndrome among teenagers [1].

To improve the situation, the Ministry of Health decided to carry out reorganization of pharmacy system for utmost restriction of self-treatment cases, on the one hand, and using psychoactive substances for non-medical purposes on the other. Pharmacy reform started in 2014 and continued stage by stage.

**Material and methods.** To study the results of the reform on the use of drugs and psychoactive substances, we have conducted a survey of the clinical histories in dynamics of the drug-addicted persons hospitalized in 2013-2016 at the “Center for Mental Health and Prevention of Addiction”. The analysis of clinical diagnoses by used psychoactive and narcotic substances was carried out and 337 histories from 2013, 306 histories from 2014, 176 histories from 2015 and 280 histories from 2016 have been processed.

**Results and their discussion.** The pharmacy reform carried out in 2014 had significant influence on the nature and amount of drugs and psychoactive substances used by the beneficiaries hospitalized at our clinic. Namely, the use of the home-made drugs for intravenous use from the group of Codeine and Ephedrine, the so-called “Krokodil”, “Vint” and “Jeff” was reduced. Among the persons hospitalized at our clinic in 2013, 30% was the “Krokodil” users, 14% used “Vint” and “Jeff”; in 2014, 21% were “Krokodil” users and 20% used “Vint” and “Jeff”. Due to enforcement of the reform of the Ministry of Health, the use of the mentioned preparations in 2015-2016 significantly

reduced. Namely, by 2016, the number of “Krokodil” users at our clinic was reduced by about 3%, and that of “Vint” and “Jeff” – by about 1% (Fig. 1).

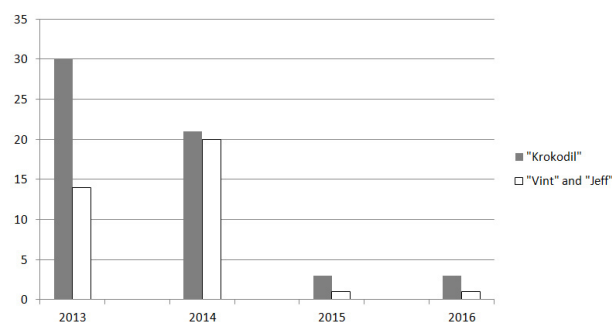


Fig. 1. Use of Home-made Injectable Drugs by Years

Unfortunately, among our patients the use of other psychoactive substances without the doctor’s prescription was not reduced, oppositely, compared to 2013, the use of some of them even increased. According to the data of 2013, the use of Gabapentin group preparations was 20%, Baclosan – 16%, Benzodiazepine group preparations – 9%. According to the data of 2014, the use of Gabapentin group preparations was 23%, Baclosan – 19%, Benzodiazepine group preparations – 23%. In 2015-2016, a significant increase in the use of psychoactive substances by the patients was detected. In 2015, the use of Gabapentin group preparations made up 48%, the use of Baclosan increased up to 35%, and Benzodiazepine group preparations – up to 55%. In 2016, the percentage of use of Gabapentin group preparations was 66%, Baclosan – 63%, Benzodiazepine group preparations – 59%. The data of the inpatient departments of the “Center for Mental Health and Prevention of Addiction” reveal that the restriction of availability of usual “heavy” drugs made the drug-addicted persons (“Krokodil”, “Jeff” and Vint” users) to replace them with mass consumption of psychoactive substances that clearly indicates on the fact that in spite of already accrued out certain reforms psychoactive substances still remain available. This was caused due to some gaps in the reform and the Ministry of Labor, Health, and Social Affairs of Georgia carried out additional changes to restrict availability of psychoactive preparations to eradicate them. Due to the fact that only a short period passed after issuing the recent decree, these changes couldn’t be reflected in our materials.

It is especially noteworthy that in 2013-2016 the increase of the number of alcohol consumers was detected: in 2013, the use of alcohol among the hospitalized drug-addicts made up 11%, in 2014 – 5%, in 2015 – 21% and in

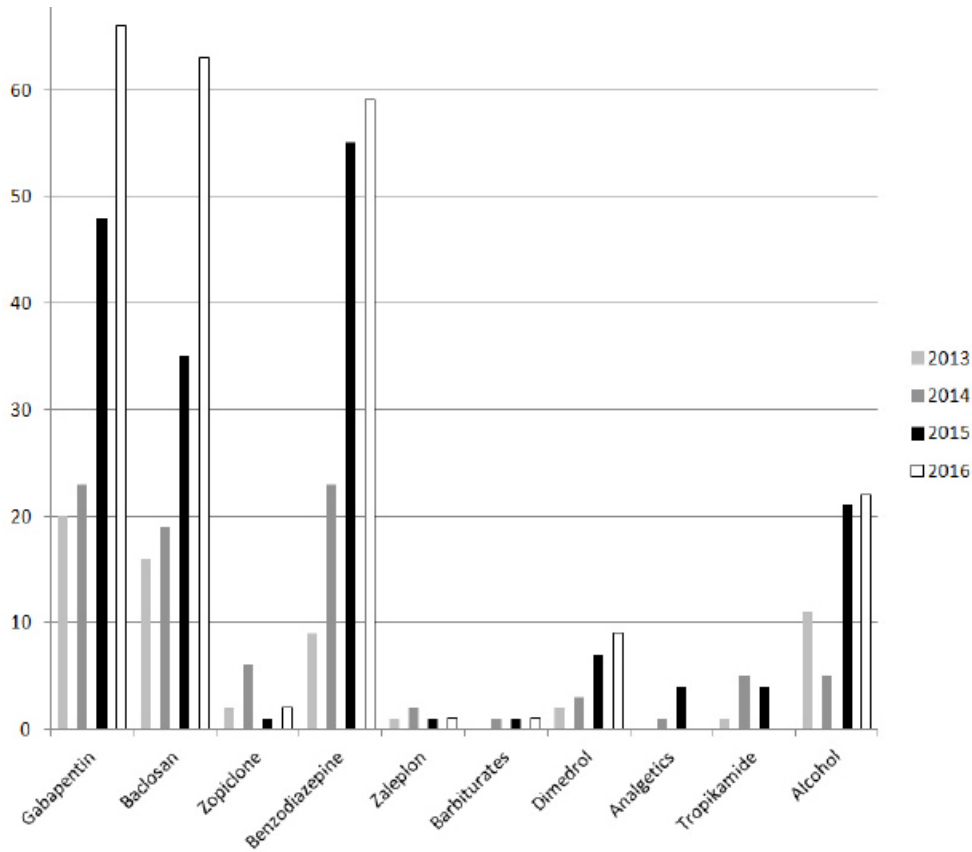


Fig. 2 Use of Psychoactive Substances by Years

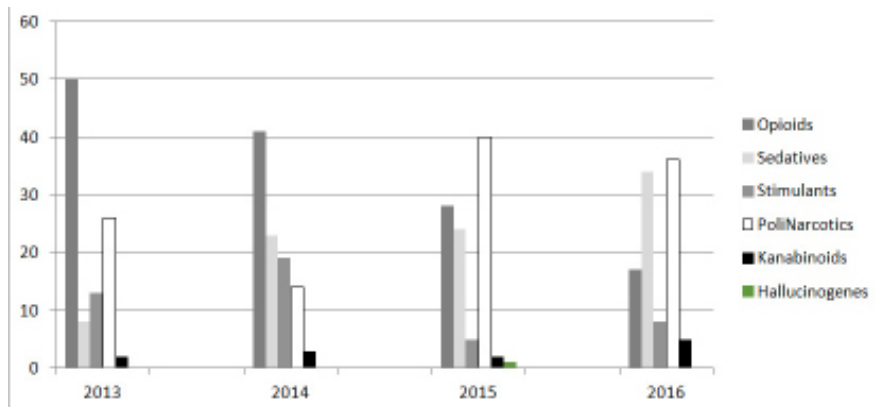


Fig. 3. Percentage of the Hospitalized Beneficiaries by Nosologies and Years

2016 - 22%. The increase of alcohol use may have several reasons. A significant number of patients say that one of the main reasons of this increase is the use of alcohol in order to get higher narcogenic effect of the psychoactive substances during the period of the so-called “heavy” drugs deficit (Fig. 2).

The dynamics of the used narcotic and psychoactive substances in 2013-2016 is clearly reflected on the percentage breakdown of hospitalized beneficiaries by nosologies. By 2016 the number of Opioid-addicted persons was reduced from 50% to 17% mainly due to Desomorphine (from 30% to 3%), the number of sedative-addicted persons was increased from 8% up to 34% and the number

of persons addicted simultaneously to different kinds of substances was grown from 26% up to 36%.

The data of the stimulant-addicted persons is also noteworthy. For 2015, in mentioned nosology, the number of beneficiaries addressing the clinic reduced from 19% to 5% due to the limited use of “Vint” and “Jeff”. As it was revealed, in 2016 the use of stimulants increased from 5% up to 9% that had no correlation to the use of the medications, it was related to the use of the home-made drug made of the plant Ephedra, the so-called “Needles”. The number of Kanabinoid-addicted persons also increased from 2% to 5% that is not found to be correlated with the pharmacy drug-abuse too (Fig. 3).

