

Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»

Українська Академія наук національного прогресу

Проблеми екології та медицини

Том 18 N 1-2 2014

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

За-

снований в 1997 році

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

ФОРМУВАННЯ БАЗИ ДАНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЗРАЗКІВ ЯК СТРАТЕГІЧНЕ ЗАВДАННЯ СУЧАСНИХ
МЕДИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. 3

ENGLISH VERSION: CREATING A GENETIC DATABASE AS A STRATEGIC CHALLENGE OF MODERN
MEDICAL RESEARCHES

Vesnina L., Kaidashev I. 8

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

ДИСБАЛАНС МУКОЗАЛЬНОГО ІММУНІТЕТА ПРИ СРЕДНЕТЯЖЕЛОЙ И ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМЕ

Белоглазов В.А., Попенко Ю.О. 13

ENGLISH VERSION: IMBALANCE OF MUCOSAL IMMUNITY AT MODERATE AND SEVERE BRONCHIAL
ASTHMA

Beloglazov V.A., Popenko Yu.O. 15

ЕФЕКТИВНІСТЬ ТА НЕОБХІДНІСТЬ ПРОВЕДЕННЯ ЕТІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ У ХВОРИХ НА
ІНФЕКЦІЙНІ ЗАХВОРЮВАННЯ НИЖНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Перцева Т.О., Кіресва Т.В., Штепа О.О. 17

ENGLISH VERSION: THE EFFECTIVENESS AND NECESSITY OF CARRYING OUT ETIOLOGICAL
DIAGNOSTICS IN PATIENTS WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

Pertseva T. O., Kireyeva T.V., Shtepa O.O. 21

ОСОБЛИВОСТІ ЕТІОЛОГІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКА У ХВОРИХ НА ТЯЖКУ НЕГОСПІТАЛЬНУ
ПНЕВМОНІЮ

Перцева Т. О. , Кіресва Т. В. , Бєлослудцева К. О. 26

ENGLISH VERSION: FEATURES OF ETIOLOGY AND PATHOGEN IDENTIFICATION IN PATIENTS WITH
SEVERE COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA

Pertseva T. , Kireeva T. , Bielosludtseva K. 30

ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

ПРОБЛЕМА СНІД-ІНДИКАТОРНИХ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ

Бугасько Н.С., Сергеева Т.А. * 34

ENGLISH VERSION: PROBLEM OF AIDS INDICATOR INFECTIOUS DISEASES

Bugayenko N.S., Sergeyeva T.A. * 39

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

СОСТОЯНИЕ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ
ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ ЛАПРОКСИДОВ

Кучерявченко М.А., Зайцева О.В., Жуков В.И., Книгавко В. Г. 44

ENGLISH VERSION: BIOENERGETIC METABOLISM STATE IN ALBINO RATS UNDER THE LONG-LASTING
EXPOSURE OF THE LAPROXIDES SUBTOXIC DOSES

Kucheryavchenko M.A., Zaitseva O.V., Zhukov V.I., Knigavko V.G. 47

СОСТОЯНИЕ ОБМЕНА L-ТРИПТОФАНА В УСЛОВИЯХ ПОДОСТРОГО ОПЫТА ПОД ВЛИЯНИЕМ
ОЛИГОЭФИРЦИКЛОКАРБОНАТА В СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗАХ

Багмут И.Ю. 50

ENGLISH VERSION: STATE OF EXCHANGE OF L-TRYPTOPHAN IN THE SUBACUTE EXPERIMENT UNDER
INFLUENCE OF OLIGOETHERCYCLOCARBONAT IN THE SUBTOXIC DOSES

Bagmut I. Yu. 53

МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

КОМПЛЕКСНА ДІАГНОСТИКА ВИРАЗКОВО-ІНФІЛЬТРАТИВНОГО РАКУ ШЛУНКА

Харченко О.В. 56

ENGLISH VERSION: COMPLEX DIAGNOSTICS OF ULCEROINFILTRATIVE GASTRIC CANCER

Kharchenko O.V. 59

АСПЕКТИ РЕАБІЛІТАЦІЇ

МІСЦЕ ПСИХОФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА СТРЕС-АСОЦІЙОВАНУ АРТЕРІАЛЬНУ
ГІПЕРТЕНЗІЮ

Подольський О.В., Стеблюк В.В. 63

ENGLISH VERSION: POINT OF PSYCHOPHYSICAL REHABILITATION IN TREATMENT OF PATIENTS WITH
STRESS ASSOCIATED HYPERTENSION

Podolsky, A.V., Stebliuk V.V. 66

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ

INFORMATION FOR AUTHORS

© Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.
УДК 575.191+616-002(477.53)

ФОРМУВАННЯ БАЗИ ДАНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЗРАЗКІВ ЯК СТРАТЕГІЧНЕ ЗАВДАННЯ СУЧАСНИХ МЕДИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ*

Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.

НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м.Полтава, Україна

На базе Научно-исследовательского института генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики (НИИ ГИОРПФ) среди первых на Украине начато формирование базы данных генетических образцов. Ее создание определено необходимостью мониторинга распространенных патологических состояний - метаболического синдрома, сахарного диабета, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, аллергических воспалений, урогенитальных инфекций, патологии иммунной, эндокринной систем, соединительной ткани. Создание системы генетического мониторинга и определения генетических маркеров восприимчивости к инфекционным агентам, склонности к развитию болезней неинфекционного генеза позволит контролировать уровень заболеваемости населения Украины путем прогнозирования риска развития определенных патологических состояний, характера течения и скорости прогрессирования патологического процесса, формирования групп риска возможной заболеваемости начиная с детского возраста. Использование фармакогенетического подбора основных групп препаратов позволит обеспечить снижение прямых материальных затрат на лечение, снизить частоту и тяжесть осложнений, способствовать внедрению индивидуальных стратегий профилактики и повышения уровня здоровья.

Ключевые слова: база данных, генетические образцы, полиморфизмы.

Бурхливий розвиток молекулярної і клітинної біології істотно розширив наші уявлення про біохімічні, фізіологічні, молекулярні та інші процеси, що відбуваються в організмі здорової людини, та дозволяють нам робити висновки про стан тонких патогенетичних механізмів окремих клінічних симптомів і захворювань. Світовий медичний досвід свідчить, що не менш важливими є досягнення генетики людини, які в повній мірі можуть реалізувати свій потенціал в сумісній роботі генетиків та лікарів за умов виконання біоетичних і деонтологічних норм досліджень.

Потреба діагностики та забезпечення медико-генетичного консультування не тільки рідкісних генетичних захворювань, що супроводжуються важкими порушеннями та ускладненнями, але й найпоширеніших хвороб, таких як цукровий діабет, ішемічна хвороба серця, артеріальна гіпертензія, атеросклероз, що наразі є значною проблемою практичної медицини, поставило першорядним завданням питання створення баз даних генетичних зразків. У подальшій перспективі інтеграція баз даних з експертними системами дозволить суттєво розширити можливості лікаря та підвищити ефективність діагностичних рішень - на підґрунті даних генетичного моніторингу з'являється можливість розробки ефективних програм профілактики, використання яких дозволить попередити розвиток захворювань, зберегти здоров'я та подовжити життя людей, що в цілому має неабиякий позитивний економічний ефект для суспільства.

На базі Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики (НДІ ГИОРПФ) протягом кількох років серед перших на Україні створена та продовжує наповнюватись база даних генетичних зразків, формування якої визначено необхідністю моніторингу таких поширених

патологічних станів, як метаболічний синдром, цукровий діабет, артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, алергічні запалення, урогенітальні інфекції, патологія імунної, ендокринної систем, сполучної тканини. Незважаючи на різні клінічні прояви, ці захворювання поєднує до кінця не визначені аспекти етіології та патогенезу, що ускладнює та інколи робить цілком неефективними профілактичні та лікувальні заходи.

Роботу зі збору зразків було розпочато в межах Державних програм «Цукровий діабет», «Програми профілактики і лікування артеріальної гіпертензії в Україні» та «Програми профілактики та лікування стоматологічних захворювань».

Формування баз проводилось відповідно до тематики науково-дослідних робіт, що отримували бюджетне фінансування: «Вивчення переключення синтезу імуноглобулінів у хворих на бронхіальну астму для розробки нових методів етіологічної і патогенетичної терапії», № ДР 0106U003241; «Розробка методів профілактики та лікування хвороб, які походять із метаболічного синдрому, препаратами, що стимулюють рецептори, активуючі PPAR-γ, шляхом удосконалення критеріїв діагностики», № ДР 0107U01555; «Визначення ролі поліморфізму Toll-подібних рецепторів у механізмах розвитку імуноопосередкованих захворювань», № ДР 0109U001629; «Вивчення генетичних особливостей розвитку алергічного запалення та формування органів-мішеней», № ДР 0110U003032; «Комплексне дослідження генетично обумовлених особливостей NF-kB-опосередкованої сигнальної трансдукції, що визначає розвиток хронічного системного запалення, у хворих на метаболічний синдром та цукровий діабет 2 типу», № ДР0111U001774; «Роль запальних захворювань зубо-щелепного апарату в роз-

*Цитування при атестації кадрів: Л.Е.Весніна, І.П.Кайдашев. формування бази даних генетичних зразків як стратегічне завдання сучасних медичних досліджень // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 3 –7.

витку хвороб, пов'язаних із системним запаленням», № ДР0112U001538.

Метою створення бази даних генетичних зразків представників української популяції стала нагальна потреба моніторингу та контролю рівня захворюваності найбільш поширеними хворобами інфекційної та неінфекційної природи серед населення України, визначення та обґрунтування провідної ролі генетичних чинників, що зумовлюють їх розвиток, та на цій основі - розробка цільових програм ранньої діагностики та лікування, формування груп ризику захворюваності та прогнозування характеру плинності і швидкості прогресування патологічного процесу.

Матеріали та методи дослідження

На проведення дослідження отримано згоду комісії з біоетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія». Відповідно до стандартів Good Laboratory Practice (GLP) та Good Clinical Practice (GCP) з усіма пацієнтами проводилось підписання інформованої згоди, отримувалась добровільна згода на проведення обстеження у батьків пацієнтів-дітей.

Отримання біологічного матеріалу (кров, сироватка, сухі плями крові, зішкріб епітелію) проводилось зранку натщесерце стандартними способами для зберігання або негайного дослідження. Тривале зберігання проб біоматеріалу здійснюється з використанням низькотемпературного холодильного обладнання (т від -24° до -70°C).

Під час реєстрації пацієнтів враховувались основні параметри: паспортні дані, стать, вік, наявність встановленого діагнозу, наявність результатів обстеження. Первинна реєстрація проводилась в поточних жу-

рнах реєстрації, потім дані про пацієнта та результати обстеження вводились в електронну базу в форматі Microsoft Office Excel 2007. Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми «STATISTICA for Windows 7.0» (StatSoft Inc, США).

Результати та їх обговорення

Із початку формування бази генетичних зразків були визначені основні напрямки роботи: моніторингове обстеження когорт умовно здорових осіб, жителів Полтавської області; хворі на уrogenітальні захворювання; особи, які первинно обстежувались або знаходились на лікуванні у ендокринолога з приводу хвороб щитоподібної залози; пацієнти з ознаками алергічного запалення; пацієнти з порушеннями ліпідного обміну та ознаками метаболічного синдрому; пацієнти з захворюваннями сполучної тканини.

Нижче ми надамо короткий опис деяких зразків та приклади їх практичного використання.

На першому етапі дослідження проведено формування групи популяційного контролю, яка була підібрана з практично здорових осіб різного віку та статі (табл.1). Для проведення когортного обстеження групи популяційного контролю попередньо була розроблена карта спостережень у формі опитувальника, в якій особа надавала детальні дані про вік, стать, національність, дані соціально-побутового, професійного, генетичного, епідеміологічного, алергологічного, терапевтичного, хірургічного анамнезів, дані клінічного стану на час огляду і об'єктивні дані зі сторони різних органів та систем. У подальшому карта доповнювалась даними лабораторних досліджень та вся інформація фіксувалась в електронному вигляді.