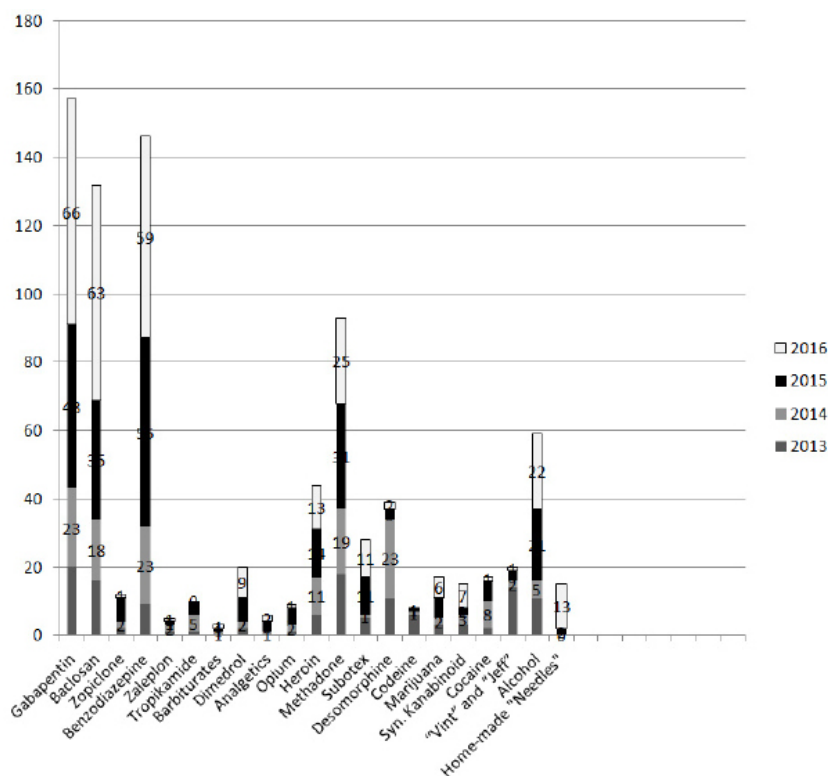


Fig. 4. Percentage of the Hospitalized Beneficiaries according to the Used Narcotic and Psychoactive Substances and Years

General picture of percentage of the use of narcotic and psychoactive substances by the hospitalized beneficiaries in 2013-2016 gets the following shape (Fig. 4).

**Conclusion.** For the last several years in Georgia like in many leading countries of the world, medications and psychoactive substances became one of the most common sources of drugs use. Due to this fact, in 2014, Georgian Government and the Ministry of Labor, Health and Social Affairs of Georgia carried out reforms for restriction of availability of drugs and psychoactive substances.

Under the joint initiative of the Ministry of Internal Affairs and the Ministry of Labor, Health and Social Affairs of Georgia, amendments were made to the law on “Narcotic Drugs, Psychotropic Substances, Precursors and Drug Aid”, considering Criminal Liability (Parliament of Georgia, March 2014 (3) for illegal circulation of pharmaceutical products, which contain Codeine, Ephedrine, Norephedrine, and Pseudoephedrine. The legislative amendment was aimed at restriction of use of home-made Opioid-Desomorphine (“Krokodil”) produced with Codeine-containing pills, as well as, restriction of widely spread use of the home-made stimulants – “Vint” and “Jeff”, made of Ephedrine and Pseudoephedrine. The pharmacy reform was carried out which performed reclassification of pharmaceutical products (Decrees of the Minister: 01-3/N January 14, 2014; 01-43/N July 4, 2014; 01-59/N September 3, 2014 [2]). The pharmacy reform was aimed at restriction of pharmacy product delivery without a doctor’s prescription (actual enactment of a prescription system), which was against self-treatment and pharmacy

drug-addiction. Special attention was paid to narcotic and psychoactive substances. Psychoactive substances used to get narcotic effect, were equalized with the non-narcotic pharmaceutical products under special control and, as a result of reclassification (Minister’s Decree 01-3/N January 14, 2014 [2], their issuance is carried out only on the basis of the Prescription Form #2, which was adopted by the Decree of the Minister of Labor, Health and Social Affairs of Georgia, on “Prescription Form for Prescribing Non-narcotic Medicines under Special Control”. The Ministry of Labor, Health and Social Affairs of Georgia carried out some amendments to the Permit Conditions for the Authorized Drugstores (Government Decree #383, August 4, 2016 [4]. Particularly, the pharmacist, who does not duly perform his/her professional duty, will be imposed liability, as well as, the entrepreneur, who will be revealed in the fact of offense, he/she will not be able to carry out his/her activity permit.

According to our data, by 2016 the mentioned regulations made significant changes on the use of medications. Based on the analyses of clinical histories of the hospitalized beneficiaries of the

“Center for Mental Health and Prevention of Addiction”, as a result of the reform, the use of the particularly harmful home-made drugs, the so-called “Krokodil”, “Vint”, and “Jeff”, made of Codeine and Ephedrine group preparations for intravenous use, was significantly reduced (use of “Krokodil” was reduced from 30% to 3%, and “Jeff” and “Vint” – from 14% to 1%), but the use of psychoactive substances increased among our patients. This might be

caused due to the following circumstance: the unavailability of Codeine and Ephedrine types of preparations made the drug-addicts to replace these drugs with psychoactive substances. Unfortunately, the pharmacy reform restrictions did not become real obstacles for non-purposeful flow of psychoactive substances from the drugstores network. Judging from the existing condition, it may be seen clearly that, unlike the criminal liability, the administrative measures appeared to be less effective.

## REFERENCES

1. G. Lezhava, Kh. Todadze, T. Sirbiladze "For the Problems of Addiction Issues in Georgia" Georgian Policy #3, 2015
2. Decrees of the Minister of Labor, Health and Social Affairs of Georgia: 01-3/N January 14, 2014; 01-43/N July 4, 2014; 01-59/N September 3, 2014
3. Decree of the Minister of Internal Affairs of Georgia, Minister of Labor, Health and Social Affairs of Georgia and Minister of Finance of Georgia #344/#01 - 30/N/#147, May 13, 2014
4. Georgian Government's Decree #383, as of August 4, 2016, about Amendments to Georgian Government's Decree #176, as of October 14, 2005, on "Adoption of the Regulations on the Rules and Conditions related to Clinical Study of Pharmacological Medicines, Pharmaceutical Production, Authorized Drugstore, and Issuing Permits on Import and Export of Medicines under Special Control".

## SUMMARY

### IMPACT OF PHARMACY REFORM ON THE DYNAMICS OF THE USE OF DRUGS AND PSYCHOACTIVE SUBSTANCES ACCORDING TO THE 2013-2016 CLINICAL DATA FROM THE "CENTER FOR MENTAL HEALTH AND PREVENTION OF ADDICTION"

**Kiladze L., Todadze Kh., Balkhamishvili T., Gadelia E., Lezhava G.**

*"Center for Mental Health and Prevention of Addiction", Tbilisi, Georgia*

Use of medications without doctor's prescription widely established in Georgia had negative impact on the health of the population and on the whole social situation. The use of home-made drugs "Krokodil", "Jeff" and "Vint" produced from the preparations bought without prescriptions (Codeine, Ephedrine), became a special matter of concern. Psychoactive substances became available for teenagers causing damage to their central nervous system and formation of drug-addiction in them. Due to the situation Georgian Government took a number of legislative measures, particularly, it set Criminal Liability for illegal circulation of pharmaceutical products containing Codeine

and Ephedrine and Administrative Measures for issuing the psychoactive substances without prescription. Reviewing the clinical histories (2013-2016) of the hospitalized beneficiaries of the "Center for Mental Health and Prevention of Addiction", revealed that the number of the users of home-made drugs produced of Codeine and Ephedrine was reduced but the reform did not have significant influence on distribution of psychoactive substances, due to which administrative measures for breaking circulation rules on psychoactive substances was tightened. The situation is also being improved with the help of universal use of electronic prescriptions and the introduction of quotas on psychoactive substances.

**Keywords:** addiction, desomorphine, "Vint", "Jeff", pharmacy reform, psychoactive substances.

## РЕЗЮМЕ

### ВОЗДЕЙСТВИЕ АПТЕЧНОЙ РЕФОРМЫ НА ДИНАМИКУ ПОТРЕБЛЕНИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО КЛИНИЧЕСКИМ ДАННЫМ «ЦЕНТРА ПСИХИЧЕСКОГО ЗДОРОВЬЯ И ПРЕВЕНЦИИ НАРКОМАНИИ» ЗА 2013-2016 ГГ.

**Киладзе Л.Н., Тодадзе Х.Г., Балхамишвили Т.Г., Гаделия Э.Н., Лежава Г.Г.**

*ООО «Центр психического здоровья и профилактики наркомании», Тбилиси, Грузия*

Широкое распространение выдачи аптечных препаратов без рецептов оказало негативное влияние на общее состояние здоровья населения и социальную ситуацию в стране. Среди доступных безрецептурных препаратов - кодеин, эфедрин, особую тревогу вызывают изготовленные на их основе в домашних условиях «крокодил», «джеф» и «винт». Психоактивные вещества доступны также для подростков, что ведет к повреждению центральной нервной системы и формированию наркозависимости. В связи с создавшейся ситуацией правительство Грузии проводит ряд законодательных мер. В частности, уголовная ответственность распространилась на незаконный оборот фармакологических продуктов, содержащих кодеин и эфедрин и введены административные штрафы за безрецептурную выдачу психоактивных препаратов.

Анализ клинических историй (2013-2016 гг.) бенефициаров, госпитализированных в «Центр психического здоровья и профилактики наркомании», выявил значительное снижение числа потребителей наркотиков, изготовленных из кодеина и эфедрина в домашних условиях; реформа, однако, не оказала существенного влияния на распространение психоактивных веществ. Именно по этой причине, административные меры за нарушение оборота психоактивных веществ, значи-

тельно ужесточились. Авторы статьи считают, что ситуацию улучшит использование электронных рецептов и установление квот на ввоз психоактивных веществ.