Таблиця 1
Структура бази даних генетичних зразків НДІ ГОРПФ

Групи	Кількість зразків	Стать		Вік		Лабораторні методи дослідження
		чол.	жін.	чол.	жін.	
1	2	3	4	5	6	7
Умовно здорові особи	114	47	67	Від 18 до 62 р.	Від 18 до 62 р.	ліпідний обмін, глюкоза, цитокіни, поліморфізми 2258G/A TLR2 (rs5743708) 896A/G TLR4 (rs4986790)
Уrogenітальні захворювання	341	195	146	Від 20 до 80 р.	Від 20 до 80 р.	поліморфізми 2258G/A TLR2 (rs5743708) 896A/G TLR4 (rs4986790) 1196C/T TLR4 (rs4986791)
Захворювання щитоподібної залози	2547	1018	1529	Від 20 до 80 р.	Від 20 до 80 р.	T3, T4, ТТГ, АТ до ТПО, АТ до ТТГ
Алергічні захворювання	620			Від 6 міс. до 84 р.	Від 6 міс. до 84 р.	Алерген-специфічні IgE
Бронхіальна астма	45	18	27	Від 18 до 70 р.	Від 18 до 70 р.	IgE, IL-4, IL-10, CD4, CD25, Foxp3 поліморфізми 2258G/A TLR2 (rs5743708), 896A/G TLR4 (rs4986790)
Алергічний риніт	45	23	22	Від 19 до 65 р.	Від 19 до 65 р.	CD4 ⁺ , CD4 ⁺ /25 ⁺ , CD4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 поліморфізм 896A/G TLR4 (rs4986790)
Атопічний дерматит	50	24	26	Від 2 до 7 р.	Від 2 до 7 р.	CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, IgA, IgM, IgG, IgE, ЦІК поліморфізми 2258G/A TLR2 (rs5743708), 896A/G TLR4 (rs4986790), 1196C/T TLR4 (rs4986791)
Дисліпідемія	199	95	104	Від 20 до 80 р.	Від 20 до 80 р.	ліпідний обмін, церулоплазмін, поліморфізм PPARγ (Pro12Ala)

Продовження таблиці 1

Метаболічний синдром	1441	567	874	Від 18 до 75 р.	Від 18 до 75 р.	ліпідний обмін, глюкоза, глікозильований гемоглобін, цитокіни,
----------------------	------	-----	-----	-----------------	-----------------	--

						поліморфізми PPAR γ (Pro12Ala), LPL (C \rightarrow T, intron 6); LPDR (C \rightarrow T, intron 15); MTHFR (Ala222Val)
Комбінована патологія: метаболічний синд- ром, артеріальна гіпе- ртензія	106	106	-	Від 20 до 80 р.	Від 20 до 80 р.	поліморфізми AGTR1 (A1166C); ACE (Alu Ins/Del I>D)
Комбінована патоло- гія: метаболічний синд- ром, ішемічна хворо- ба серця, бронхіальна астма, ендотеліальна дисфункція	102	69	33	Від 40 до 75 р.	Від 40 до 75 р.	ліпідний обмін, глюкоза, цитокіни, CRP, ICAM-1, VCAM-1 поліморфізм PPAR γ (Pro12Ala), експресія NF-kB1, NF-kB2
Дослідження генів структурних білків	159	72	87	Від 20 до 95 р.	Від 20 до 95 р.	поліморфізми MMP12 (A-82G); MMP20 (g.16250T>A); KLK (g.2142G>A); ELN (g28197 A>G)
Захворювання спо- лучної тканини	53	22	31	Від 20 до 80 р.	Від 20 до 80 р.	Скринінгова панель: Ro/SS-A, La/SS-B, Scl-70, PM-Scl-100, Jo-1, PCNA, dsDNA, rib.P-Protein, CENP- B, AMA-M2, PR3, MPO, TPO, тирео- глобулін

Спочатку до групи популяційного контролю увійшли 114 умовно здорових осіб, віком від 19 до 62 років. У процесі формування група популяційного контролю доповнювалася зразками 185 осіб різного віку та статі жителів Полтавської області, які на час обстеження вважались умовно здоровими. Групу осіб із урогенітальними захворюваннями (хламідіоз, уреоплазмоз, трихомоніаз, гарднерельоз, мікоплазмоз, бактеріальний вагіноз) сформували пацієнти в кількості 156. Загалом же загальна кількість обстежених осіб складала 455 пацієнтів.

Яким чином можливо використати даний матеріал? Саме з використанням наведених зразків вперше в українській популяції було досліджено поширеність однонуклеотидних поліморфізмів генів TLR2 Arg753Gln із заміною G на A в позиції 2258 (rs5743708) та TLR4 Asp299Gly із заміною A на G в позиції 896 (rs4986790) і Thr399Ile із заміною C на T в позиції 1196 (rs4986791) серед практично здорових осіб Полтавської популяції та серед хворих на поширені урогенітальні захворювання [1].

Досліджено 299 осіб із групи популяційного контролю (умовно здорові), врівноважених за статтю, віком від 19 до 62 років, та 156 осіб різного віку та статі хворих на урогенітальні інфекції. Матеріалом для дослідження був зішкріб епітеліальних клітин із уретри або цервікального каналу, який отримували за допомогою спеціальних одноразових стерильних урогенітальних зондів.

Виявлено достовірну залежність між наявністю у генотипі мутантної алелі A (генотипи GA і AA) гена TLR2 і мутантної алелі G (генотипи AG і GG) гена TLR4 та підвищенням ризиком інфікування поширеними урогенітальними інфекціями ($\chi^2=7,99$; ВШ=2,01; ДІ=1,26-3,21; $p=0,0047$), що дозволяє розглядати дані однонуклеотидні поліморфізми у якості додаткового прогностичного показника при патогенетичних дослідженнях.

Із 2008 року проводиться набір зразків пацієнтів із алергічним запаленням (табл. 1). Критерії включення до групи - наявність ознак і/або чітко встановленого діагнозу алергічного запалення за класифікацією

МКХ10 (бронхіальна астма, алергічний риніт, atopічний дерматит, кропив'янка). Кількість зразків становить 620, формування бази триває. Віковий розбіг серед пацієнтів - від 6 місяців до 84 років, середній вік обстежених дітей 4,3 \pm 3,5 роки.

Проведено визначення ролі поліморфізмів генів, що кодують TLR2 (rs5743708) і TLR4 (rs4986790, rs4986791) у підвищенні рівня продукції специфічних імунoglobulinів E (IgE) і розвитку алергічного запалення [5]. Було проведено генотипування цих трьох однонуклеотидних поліморфізмів у групі контролю та хворих на алергічне запалення. В якості біологічного матеріалу використовували суху пляму крові.

Групу хворих склали 38 осіб із алергічними запаленнями: atopічною бронхіальною астмою – 19, atopічним дерматитом – 13 і atopічним ринітом – 6 пацієнтів. Критерієм відбору стала наявність підвищеної концентрації алерген-специфічних IgE (від 3,5 до 100 kU/l) хоча б до одного із алергенів. Для верифікації IgE-залежних алергічних запалень проводили дослідження специфічних IgE до 20 найбільш значущих алергенів [5]. Контролем слугувала група популяційного контролю - 95 осіб з відсутністю алергічного запалення в анамнезі.

У результаті проведених досліджень встановлено зв'язок поліморфізмів TLR2 (rs5743708) і TLR4 (rs4986790) з підвищеним рівнем продукції специфічних IgE у пацієнтів з алергічними запаленнями, що дозволяє розглядати дані однонуклеотидні заміни в якості додаткової прогностичної ознаки індивідуальної схильності до цих захворювань.

Окремо сформовано групу із 140 пацієнтів із алергічною патологією (бронхіальна астма, алергічний риніт, atopічний дерматит), яким проводилось визначення поліморфних варіантів генів TLR2, TLR4 та показників стану імунної системи [7,9]. Дослідження поліморфних варіантів гену TLR4 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) та гену TLR2 2258G/A (rs5743708) показало, що саме поліморфізм 896A/G гену TLR4 визначає тяжкий та ускладнений перебіг atopічного дерматиту у дітей [8].

Формується база пацієнтів, які звернулись до НДІ ГІОРПФ з приводу обстеження на захворювання щитоподібної залози. На теперішній час кількість зібраних зразків становить 2547, що є найбільш вагомою часткою усієї бази даних. Вік обстежених осіб від 20 до 80 років.

У рамках Державної програми «Програма профілактики і лікування артеріальної гіпертензії в Україні» сумісно з ННЦ «Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска» НАМН України було розпочато формування напрямку, метою якого є дослідження патогенезу метаболічного синдрому (МС) та хронічного системного запалення.

Проведено обстеження жителів м. Полтави – 896 осіб, із них – 579 жінок та 317 чоловіків, віком від 18 до 64 років. У м. Черкаси обстежено 388 осіб, із них – 222 жінок віком від 18 до 63 років та 166 чоловіків віком від 19 до 64 років (табл. 1).

З використанням даних цього напрямку досліджено поширеність поліморфізму Rvu II гену ліпопротеїнази (ЛПЛ) у Черкаській популяції та зв'язок із розвитком артеріальної гіпертензії [12].