რეზიუმე

სააფთიაქო რეფორმის გავლენა ნარკოტიკების და ფსიქოაქტიური ნივთიერებების მოხმარების დინამიკაზე შპს „ფსიქიკური ჯანმრთელობის და ნარკომანიის პრევენციის ცენტრის“ 2013-2016 წლების კლინიკური მონაცემების მიხედვით

ლ. კილაძე, ხ. თოდაძე, თ. ბალხამიშვილი,  
ე. გაღელია, გ. ლეჟავა

შპს „ფსიქიკური ჯანმრთელობის და ნარკომანიის პრევენციის ცენტრი“, თბილისი, საქართველო

საქართველოში ფართოდ გავრცელებულმა სააფთიაქო პრეპარატების რეცეპტის გარეშე მოხმარებამ უარყოფითი გავლენა მოახდინა მოსახლეობის ჯანმრთელობაზე და ზოგადად - სოციალურ სიტუაციაზე. განსაკუთრებულ შემთხვევებში იწვევდა რეცეპტის გარეშე შექმნილი პრეპარატებიდან (კოდეინი, ეფედრინი) შინაურ პირობებში დამზადებული ნარკოტიკების - „კრაკაილის“, „ჯეფისა“ და „ვინტის“ მოხმარება.

ფსიქოაქტიური ნივთიერებები ხელმისაწვდომი გახდა მოზარდებისათვისაც, რაც იწვევდა ცენტრალური ნერვული სისტემის დაზიანებას და წამალდამოკიდებულების ჩამოყალიბებას. შექმნილ ვითარებასთან დაკავშირებით, საქართველოს მთავრობამ გაატარა მთელი რიგი საკანონმდებლო ღონისძიებები; კერძოდ, სისხლის სამართლის პასუხისმგებლობა გავრცელდა კოდეინისა და ეფედრინის შემცველი ფარმაცევტული პროდუქტის არალეგალურ ბრუნვაზე და შემოღებულ იქნა ადმინისტრაციული სახდელები ფსიქოაქტიური ნივთიერებების ურეცეპტოდ გაცემაზე.

შპს „ფსიქიკური ჯანმრთელობის და ნარკომანიის პრევენციის ცენტრში“ ჰოსპიტალიზებულ ბენეფიციართა კლინიკური ისტორიების (2013-2016 წწ.) ანალიზის შედეგად, გამოირკვა, რომ რეფორმის შემდეგ მნიშვნელოვნად შემცირდა კოდეინისა და ეფედრინისაგან კუსტარულად დამზადებული ნარკოტიკების მოხმარებელთა რაოდენობა, მაგრამ რეფორმამ შესამჩნევი გავლენა ვერ მოახდინა ფსიქოაქტიური ნივთიერებების გავრცელებაზე, რის გამოც გამკაცრდა ადმინისტრაციული ზომები ფსიქოაქტიური ნივთიერებების ბრუნვის დარღვევებზე. სიტუაციის გაუმჯობესებას, აგრეთვე, ხელს შეუწყობს ელექტრონული რეცეპტების საყოველთაო გამოყენება და კვოტების დაწესება ფსიქოაქტიური ნივთიერებების იმპორტზე.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОЙ ДОЗЫ ОБЗОРНОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ

Мурджикнели К.Г., Родоная С.В., Ломтадзе Л.И., Дарсания Т.Н., Каджришвили М.А.

*Тбилисский государственный медицинский университет, департамент общественного здравоохранения, менеджмента, политики и экономики, Грузия*

Медицинское облучение вносит наибольший вклад в популяционные дозы от искусственных источников ионизирующих излучений, который в большинстве развитых стран достигает 85-95%, а по абсолютному значению приближается к вкладу облучения населения от естественного радиационного фона [1,2,5]. С другой стороны, именно в рамках медицинского облучения возможно снижение доз без уменьшения диагностической и терапевтической пользы. Эффективность усилий, прилагаемых в этом направлении, в значительной мере определяется наличием данных о дозах облучения пациентов при рентгенодиагностике, что и диктует необходимость изучения указанного вопроса.

Исходя из вышеизложенного, целью данного

исследования явилось определение эффективной эквивалентной дозы при проведении пациентам рентгенологических процедур.

**Материал и методы.** Для оценки и сравнения уровней радиационного воздействия традиционно применялись следующие показатели: входная экспозиционная доза (ВЭД), интегральная поглощенная доза, средняя гонадная и костно-мозговая дозы. Однако, ни один из этих показателей не позволяет количественно оценить общий ущерб для организма от воздействия малых доз излучения. На сегодняшний день необходимо учитывать облучение всех наиболее важных органов и тканей с взвешенной значимостью последствий облучения, главным из которых является возникновение злокачественных новообразований и тяжелых наследственных повреждений [3,6,9]. Ко-



личественным критерием этой концепции является величина эффективной эквивалентной дозы  $H_E$ , которая вычисляется по формуле:

$$H_E = \sum_i W_{E(i)H(i)} \quad (1)$$

где  $H(i)$  - эквивалентная доза в органе или ткани  $i$ ,  $W_E(i)$  - взвешивающий коэффициент, выражающий относительную значимость облучения  $i$  органа в суммарном эффекте радиационного воздействия на весь организм.

Показатели весовых факторов  $W_E(i)$ , определенные по выходу индуцированных облучением смертельных злокачественных опухолей и серьезных наследственных заболеваний, приведены в 26 публикации Международной комиссии по радиационной защите (МКРЗ) [7].

Исходя из формулы (1), для определения величины  $H_E$  необходимо располагать данными о распределении эквивалентной дозы по поверхности тела, т.е. о дозах облучения всех наиболее значимых органов и тканей. В каждом конкретном случае такая дозиметрическая информация может быть получена либо теоретическим способом с применением различных математических моделей, либо экспериментальным – моделированием в реальных условиях облучения тела человека посредством фантомов. Применительно к рентгенодиагностике последний способ сводится к фантомному моделированию отдельных типов рентгенологических процедур.

Данная статья является фрагментом комплексного исследования, посвященного экспериментальному измерению поглощенных доз в органах пациентов, и определению эффективной эквивалентной дозы при проведении обзорной рентгенографии органов грудной клетки. Исследование проведено в медицинской клинике им. Д. Г. Татишвили в 2013-2014 гг.

Полнота и точность дозиметрических данных, получаемых при экспериментальном моделировании рентгенологических процедур (РЛП) определяется, прежде всего, характеристикой фантома, имитирующего тело пациента, и средств дозиметрии. Основные

требования, предъявляемые фантому, сводятся к ткане-эквивалентности его материала в диагностическом диапазоне энергии рентгеновского излучения, гетерогенности и антропоморфности. Выбор дозиметрических средств диктуется необходимостью регистрации малых доз мягкого рентгеновского излучения в большом числе точек внутри фантома. Последнее требование обусловлено тем, что при неравномерном облучении тела для корректной оценки средних поглощенных доз протяженных органов необходимо в каждом из них размещать несколько детекторов. Поэтому дозиметр должен обладать высокой чувствительностью, малой энергетической зависимостью в области энергии фотонов от 25 кэВ и выше, а также должен быть достаточно миниатюрным и автономным. Перечисленным требованиям в наибольшей степени удовлетворяют термoluminescentные детекторы (ТЛД) из фтористого лития.

В настоящей работе применялся антропоморфный фантом из тканеэквивалентной пластмассы, имеющий полный набор костей скелета и лёгкие, соответствующие реальным по эффективному атомному номеру и плотности. Данный фантом аналогичен известному фантому Alderson-Rando [8], имитирующему «среднего» человека, ростом 173 см и массой 73 кг.

Внутри фантома, в местах нахождения наиболее значимых органов, размещались 67 ТЛД. Поглощенная доза, небольшими по размерам органами - щитовидной и молочной железами, яичниками и яичками – измерялась в одной точке двумя детекторами. Для измерения дозы в яичках ТЛД помещали в пластмассовую капсулу толщиной 2 см, которая прикреплялась к внутренней поверхности бедра паховой области. В лёгком, печени, желудке и кишечнике размещались от 8 до 14 детекторов равномерно по всей массе каждого органа, средняя поглощенная доза в органе определялась посредством значений локальных доз. Определение количества доз в красном костном мозге выполнялось в 15 точках, выбранных в соответствии с распределением красного костного мозга по скелету, согласно Ellis [10] (таблица 1).

Таблица 1. Измерение средней поглощённой дозы в красном костном мозге: размещение детекторов и распределение красного костного мозга по скелету

Отделы скелета	Количество ТЛД	Содержание красного костного мозга (%)
Шейный отдел позвоночника	1	3,4
Грудной отдел позвоночника	3	16,8
Поясничный отдел позвоночника	2	11,0
Пояснично-крестцовый отдел позвоночника	1	14,0
Таз, тазобедренное сочленение	2	26,2
Плечевые суставы, ключицы	2	8,4
Ребра, грудина	4	5,7
Всего	15	85,5

Измерение охватывало в общей сложности 85% всего костного мозга. Средняя поглощённая доза  $D_{\text{ккм}}$  определялась по формуле:

$$D_{\text{ккм}} = \sum_i g(i) D(i)$$

где  $D(i)$  – поглощённая доза, измеренная в  $i$  точке скелета;

$g(i)$  – доля красного костного мозга сосредоточенная в соответствующем отделе скелета.

Для измерения доз в фантоме использовались ТЛД дозиметры из фтористого лития производства фирмы «Harshaw», США (тип «ТЛД-100»), имеющий размер 3.18мм×3.18мм×0.89мм и вес около 28 мг. Эти детекторы имеют диапазон измеряемых доз от  $10^{-2}$  до  $10^5$ Р и энергетическую зависимость показаний не ниже  $\pm 3\%$  в диапазоне энергии гамма-квантов 0.025–1.25 Мэв. Измерение показаний и промежуточную термообработку детекторов проводили на приборе «TOLEDO Model 654 TLDREADER», (Англия). Перед измерениями детекторы предварительно отбирались по чувствительности и воспроизводимости в серии из 10 циклов «облучение-высвечивание» таким образом, чтобы среднеквадратичное отклонение этих параметров не превышало  $\pm 3\%$ . Суммарная погрешность измерений не превышала  $\pm 10\%$  в диапазоне доз от 10 до 100 мР и  $\pm 5\%$  при дозах больше 100 мР.