Для вивчення поліморфізму гену ЛПЛ на базі 1-ї міської лікарні м. Черкаси було відібрано 85 чоловіків віком 19-66 років та поділено на групи: контрольну – з нормальними показниками артеріального тиску <140/90 мм рт.ст. (n=47) та основну (n=38) – з рівнем артеріального тиску ≥140/90 мм рт.ст. або за наявності в анамнезі діагнозу артеріальної гіпертензії.

Розподіл поліморфізму ЛПЛ у групі популяційного контролю та чоловіків із наявністю артеріальної гіпертензії у Черкаській популяції було проведено вперше. В групі популяційного контролю частоти генотипів склали: СС – 29,79% СТ – 51,06%, ТТ – 19,15%, алелей С – 55,32%, Т – 44,68%. У чоловіків із гіпертензією частоти генотипів та алелей гену ЛПЛ значно не відрізнялись від групи популяційного контролю: СС – 34,21%, СТ – 47,37%, ТТ – 18,42%; С – 57,9%, Т – 44,1%.

Зв'язок між поліморфізмом RvuII гену ЛПЛ та розвитком артеріальної гіпертензії не було встановлено. Але отримані дані свідчать про доцільність подальшого дослідження даного поліморфізму у осіб із чітко встановленими ознаками метаболічного синдрому.

В рамках визначення генетичних чинників ризику розвитку есенціальної гіпертензії досліджено розподіл поліморфізму рецептора ангіотензину II 1-го типу AGTR1(A1166C) [4]. У здорових осіб (n=100) частота генотипів та алелей складала: АА – 51%, АС – 34%, СС – 15%; алелей А – 68%, С – 32%. Припущено переважну поширеність алелі С і генотипу СС у здорових людей в українській популяції. Частоти генотипів у пацієнтів з есенціальною гіпертензією (106 осіб): АА – 22,85%, АС – 51,9%, СС – 25,3%; алелей: А – 48,7%, С – 51,3%. Було зроблено висновок, що розвиток есенціальної гіпертензії пов'язаний із присутністю алелі С і її гомозиготної варіанти, а тяжкість і ускладнення гіпертонії залежить від присутності цієї алелі у генотипі. Українське населення має специфічний розподіл поліморфізму рецептора ангіотензину II 1-го типу з переважанням алелі С1166 і генотипу СС, що є чинником ризику есенціальної гіпертензії.

У цілому слід відзначити, що під час накопичення зразків цього спрямування виникла потреба розподілу на підгрупи, які дозволили більш ретельно досліджувати пацієнтів та акцентувати увагу на певній патології. Таким чином вдалося дослідити окремі поліморфні

варіанти цілої низки генів: рецептора ангіотензину II 1-го типу AGTR1(A1166C), ангіотензин-конвертуючого ферменту ACE (Alu Ins/Del I>D), рецептора, що активує проліферацію пероксисом у PPARγ (Pro12Ala), ліпопротеїнази LPL (C→T, intron 6), рецептора ліпопротеїнази LPDR (C→T, intron 15) [2,3]. Наразі збирається матеріал для продовження генетичних досліджень патогенезу метаболічного синдрому (табл.1).

Слід зазначити важливість використання бази для розробки ефективних новітніх схем терапії. Так, при дослідженні фармакогенетичних особливостей дії метформіну у пацієнтів з ІХС на фоні МС та цукрового діабету 2 типу з урахуванням Pro12Ala поліморфізму гену PPAR-γ2, визначена його висока терапевтична ефективність у хворих на ІХС на фоні цукрового діабету 2 типу, які мають генотип Pro/Pro, що надає можливість значним чином індивідуалізувати терапію [6].

Цікавим та перспективним є напрямком накопичення зразків для подальшого вивчення ролі генетичного поліморфізму генів структурних білків в розвитку запальних та дистрофічних процесів органів та тканин: матриксних металопротеїназ (MMP12 (A-82G); MMP20 (g.16250T>A)), калікреїну (KLK (g.2142G>A)), еластину (ELN (g28197 A>G)) (табл. 1)[10].

Так, проведено визначення поліморфізму генів калікреїну 4 (KLK4) в 4 екзоні g.2142 G>A (AF228497) у 72 пацієнтів із підвищеною стертістю зубів I-III ступеня (30 чоловіків, 42 жінки, віком від 20 до 62 років) [11].