В эксперименте моделировалось облучение пациента среднего телосложения при проведении обзорной рентгенографии грудной клетки в задне-передней проекции. Фантом, с размещенным в нем ТЛД, облучался на аппарате «Siemens Iconos R-200» (Германия). Двумя детекторами, установленными на задней поверхности фантома в центре поля облучения, измерялась величина т.н. входной поверхности дозы. Тремя ТЛД ионизационной камерой прибора «VA-J-18» измерялась ВЭД в этой точке в отсутствии фантома.

Для определения величин поглощённых доз

мягкими тканями показания каждого ТЛД в фантоме умножались на один и тот же коэффициент перехода от экспозиционной к поглощённой дозе 0.92 рад/Р. Для красного костного мозга этот коэффициент, учитывая энергию используемого рентгеновского излучения, принимался как 1.01 рад/Р.

Величина эффективной эквивалентной дозы определялась по формуле (1) с взвешивающими коэффициентами, рекомендованными в 26 публикации МКРЗ [7]. Отдельно рассматривались также печень, желудок и кишечник. При этом к печени и желудку применялся один и тот же весовой фактор 0.06, а к кишечнику – 0.18, так как понятием «кишечник» в данном случае объединены три органа – тонкий кишечник, верхняя и нижняя часть толстого кишечника – каждый из которых следует рассматривать как отдельный орган с применением к нему фактора 0.06 [7].

**Результаты и их обсуждение.** Полученные результаты представлены в таблице. 2. Величины средних поглощённых доз в органах и эффективная эквивалентная доза  $H_E$  приведены в таблице в расчетах на единицу ВЭД, замеренной в отсутствии фантома. Радиационный выход аппарата в точке, соответствующей центру поля облучения, составлял 2 мР на 1 мАс. В реальных условиях обзорный снимок органов грудной клетки на данном аппарате выполняется при средней экспозиции около 50 мАс. Таким образом, чтобы получить представление о реальных дозах облучения пациента при проведении этой РЛП, достаточно разделить на 10. Показатели доз представлены в таблице 2.

В скобках указано количество ТЛД, использованных для определения средней поглощенной дозы органом.

К числу наиболее значимых органов, облучение которых следует учитывать при определении величины  $H_E$  и последующей оценке общего ущерба для организма, помимо перечисленных в таблице 2, относятся клетки поверхности кости [7]. В настоящей

Таблица 2. Средние показатели поглощенных органами доз и эффективная эквивалентная доза при обзорной рентгенографии грудной клетки в заднепередней проекции

Органы	Средняя поглощенная доза, мрад на 1000мР ВЭД	Относительный вклад в эффективную эквивалентную дозу (%)
Красный костный мозг (15)	175	17,2
Легкие (14)	395	38,8
Щитовидная железа (2)	84	2,0
Молочная железа (2)	20	2,4
Яичники (4)	5	
Яички (2)	1	0,6
Остальные:		
Печень (8)	228	11,2
Желудок (8)	206	10,1
Кишечник (12)	120	17,7
Эффективная эквивалентная доза $H_E$ , мбер	122	100,0

Таблица 3. Сравнение результатов настоящей работы с данными из работы Rosenstein – методом Монте-Карло

Органы	Средняя поглощённая доза, мрад на 1000 мР ВЭД	
	Собственные данные	Rosenstein – методом Монте-Карло
красный костный мозг	175	155
щитовидная железа	84	68
яичники	5	4,5
яички	1	Менее 1,0

работе поглощенная доза в костной поверхности не измерялась и соответственно не учитывался её вклад в  $H_E$ . Однако, принимая во внимание небольшое значение соответствующего весового фактора, равного 0,03, следует предположить, что недооценка величины  $H_E$  при этом не превышает 5%.

Из таблицы 2 следует, что величина  $H_E$  существенно (примерно в 8 раз) отличается от соответствующей величины ВЭД. Ещё большее отличие наблюдается при сравнении  $H_E$  с входной поверхностной дозой, последняя по нашим измерениям составила около 1400 мР в расчёте на 1000 мР ВЭД, т.е. фактор обратного рассеяния для использованной энергии рентгеновского излучения достигает 1,4. Можно с уверенностью утверждать, что это различие не является систематическим и для разных типов РЛП, характеризуется разными коэффициентами, например, для РЛП конечностей величина  $H_E$ , по-видимому, составит в сотни раз меньше соответствующих величин в ВЭД и входной поверхностной дозы. Таким образом, ни ВЭД, ни входная поверхностная доза не могут, сами по себе, служить даже примерным ориентиром для количественной оценки радиационного риска РЛП.

Такие показатели, как средняя костно-мозговая и гонадная доза позволяют оценить лишь некоторую долю общего ущерба от облучения, величина которой объективно связана с типом РЛП: около 18% индуцированных соматико-стохастических эффектов обусловлено облучением этих органов. Очевидно, для РЛП области таза эта доля значительно возрастает, а для РЛП головы и шеи несколько снижается.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о невозможности искусственной подмены величины эффективной эквивалентной дозы – единственного на сегодняшний день количественного критерия, адекватно отражающего общий ущерб для организма при облучении малыми дозами, - другими упрощёнными дозиметрическими показателями. Этот вывод приобретает особую значимость в свете решения одной из актуальнейших проблем радиационной гигиены – нормирование облучения пациентов при рентгенодиагностике.

Анализ данных таблицы 2 позволяет сделать еще один весьма значимый вывод: основной вклад в формирование величины  $H_E$  (около 95%) вносится за счёт облучения красного костного мозга, в лёгких и «остальных» органах. При этом вклад «остальных» ор-

ганов не уступает вкладу лёгких, являющихся объектом данного рентгенологического исследования и соответственно наиболее облучаемым органом. Как показали дополнительные измерения, не рассматриваемые специально в этой работе, при переходе от заднепередней к переднезадней проекции проведения данной РЛП вклад «остальных» органов возрастает почти в 1,5 раза и становится доминирующим. Очевидно, для РЛП области таза и живота этот вклад также будет очень большим. Из вышесказанного следует, что при проведении РЛП защите области живота пациента внимания должно уделяться не меньше, чем на сегодняшний день уделяется защите гонад. Такая защита может обеспечиваться применением минимально необходимых размеров поля облучения индивидуальных экранирующих средств.

В заключение следует отметить, что определение эффективных эквивалентных доз методом фантомного моделирования достаточно трудоёмко, также диапазон изменения доз зависит от технических параметров рентгеновской аппаратуры, которые приведены во многих литературных источниках [3,4,8,9,11,12]. Решению этой задачи в значительной мере способствует применение методов математического моделирования, причём корректность расчётных данных должна подтверждаться экспериментальными результатами. В качестве примера в таблице 3 приведено сравнение экспериментальных данных настоящей работы с расчётными, полученными Rosenstein [13] – методом Монте-Карло. Так как расчет выполнен по ограниченному числу органов, провести сравнение удалось только для доз красного костного мозга, щитовидной железы и гонад.

Как следует из таблицы 3 экспериментальные данные удовлетворительно совпадают с расчётными как для протяжённых, так и для «точечных» органов. Таким образом, используя расчётные методы, можно в принципе определить величины поглощённых и эффективных эквивалентных доз для всего многообразия РЛП. Располагая такими данными и сведениями о структуре и частоте РЛП, можно, в конечном счёте, оценить радиационный риск рентгенодиагностики в целом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. კ. გელაშვილი, ნ. ვეფხვაძე, ნ. კილაძე, რადიაციული ჰიგიენა. თბილისი: 2014, 242.
2. Гигиена. Под ред. Г.И. Румянцев. М.: 2009; 608.

3. Голиков В.Ю., Водоватов А.В., Оценка значений рабочей нагрузки рентгеновских аппаратов при проведении рентгеновских процедур общего назначения, Радиационная гигиена 2014;8(2):6-10.
4. Голиков В.Ю., Саричева С.С., Баланов М.И. и др. Оценка доз облучения пациентов при проведении интервенционных рентгеновских исследований. Радиационная гигиена 2009; 3:26-31
5. Ильин Л.А., Кириллов В.Ф., Коренков И.П., Радиационная гигиена: учебник.-М.: Медицина, 2010.- 384.
6. Публикация 103 Международной Комиссии по радиационной защите (МКРЗ). Пер с англ. Под общей ред. М.Ф. Кисилёва и Н.К. Шандалы. М.: Изд.ООО ПКФ «Алана»; 2009.
7. Радиационная защита. Рекомендации МКРЗ, публикация №26. М.: Атомиздат: 1968; с.86.
8. Alderson S.W., Lanzy I.H., Rollins M., Spuru I. Amer. J. Roentgen, Rad.Theor.Nucl.Med., 1963, 87, 185.
9. Aichinger H., Springer H. Aichinger, J. Dierker, S. Joite-Barfub. Radiation exposure and image quality in X-Ray diagnostic radiology. Physical principles and clinical applications. Second edition. 2012.
10. Ellis R.E. The distribution of active bone marrow in the adult. Phys. Med. Biol. 1961; 5: 255.
11. Lee C., Lodwick D., Hurtado J. (et al.). The UF family of reference hybrid phantoms for computational radiation dosimetry. Physics in Medicine and Biology 2010; vol.55 (20): 339-363.
12. Mattson S. Need for individual cancer risk estimation X-Ray and nuclear medicine imaging. Radiation Protection Dosimetry 2014; vol.169 (1-4): 11-16.
13. Rosenstein M. In: Handbook of selected organ doses for projections common in diagnostic radiology. Washington: 1976; 13.

## SUMMARY

### THE DETERMINATION OF EFFECTIVE EQUIVALENT DOSES DURING CHEST RADIOLOGY IN PATIENTS

**Murjikneli K., Rodonaia S., Lomtadze L., Darsania T., Kajrishvili M.**

*Tbilisi State Medical University, Department of Public Health, Management, Policy and Economics, Georgia*

As is known, medical radiation has a big impact on the increase of population doses, which determines the risk of increasing population's radiation. Thus, it is relevant the determination of the radiation doses in patients during X-ray diagnostic procedures up to now.

The aim of our research is the examination of the effective equivalent doses and their determination during X-ray.

Due to the experimental modeling method by using phantom and TLD it has been determined average absorbed doses in separate organs of patients, also the

effective equivalent dose during chest organs radiology, which is 122 mrem.

It has been relieved that numerical index of the effective equivalent dose was significantly different from consistent inputted exposure and superficial dose indexes, that where often used for the assessment of radiation risk in patients,  $H_E$  is eight times different from the corresponding value of EED, which amounted to about 1400mR per 1000 mR of EED.

It has been established that on "other" organs (on the liver and gastrointestinal tract) the radiation has a big importance for the whole organism radiation exposure in the total effect. The protection of these organs is advisable in every cases, if they are the research object of X-ray or not.

Additionally, the contribution of "other" organs is not less than lung lobes, which do not present the research object of X-ray. It has been established the prospects of computing methods due to conducted studies for the determination of the effective equivalent dose in patients for the assessment of X-ray radiation risk.

**Keywords:** radiation doses, X-ray diagnostic procedure, medical radiation, radiation risk.

## РЕЗЮМЕ

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОЙ ДОЗЫ ОБЗОРНОЙ РЕНТГЕНОГРАФИИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ

**Мурджикнели К.Г., Родоная С.В., Ломтадзе Л.И., Дарсания Т.Н., Каджришвили М.А.**

*Тбилисский государственный медицинский университет, департамент общественного здравоохранения, менеджмента, политики и экономики, Грузия*

Целью исследования явилось определение эффективной эквивалентной дозы у пациентов при проведении рентгенологических процедур.

Методом экспериментального моделирования с использованием фантома и термолюминесцентных детекторов определены средние поглощенные дозы отдельными органами пациента и эффективная эквивалентная доза при проведении обзорной рентгенографии органов грудной клетки. Эффективная эквивалентная доза  $H_E$  составила 122 мбер.

Выявлено, что численное значение эффективной эквивалентной дозы существенно отличается от соответствующих величин входной экспозиционной и поверхностной доз, часто используемых ранее для оценки уровня радиационного воздействия, т.е.  $H_E$  в восемь раз отличается от соответствующей величины входной экспозиционной дозы (ВЭД), которая составила около 1400 мР в расчете на 1000мР ВЭД.

Установлена высокая значимость облучения

«остальных» органов (печени и желудочно-кишечного тракта) в суммарном эффекте радиационного воздействия на весь организм. Показана целесообразность защиты этих органов во всех случаях, когда они не являются объектом рентгенологического исследования.

При этом вклад «остальных» органов не уступает доле легких, являющихся объектом данного рентгенологического исследования и соответственно наиболее облучаемым органом. В результате исследований показана перспективность применения расчетных методов для определения эффективных эквивалентных доз и последующей оценки радиационного риска рентгенодиагностики.

### რეზიუმე

ეფექტური ეკვივალენტური დოზების განსაზღვრა პაციენტებში გულმკერდის მიმოხილვითი რენტგენოგრაფიის დროს

ქ. მურჯიკნელი, ს. როდონაია, ლ. ლომთაძე,  
თ. დარსანია, მ. ყაჯრიშვილი

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, საზოგადოებრივი ჯანდაცვის, მენეჯმენტის, პოლიტიკისა და ეკონომიკის დეპარტამენტი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა პაციენტებისათვის ეფექტური ეკვივალენტური დოზების განსაზღვრა რენტგენოლოგიური კვლევების ჩატარების დროს.

ექსპერიმენტული მოდელირების მეთოდით,

ფანტომისა და TLD-ს გამოყენებით განისაზღვრა პაციენტის ცალკეული ორგანოს მიერ საშუალო შთანთქმული დოზა, ასევე ეფექტური ეკვივალენტური დოზა გულმკერდის ორგანოების მიმოხილვითი რენტგენოგრაფიის დროს, რომელმაც შეადგინა 122 მბერ.

გამოვლინდა, რომ ეფექტური ეკვივალენტური დოზის რადონობრივი მანკვებელი არსებითად განსხვავდება შესაბამისი შემავალი ექსპოზიციური და ზედაპირული დოზების მანკვებლებისაგან, რომლებიც ადრე ხშირად გამოიყენებოდა რადიაციული რისკის შესაფასებლად პაციენტებში. კვლევით დადგენილია, რომ  $H_E$  რვაჯერ განსხვავდება შემავალი ექსპოზიციური დოზის შესაბამისი სიდიდისაგან, რომელიც შეადგენს 1400 მრენტ-ს 1000 მრენტ-ის გათვლაზე. დადგენილია, რომ ორგანიზმის რადიაციული ზემოქმედების ჯამურ ეფექტში დასხივებას ღვიძლსა და კუჭ-ნაწლავის ტრაქტზე დიდი ზემოქმედება არ აქვს, თუმცა, ამ ორგანოების დაცვა მიზანშეწონილია ყველა შემთხვევაში, მიუხედავად იმისა, წარმოადგენს თუ არა ისინი რენტგენოლოგიური კვლევის ობიექტს. ამასთან, “დანარჩენი” ორგანოების (რომლებიც არ წარმოადგენს რენტგენოლოგიური კვლევის ობიექტს) წვლილი არანაკლებია ფილტვების წილზე.

ჩატარებული კვლევით დადასტურებულია გამოთვლითი მეთოდების პერსპექტიულობა ეფექტური ეკვივალენტური დოზების განსაზღვრისა და პაციენტებში რენტგენოლოგიის რადიაციული რისკის შეფასებისათვის.

## СКРИНИНГ-ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ ПО СПЕКТРУ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В НЕКОТОРЫХ ЗОНАХ ВЕРХНЕЙ ИМЕРЕТИИ (ЧИАТУРСКИЙ МУНИЦИПАЛИТЕТ)

Кварацхелия Г.Дж., Кверенчхиладзе Р.Г., Булейшвили М.Л., Лобжанидзе Н.Г.,  
Шарашенидзе Г.З., Саникидзе Т.В., Ормоцадзе Г.Л.

*Центр экспериментальной биомедицины им. И. Бериташвили, лаборатория проблем радиационной безопасности; Тбилисский государственный медицинский университет; Грузинский университет Давида Агмашенебели, Тбилиси, Грузия*

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, примерно одна четверть от общей заболеваемости населения мира ассоциируется с вредным воздействием экологических риск-факторов [21]. Неблагоприятное воздействие загрязнения окружающей среды на здоровье населения является актуальной проблемой современной науки, решение которой требует

комплексного подхода [6,12]. Масштабы загрязнения окружающей среды постоянно возрастают, что обусловлено урбанизацией и ростом производства [7]. В связи с этим оценка рисков для здоровья, связанных с загрязнением окружающей среды, является актуальным вопросом современной профилактической медицины [2]. В системе здравоохранения и охраны природы раз-

витых стран мира выявилась современная тенденция поэтапного перехода на более эффективную методологию управления рисками, вместо ныне существующей методологии гигиенического нормирования [3-5].

Современная стандартная методология оценки рисков предъявляет качественно новые требования как к содержанию, так и точности оценки риска; оценка риска рассматривается как процесс количественного определения риска с учетом всех возможных неопределенностей [14]. Под неопределенностью предполагается наличие факторов, степень возможного влияния которых на результаты измерения неизвестна [1,17]. С этих позиций неопределенность в большей степени ассоциируется с информационным дефицитом, характерным для пассивных экспериментов, чем существенно отличается от стандартного понимания смысла статистической погрешности.

Интенсивно развивающиеся в настоящее время методы оценки и редукции неопределенностей, основанные на теоретической базе т.н. Бейсовского подхода [11,15,16,20], предоставляют возможность на базе косвенных данных количественно оценить необходимые показатели, прямое определение которых практически невозможно или связано с большими методологическими трудностями и, что особенно важно, позволяют путем постепенного интегрирования и анализа фрагментов различной информации (экологическая, био-медицинская, демографическая) на единой теоретической платформе минимизировать количество полевых и лабораторных исследований, оптимизировать их структуру, многократно повысить эффективность исследований и надежность оценки. Очевидно, что при таком подходе возрастает цена любой доступной информации, причинно-связанной с заболеваемостью населения или состоянием экологической ситуации.

Применение современных методов редукции неопределенностей особенно эффективно при оценке рисков для здоровья, связанных с воздействием локальных источников экологической опасности на небольшие группы населения (т.н. сайт-специфическая оценка - Site-Specific assessment), что связано со степенью информационного дефицита, характерного для такого рода исследований [10].

Необходимо отметить, что для Грузии характерны именно локальные (очаговые) источники экологической опасности. Для примера достаточно привести состояние экологической ситуации в определенных зонах Болнисского района и Имеретинского региона.

Исходя из вышеизложенного, разработка оптимальной схемы сайт-специфической оценки характерных для Грузии рисков для здоровья на базе современных информационных технологий, включающих разработку системы сбора и анализа существующей информации, методы полевых и лабораторных исследований, их структуру и теоретические подходы комплексного анализа, представляется актуальной задачей.