Показано, що саме у носіїв алелі А поліморфізму g.2142 G>A гену *KLK4* спостерігаються більш тяжкі прояви підвищеної стертості зубів. Отримані дані підтверджують зв'язок між наявністю поліморфної алелі А гену *KLK4* з підвищеною стертістю зубів. Ці дані дозволяють розглядати даний поліморфізм в якості додаткового прогностичного показника надмірної втрати твердих тканин зубів, а виявлення мутантної алелі А гену *KLK4* дає змогу цілеспрямовано проводити профілактику та лікування пацієнтів з підвищеною стертістю зубів.

Велике практичне значення мають дані щодо пацієнтів з аутоімунними захворюваннями сполучної тканини – склеродермією, ревматоїдним артритом, васкулітом, які обстежуються на базі НДІ ГІОРПФ за допомогою сучасних скринінгових панелей, що забезпечують прицільну діагностику захворювання та значним чином підвищують ефективність терапії (табл. 1).

Робота зі створення бази даних генетичних зразків триває. За обсягом така робота достатньо кропітка, відповідальна, але можливості її практичного використання та значення важко оцінити. Ми торкнулися лише деяких спрямувань накопичення даних та певних прикладів їх подальшого використання в клінічній практиці. Слід зазначити, що перш за все крок за кроком доповнюються дані щодо розповсюдженості поліморфних варіантів генів в Українській популяції, створюється теоретичний фундамент медичної генетики, визначаються певні ланки патогенетичних механізмів.

Формування баз даних генетичних зразків дозволить значним чином інтенсифікувати проведення медичних досліджень. Систематизація та облік респондентів, які формують групи хворих та популяційного контролю проводиться в режимі електронних документів, що сприяє швидкому пошуку та можливості роботи зі значними за обсягом масивами даних, введення даних додаткового обстеження та даних досліджень в динаміці. Також, збільшуються можливості

використання сучасних методів статистичної обробки даних, ґрунтового аналізу частоти розповсюдження поліморфних варіантів генів в загальній популяції та в окремих групах респондентів.

Стандартизація методичних підходів до пошуку генетичних маркерів найпоширеніших хвороб дозволяє використовувати сучасні сертифіковані реагенти та тест-системи, потужне наукове обладнання. Всі ці фактори значним чином полегшують наукове співробітництво та зацікавленість в проведенні сумісних наукових досліджень по збору та обробці даних не тільки між науково-дослідними установами, але й клінічними центрами медичної генетики.

Створення системи генетичного моніторингу та визначення генетичних маркерів сприйнятливості до інфекційних агентів, схильності до розвитку хвороб неінфекційного ґенезу дозволить контролювати рівень захворюваності населення України шляхом прогнозування ризику розвитку певних патологічних станів, характеру плину і швидкості прогресування патологічного процесу, формування груп ризику можливої захворюваності починаючи з дитячого віку, використовувати ефективні технології профілактики. Розробка з урахуванням генетичної схильності цільових програм ранньої діагностики та лікування забезпечить зменшення прямих економічних витрат на медикаментозне лікування, тривалість перебування хворих на амбулаторному та стаціонарному лікуванні за рахунок фармакогенетичного підбору основних груп препаратів, знизить частоту ускладнень та рівень летальності і сприятиме впровадженню індивідуальних стратегій профілактичних заходів та підвищення рівня здоров'я.

В кінцевому плані провідне значення баз даних генетичних зразків полягає в стратегічному спрямуванні визначення генетичних маркерів цілої низки найпоширеніших хвороб, що стане основою збереження та стабільності санітарно-епідеміологічного благополуччя України. На наш погляд, такий здобуток дозволить вивести на принципово новий рівень фундаментальні та прикладні генетичні дослідження в Україні та цілком заслужено сприятиме зростанню авторитету нашої держави серед мирової наукової спільноти.