Доступная в открытой печати информация

о заболеваемости и смертности населения в Грузии агрегирована как минимум на районном (муниципальном) уровне и малопригодна для сайт-специфических оценок. В связи с этим приобретает актуальность поиск альтернативных источников информации. Реальные перспективы в этом направлении открывают амбулаторные обследования пациентов, проводимые инициативной группой Республиканской больницы имени акад. Н. Кипшидзе в рамках государственной программы всеобщего страхования населения.

В настоящей статье представлены результаты предварительного анализа информационной ценности данных, полученных в результате амбулаторного обследования населения в селах Хреити, Перевиса и Ргани Чиатурского района для оценки сайт-специфических рисков, угрожающих здоровью населения на этой территории.

Указанные населенные пункты различаются как своей удаленностью от источников экологической опасности – карьеров добычи марганца, так и масштабами его добычи, что позволяет ранжировать их по степени экологической напряженности: Хреити – низкая, Перевиса – средняя, Ргани – высокая.

Предполагается, что анализ структуры и количественных характеристик уровня заболеваемости в указанных зонах позволит:

1. Идентифицировать индикаторные патологии или комплекс патологий, причинно-связанных с возможным неблагоприятным воздействием факторов окружающей среды, выявить органы-мишени, маршруты распространения и пути воздействия загрязнителя, тип возможных поражающих агентов.
2. Определить количественные показатели заболеваемости, оптимальные с точки зрения характеристики внешнего воздействия (относительный риск, атрибутивный риск, соотношение шансов - ОШ).
3. Оценить условия и критерии репрезентативности полученных результатов, необходимых для определения степени воздействия (интенсивность воздействия и доля экспонированного населения).

Цель исследования - выявить причинно-следственные связи между заболеваемостью населения и гигиено-экологическим состоянием конкретного региона на примере населенных пунктов Верхней Имеретии - Чиатурского муниципалитета.

**Материал и методы.** В соответствии с поставленной целью обследованы жители Чиатурского муниципалитета обоего пола, проживающие в населенных пунктах Хреити, Перевиса и Ргани, характеризующихся различной степенью экологической нагрузки окружающей среды. Клинико-функциональное исследование состояния здоровья включало лабораторные (общий анализ крови), клинические (пульмо-аускультация) и инструментальные (спирометрия, рентгенография, эхокопия) исследования. Обследовано 400 добровольцев. Выявленные при обследовании патологии классифицированы в соответствии кодами Международной

классификации болезней 10-го пересмотра (ICD-10): J42 – хронический бронхит, J44 – хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), I10 – артериальная гипертензия, I87 – венозная недостаточность, G90 – нейроциркуляторная дистония, K81 – холецистит, M – заболевания скелетно-мышечных и соединительных тканей, E 10-14 – диабет, N41 – простатит.

С целью установления возможной причинно-следственной связи между уровнем заболеваемости населения и степенью экологической нагрузки использована таблица сопряжения 2x2. Статистическая значимость контролировалась посредством критерия  $\chi^2$ .

С целью установления причинной связи между уровнями распространения различных патологий использовали метод иерархичной кластеризации (разведочная статистика). В качестве меры межкластерных дистанций использовался коэффициент корреляции Пирсона. Статистическая значимость корреляций проводилась с использованием критериев ранговой корреляции Спирмена и Кендалла.

С целью оценки эффекта воздействия факторов окружающей среды использовали отношение шансов развития заболеваний в парах: Хрейти/Перевиса, Перевиса/Ргани, Хрейти/Ргани. Для оценки статистической значимости результатов использовали стандартную ошибку среднего и 95% доверительный интервал.

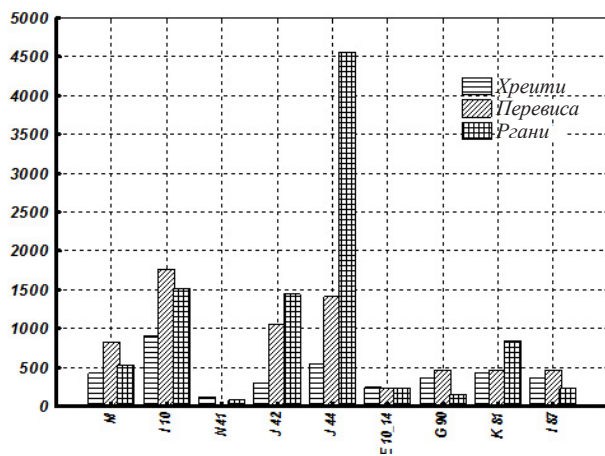


Рис. 1. Показатели превалентности патологий на 100000 жителей (в кодах ICD-10) в селах Чиатурского муниципалитета

Таблица 1. Статистическая достоверность различной превалентности патологий J44, J42 и I10 в селах Хрейти/Перевиса, Перевиса/Ргани, Хрейти/Ргани, Критерий различия -  $\chi^2$

DC-10	$\chi^2, p$	Хрейти/Перевиса	Хрейти/Ргани	Перевиса/Ргани
		$\chi^2, p$	$\chi^2, p$	$\chi^2, p$
I 10	M	2,5; 0,10	1,0; 0,31	0,39; 0,53
	W	1,0 0,30	1,21; 0,27	0,01; 0,98
J 42	M	1,82; 0,17	2,76; 0,093	0,03; 0,87
	W	4,0; 0,045	9,23; <0, 01	0,75; 0,38
J 44	M	3,05; 0,08	9,87; <0,01	1,26; 0,26
	W	2,15; 0,14	38,0; <0,01	14,6; <0,01

Статистический анализ и графическую визуализацию результатов проводили посредством пакета программного обеспечения STATISTICA-10.

**Результаты и их обсуждение.** На рис. 1 представлены результаты обследования состояния здоровья населения сел Хрейти, Перевиса и Ргани (в показателях превалентности частоты случаев выявленных патологий на 100 000 жителей).

На основе анализа выявлены классы заболеваний – ХОЗЛ, хронический бронхит, артериальная гипертензия (J44, J42, I10), которые, по всей вероятности, причинно связаны с возможным неблагоприятным воздействием факторов окружающей среды. Анализ статистической достоверности различий выявил, что в исследованных селах фиксируются статистически значимые различия в превалентности хронических заболеваний нижних дыхательных путей, в особенности J44, тогда как различия в превалентности артериальной гипертензии являются статистически недостоверными (таблица 1).

С целью установления причинно-следственной связи (ассоциаций) между выявленными заболеваниями (критерий возможной идентичности этиологического фактора) методами разведочного (кластерного) статистического анализа изучены корреляции между различными патологиями (рис. 2).

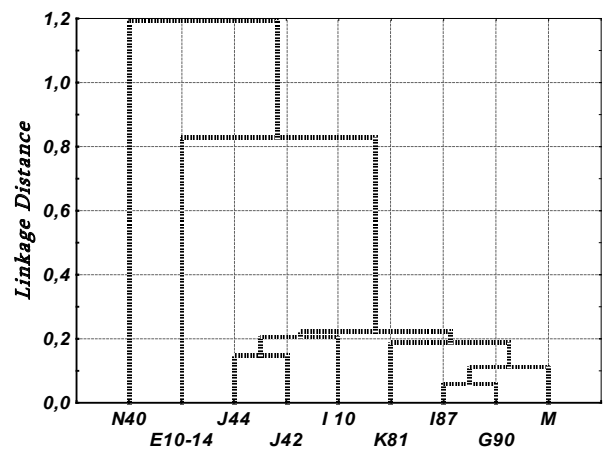


Рис. 2. Результаты кластерного анализа - показатели возможной причинной связи между различными патологиями. В качестве меры межкластерных дистанций использовался коэффициент корреляции Пирсона

Таблица 2. Показатели корреляции между классами патологий по критерию Кендалла

Патологии	Kendall Tau корреляция( $p < 0,05000$ )		
	I10	J42	J44
I10	1,00	0,60	0,60
J42	0,60	1,00	<b>0,73</b>
J44	0,60	<b>0,73</b>	1,00

Выявлено наличие, как минимум, двух кластеров патологий, потенциально находящихся в причинной связи (J44, J42, I10 и I87, G90, M, K81) (рис. 2).

Однако, по критерию ранговой корреляции Кендалла, наличие значимых корреляций выявлено только между патологиями J44 и J42 (таблица 2).

Отсутствие причинно-следственной связи между хроническими заболеваниями нижних дыхательных путей и артериальной гипертензией, очевидно, обусловлено недостаточным количеством пациентов и является предметом дальнейших исследований.

Следует отметить, что согласно рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения, высокая заболеваемость хроническими обструктивными заболеваниями легких и хроническим бронхитом и высокий уровень смертности при этих заболеваниях, наряду с острыми респираторными заболеваниями у детей до 5 лет, относятся к числу прямых показателей загрязнения воздуха в помещениях и в открытом пространстве. Эти показатели, совместно с показателями годового процентного содержания озона, CO, твердых частиц (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>), SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> и свинца в воздухе используются с целью мониторинга воздуха, выявления локальных горячих точек окружающей среды, и разработки стратегий лечения и оптимальных путей превенции заболеваемости [9].

Анализ полученных данных выявил патологии (J44, J42), которые с высокой степенью вероятности ассоциируются с неблагоприятным воздействием факторов окружающей среды в некоторых селах Чиатурского муниципалитета и указывает на орган-мишень внешнего воздействия, маршруты распространения, пути воздействия загрязнителей.

Выбор оптимальных количественных характеристик заболеваемости населения, их качество и информативность во многом определяется дизайном медицинского обследования, критериями и методами, применяемыми при диагностике патологий.

Проведенные медицинские обследования относятся к нерандомизированным исследованиям кросс-секционного типа. Информация, полученная в результате исследований подобного типа, отражает степень распространения заболеваний в популяции (превалентность) и содержит информацию о связи этиологического фактора с заболеваемостью и летальностью населения [13]. Установление прямой причинно-следственной связи между превалентно-

стью и количественными характеристиками влияния окружающей среды (риск, атрибутивный риск) возможно только в рамках определенных теоретических моделей с учётом ряда строгих допущений [19]. Поэтому на данном этапе исследований в качестве показателя причинно-следственной связи между внешним воздействием и вероятностью развития патологии применяли отношение шансов. Данный показатель, хотя количественно и отличается от риска, но по существу совпадает с ним.

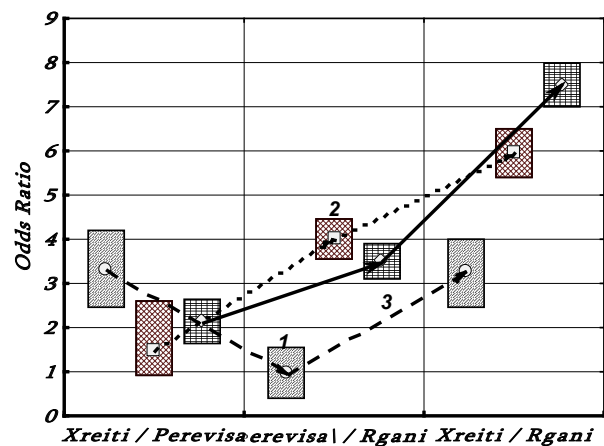


Рис. 3. Значения отношения шансов развития хронических бронхитов - 1, ХОЗЛ-2, и их суммарного значения - 3, между селами Хрейти/Перевиса, Перевиса/Ргани, Хрейти/Ргани. Заштрихованные прямоугольники – стандартная ошибка среднего значения

Представленные на рис. 3 графики отношения шансов развития хронических бронхитов, ХОЗЛ, а также их суммарное значение, статистически достоверно указывают на наличие причинно-следственной связи между уровнем заболеваемости в обследованных популяциях и степенью экологического напряжения в местах их расселения. Однако для количественной оценки интенсивности и масштабов внешнего воздействия (концентрация загрязнителя в точке экспозиции, интенсивность включения, доля субпопуляции, находящейся под риском воздействия) необходимо проведение анализа соответствия характеристик обследованных выборок с таковыми генеральной совокупности (репрезентативность).

Поскольку проведенные медицинские обследования относятся к нерандомизированным кросс-секционным исследованиям, превалентность ХОЗЛ в



популяциях добровольцев, однозначно резко отличается от таковой в генеральной совокупности, что обусловило значительные погрешности в суждениях, оценках и интерпретациях результатов, в первую очередь, в обследованной субпопуляции мужского пола, степень мотивированной готовности к обследованию которой в 2-3 раза меньше, чем у женщин (рис. 4).

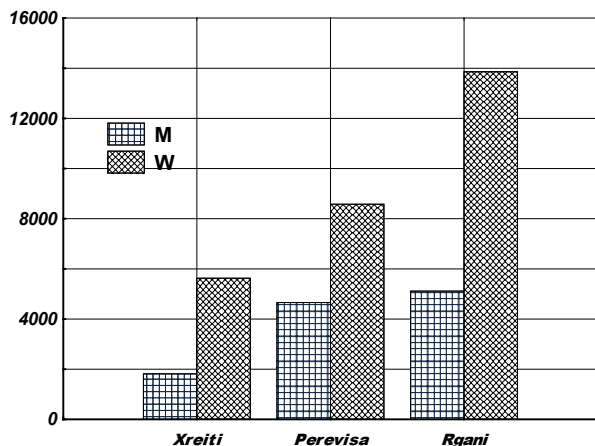


Рис. 4. Общая превалентность заболеваний в мужской (M) и женской (W) популяциях сел Хреити, Перевиса и Ргани

Оптимальным путем решения такого рода сложностей является применение процедуры стратифицированного анализа [13] – подбор под-выборки (индикаторная группа) в сравниваемых выборках, репрезентативно соответствующей страте генеральной совокупности.

Как известно, особенностью ХОЗЛ является длительный период развития (симптомы заболевания выявляются у лиц, старше 35 лет) [18]. Следовательно, отношение шансов развития ХОЗЛ в группе населения сравниваемых популяций старше 40-50 лет адекватно отражает фактор воздействия внешней среды. В возрастной группе старше 40-50 лет с большой вероятностью формируются основные хронические заболевания, следовательно, по критерию наличия проблемы здоровья выборочную группу населения старше 50 лет с высокой степенью надежности можно считать репрезентативной.

Уточняющий эффект стратификации по признаку возраста и пола проявляется в тенденции сближения значений ОШ между мужскими и женскими выборками групп населения в возрасте старше 50 лет (рис. 5).

Особенно четко это проявляется в ОШ между селами Хреити и Ргани, что позволяет предположить, что шансы (вероятность) развития ХОЗЛ в селе Ргани приблизительно в 5-7 раз выше, чем в селе Хреити.

Следует отметить, что ОШ (при одинаковой чувствительности к внешнему воздействию) является интегральным показателем как интенсивности, так и масштабов воздействия. Для оценки этих показателей

по отдельности, необходимы дополнительные данные о пространственном распределении зон повышенного риска, которые можно определить геостатистическим анализом пространственного распределения отдельных кейсов индикаторных патологий, однако это тема будущих исследований.

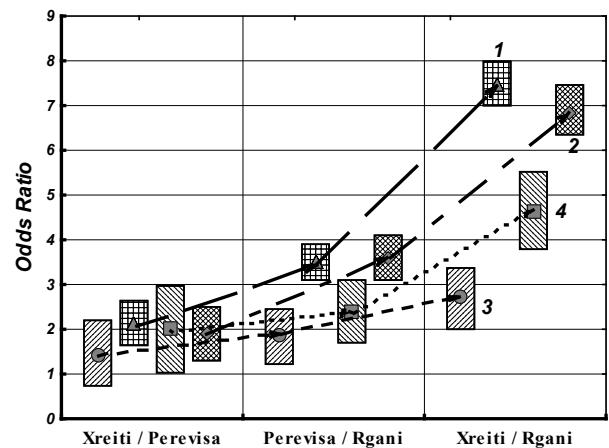


Рис. 5. Значения отношения шансов в развитии хронических обструктивных заболеваний легких у жителей в селам Хреити/Перевиса, Перевиса/Ргани, Хреити/Ргани в выборках женских популяций (1); в группах женщин старше 50 лет (2), в выборках мужских популяций (3) и в группах мужчин старше 50 лет (4)

**Выводы.** На основе проведенного анализа в исследованных населенных пунктах выявлены классы заболеваний (ХОЗЛ, хронический бронхит), которые статистически достоверно причинно-следственно связаны с возможным неблагоприятным воздействием факторов окружающей среды. Статистически достоверные различия в превалентности хронических заболеваний нижних дыхательных путей в исследованных селам свидетельствует о загрязнении воздуха. Установлена ассоциация превалентности развития хронических заболеваний легких со степенью экологического загрязнения территории.

Выявлена высокая информативность данных, полученных в процессе амбулаторного обследования пациентов с точки зрения выявления локальных очагов экологической напряженности. Полученные результаты могут быть рассмотрены в качестве входных данных для Байесовской мультифакторной регрессионной модели, позволяющей проводить детальный количественный анализ причинно-следственной связи между степенью экологической напряженности и уровнем заболеваемости населения, с учётом всех возможных неопределенностей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Елисева М.А. Анализ неопределенности при оценивании риска безопасности сложных объектов, Система обработки информации, 2013, выпуск 4 (111).

2. Шур П.З., Шляпников Д.М., Алексеев В.Б., Чигвинцев В.М. Перспективы оценки профессионального риска с применением методов моделирования. // Медицина труда и промышленная экология 2014; 12: 4-8.

3. Clean Air Act.US EPA, <http://www.epa.gov/lawsregs/laws/caa.html>

4. Commission of the European Communities. 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Off J Eur Communities, L230/1

5. Commission of the European Communities. 1993. Council Regulation 793/93/EEC of 23 March 1993 on the evaluation and control of the risks of existing substances. Off J Eur Communities, L84/1.

6. Davis JM. Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT): health risk uncertainties and research directions. Environmental health perspectives 1998; 106 (Suppl. 1):191-201.

7. Davis JM, Elias RW. Risk assessment of metals. In: Chang LW, ed. Toxicology of metals. Boca Raton, FL, CRC Lewis Publishers. 1996.

8. Duncan K. H. Fong, Peter Ebbes, Wayne S. DeSarbo, A Heterogeneous Bayesian Regression Model for Cross-sectional Data Involving a Single Observation per Response Unit, In: Psychometrika 2012; Volume 77, Issue 2 293-314.

9. Environmental Health Indicators: Framework and Methodologies, Occupational and Environmental Health Series, World Health Organization. Geneva: 1999.

10. Framework for Metals Risk Assessment, Office of the Science Advisor Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460, March 2007.

11. Gelman Andrew, Cosma Rohilla Shalizi, Philosophy and the practice of Bayesian statistics. British Journal of Mathematical and Statistical Psychology 2013; 66: 8–38.

12. Goldsmith J, Herishanu Y, Abarbanel J, Weinbaum Z. Clustering of Parkinson's disease points to environmental etiology. Archives of environmental health 1990; 45:88-94.

13. Hennekens CH, Buring JE. Epidemiology in Medicine, Lippincott Williams & Wilkins, 1987.

14. IPCS risk assessment terminology. Part 1: IPCS/OECD key generic terms used in chemical hazard/risk assessment. Part 2: IPCS glossary of key exposure assessment terminology. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Harmonization Project Document).

15. Schleier J. III, Marshall LA., Davis RS., Peterson RK.D. A quantitative approach for integrating multiple lines of evidence for the evaluation of environmental health risks. Peer J 2014; 3:730.

16. Martinez EZ, Achcar JA. Trends in epidemiology in the 21st century: time to adopt Bayesian methods. Cad Saude Publica 2014; 30(4):703-14.

17. Sarah Pirikahua, Geoffrey Jonesa, Martin L. Hazeltona

and Cord Heuer, Bayesian methods of confidence interval construction for the population attributable risk from cross-sectional studies, Statistics in Medicine, Stat Med. 2016; 35(18): 3117-30.

18. Shahab L, Jarvis MJ, Britton J, West R. Prevalence, diagnosis and relation to tobacco dependence of chronic obstructive pulmonary disease in a nationally representative population sample. Thorax 2006;61:1043–1047.

19. Statistical Methods in Cancer Research, Volume IV-Descriptive Epidemiology, IARC Scientific Publications No.128, International Agency for Research on Cancer, Lyon: 1994.

20. P. Brooks. Markov chain Monte Carlo method and its application. The Statistician 1998; 47: Part 1; 69-100.

21. WHO Public Health & Environment. Global Strategy Overview. 2011. World Health Organization. <http://www.who.int/en/>

## SUMMARY

### SCREENING LEVEL ENVIRONMENTAL HEALTH RISK ASSESSMENT BY HEALTH DATA IN SOME SMALL AREAS OF UPPER IMERETI (CHIATURA DISTRICT)

**Kvarackhelia G., Kverenchkhiladze R., Buleishvili M., Sharashenidze G., Sanikidze T., Ormotsadze G.**

*Beritashvili Center of Experimental Biomedicine, Laboratory of Problems of Radiation Safety; Tbilisi State Medical University; Davit Aghmashenebeli University of Georgia, Tbilisi, Georgia*

The article presents the results of a comparative analysis of health data in villages Rgani, Perevisa and Khreiti population (Chiatura municipality), which were obtained by the initiative group of the ak. N. Kipshidze Republican Hospital within the framework of the universal healthcare program of population insurance. The villages differ as by their remoteness from sources of ecological danger - manganese quarries, and scales of its achievement, which gives grounds to rank them according to the degree of ecological tension

The purpose of the research is to develop optimal for Georgia approach to obtain and analyze information for site-specific environmental health risks assessment

The analysis of the data was carried out using exploratory and evidentiary statistics: Cluster analysis, Logarithmic linear analysis and 2x2 conjugacy tables, correlation analysis, nonparametric statistics methods. As a measure of the adverse environmental impact on the health of the population, the ratio of the chances of developing pathologies was used. Statistical analysis and graphical visualization of the results were carried out using the STATISTICA-10 SPSS software.

It was found that in the villages the surveyed population differ statistically significantly in the levels of chronic obstructive pulmonary disease (J44) and chronic bronchitis (J42), which according to the recommendations of the World Health Organization are among the direct indices of indoor and outdoor air pollution. It was found that the values of the odds ratio (by prevalence) of the development of chronic lung diseases in the samples are associated with the degree of possible external exposure to them. A subsample (a population of people over 50 years old) representative of the corresponding population group was identified and on the basis of which it was established that the chance of developing chronic obstructive lung diseases in the village of Ragani is about 5-7 times higher than in the village of Khreiti.

The obtained results testify to the high information content of the survey data for site-specific assessments of environmental health risks. Specific directions for increasing their information content are outlined.

**Keywords:** environmental health risks assessment, chronic obstructive pulmonary disease, air pollution.

## РЕЗЮМЕ

### СКРИНИНГ-ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ ПО СПЕКТРУ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В НЕКОТОРЫХ ЗОНАХ ВЕРХНЕЙ ИМЕРЕТИИ (ЧИАТУРСКИЙ МУНИЦИПАЛИТЕТ)

Кварацхелия Г.Дж., Кверенчиладзе Р.Г.,  
Булейшвили М.Л., Лобжанидзе Н.Г.,  
Шарашенидзе Г.З., Саникидзе Т.В., Ормоцадзе Г.Л.

*Центр экспериментальной биомедицины им. И. Бериташвили, лаборатория проблем радиационной безопасности; Тбилисский государственный медицинский университет; Грузинский университет Давида Агмашенебели, Тбилиси, Грузия*

В статье представлены результаты сравнительного анализа данных о здоровье населения сел Ргани, Перевиса и Хрейти, Чиатурского муниципалитета, проводимых инициативной группой Республиканской больницы им. Н. Кипшидзе в рамках программы всеобщей страховки населения. Эти села отличаются как своей удаленностью от источников экологической опасности – карьеров добычи марганца, так и масштабами его добычи, что дает основание ранжировать их по степени экологической напряженности.

Проанализирован характер возможной причинно-следственной связи между экологической напряженностью и уровнем и характером заболеваемости населения.

Анализ данных проводили посредством методов разведочной и доказательной статистики: кла-

стерный анализ, логарифмо-линейный анализ и 2x2 таб-лицы сопряженности, корреляционный анализ, использовали также методы непараметрической статистики. В качестве меры неблагоприятного влияния окружающей среды на здоровье населения применяли отношение шансов развития патологий. Статистический анализ и графическую визуализацию результатов осуществляли посредством программного обеспечения STATISTICA v10.

Установлено, что в вышеуказанных селах обследованные выборки населения статистически значимо различаются по частоте случаев хронического обструктивного заболевания легких (J44) и хронических бронхитов (J42), которые согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения относятся к числу прямых показателей загрязнения воздуха в помещениях и на открытом пространстве. Значения отношения шансов (по превалентности) развития хронических заболеваний легких в обследованных выборках ассоциируются со степенью возможного внешнего воздействия на них. Идентифицирована подвыборка (популяция лиц старше 50 лет), репрезентативная соответствующей группе генеральной совокупности. Установлено, что шанс развития хронических обструктивных заболеваний легких в селе Ргани приблизительно в 5-7 раз выше, чем в селе Хрейти.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой информативности данных обследования для сайт-специфических оценок экологических рисков для здоровья.

## რეზიუმე

ადამიანის ჯანმრთელობის რისკების სკრინინგ-შეფასება ავადობის სპექტრის მიხედვით ზემო იმერეთის ზოგიერთ ზონაში (ჭიათურის მუნიციპალიტეტი)

გ. კვარაცხელია, ზრ. კვერენჩილაძე, მ. ბუღეი-შვილი, გ. შარაშენიძე, თ. სანიკიძე, გ. ორმოცაძე

ნ. ბერიტაშვილის სახ. ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრი; <sup>2</sup>თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი; საქართველოს დავით აღმაშენებლის სახ. უნივერსიტეტი, თბილისი, საქართველო

ნაშრომში წარმოდგენილია ჭიათურის მუნიციპალიტეტის სოფლების - რგანის, პერევისას და ხრეითის - მოსახლეობის ჯანმრთელობის მონაცემთა შედარებითი ანალიზის შედეგები. მონაცემები მოპოვებულია ნ. ყიფშიძის სახელობის რესპუბლიკური საავადმყოფოს საინიციატივო ჯგუფის მიერ საყოველთაო დაზღვევის პროგრამის ფარგლებში. აღნიშნული სოფლები განსხვავდება როგორც დაშორებით ეკოლოგიური საფრთხის წყაროს - მადნის მოპოვებელი

კარიერებიდან, ასევე, მადნის მოპოვების მასშტაბით, რის გამოც შესაძლებელია მათი დიფერენცირება ეკოლოგიური დაძაბულობის ხარისხის მიხედვით.

შესწავლილია შესაძლო მიზეზ-შედეგობრივი კავშირი ეკოლოგიური დაძაბულობის ხარისხს, მოსახლეობის ავადობის დონესა და ხასიათს შორის.

გამოყენებული იყო აღწერითი და მტკიცებითი სტატისტიკის მეთოდები, კლასტერული ანალიზი, ლოგარითმულ-წრფივი ანალიზი და 2x2 შეუღლებული ცხრილები, კორელაციური ანალიზისა და არაპარამეტრული სტატისტიკის მეთოდები. შედეგების სტატისტიკური სარწმუნობისათვის გამოყენებული იყო საშუალო სტანდარტული გადახრა და დამაჯერებლობის 95%-იანი ინტერვალი, სტატისტიკური ანალიზისა და შედეგების გრაფიკული ვიზუალიზაციისათვის კი - პროგრამული უზრუნველყოფა Statistica-10.

დადგენილია, რომ ზემოაღნიშნულ სოფ-

ლებში მოსახლეობის გამოკვლეული კონტიგენტი სტატისტიკურად სარწმუნოდ განსხვავდება ფილტვების ქრონიკული ობსტრუქციული დაავადებისა და ქრონიკული ბრონქიტის პრევალენტობით; გამოვლინდა სტატისტიკურად სარწმუნო კორელაცია ამ დაავადებათა სივრცით ვარიაბელობაში. ჯანმო-ს რეკომენდაციით აღნიშნული დაავადებები განიხილება ჰაერის დაბინძურების პირდაპირ (ინდიკატორულ) მაჩვენებლებად.

მოსახლეობის რეპრეზენტატულ ჯგუფებში (50 წელზე მეტი ასაკის პოპულაცია) ავადობის შედარებითი ანალიზის საფუძველზე დადგენილია, რომ ფილტვების ქრონიკულ დაავადებათა განვითარების შანსი სოფელ რგანში 5-7-ჯერ მეტია, ვიდრე სოფელ ხრეთში.

მიღებული შედეგებით დადგენილია შესწავლილი მასალის მაღალი ინფორმატიულობა ჯანმრთელობის ეკოლოგიური რისკის საიტ-სპეციფიკური შეფასებისათვის.

\* \* \*