Література

1. Ізмайлова О.В. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій / О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, Н.О. Боброва, І.П. Кайдашев // Цитология и генетика. – 2011. – № 4. – С. 29 – 35.
2. Кайдашев И.П. Молекулярно-биологические аспекты гипертонической болезни: роль полиморфизма белков ренин-ангиотензиновой системы и рецепторов активирующих пролиферацию пероксисом / И.П. Кайдашев, В.Н. Ждан, М.С. Расин [и др.] // Укр. кардіол. ж-л. – 2010. – Додаток 1. – С. 65-74.
3. Кайдашев И. П. Полиморфизм пероксисом полифератор-активирующих рецепторов: новый аспект патогенеза атеросклероза, эссенциальной гипертензии и сахарного диабета 2 типа / И.П. Кайдашев, М.С. Расин, А.М. Расин // Украинський терапевтичний журнал. -2004. - №4. - С. 57-61.
4. Кайдашев И.П. Полиморфизм рецептора ангиотензина II 1-го типа у больных эссенциальной гипертензией в украинской популяции / И.П. Кайдашев, М.С. Расин, Л.Г. Савченко [и др.] // Цитология и генетика. – 2005. – 39, № 5. – С. 51-55.
5. Куценко Н.Л. Связь полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов 2 и 4 с аллергическими заболеваниями с повышенными уровнями специфических иммуноглобулинов Е / Н.Л. Куценко, О.В. Измайлова, Л.Э. Веснина, И.П. Кайдашев // Цитология и генетика. – 2012. - № 6. – С. 59-66.
6. Лавренко А.В. Фармакогенетические особенности действия метформина у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца на фоне метаболического синдрома и сахарного диабета 2 типа, с учетом полиморфизма гена PPAR-γ2 /А.В. Лавренко, О.А. Шлыкова, Л.А. Куценко [и др.] // Терапевтический архив. – 2012. - № 9. – С.35 – 40.
7. Левченко Л.Ю. Асоціація поліморфізму 896A/G гену TLR4 з перебігом atopічного дерматиту у дітей зі схильністю до гострих респіраторних вірусних інфекцій / Л.Ю. Левченко, О.В. Измайлова, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев // Проблеми екології та медицини. - 2012. - № 3-4. - С. 9-12.
8. Левченко Л.Ю. Поліморфізм 896A/G гена TLR4, а не 1196C/T гена TLR4 та 2258G/A гена TLR2 визначає тяжкий та ускладнений перебіг atopічного дерматиту у дітей / Л.Ю. Левченко, О.В. Измайлова, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев //Цитология и генетика. – 2013. – Т. 47, № 3. – С. 46-53.
9. Сакевич В.Д. Поширеність поліморфних алелей 2258G/A гена TLR2 та їх зв'язок з окремими імунологічними показниками серед хворих на алергічний риніт / В.Д. Сакевич, О.А. Шликова, Н.О. Боброва, І.П. Кайдашев //Астма та алергія. – 2013. – № 3. – С. 51-55.
10. Скрипник В.М. Поліморфізм гену еластину g28197 A>G визначає схильність до утворення патологічних рубців / В.М. Скрипник, Д.С. Аветіков, О.А. Шликова, І.П.Кайдашев //Проблеми екології та медицини. – 2012. - Т.16, № 5-6.- С. 61-64.
11. Ткаченко І.М. Визначення поліморфізму генів калекреїну-4 та матричної металопротеїнази-20 у пацієнтів з підвищеною стертістю зубів /І.М. Ткаченко, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев // Проблеми екології та медицини. – 2012. - Т.16, № 5-6.- С. 65-68.
12. Шликова О.А. Роль поліморфізму PVU II гену ліпопротеїнази у патогенезі артеріальної гіпертензії / О.А. Шликова // Проблеми екології та медицини. - 2011. - Т. 15, № 1-2.- С. 22-25.

ENGLISH VERSION: CREATING A GENETIC DATABASE AS A STRATEGIC CHALLENGE OF MODERN MEDICAL RESEARCHES*

Vesnina L., Kaidashev I.

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Ukraine

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics among the first institutions in Ukraine had created a genetic database growing for the last few years. The creation of this database is necessary to monitor such common pathological conditions as metabolic syndrome, diabetes, arterial hypertension, coronary heart disease, allergic inflammation, urogenital infections, pathologies of immune and endocrine systems, and connective tissue. Creation of genetic monitoring system and identifying genetic markers of susceptibility to infectious agents and propensity to noninfectious origin diseases development will allow monitoring the level of morbidity in Ukraine by predicting the risk of developing certain pathological conditions, the nature and progression rate of pathological process, the formation of risk groups of possible morbidity since the childhood, and using effective prevention technologies. Development of targeted programs for early diagnosis and treatment taking into account a genetic predisposition will reduce the direct economic costs of medication, duration of outpatient and inpatient treatment by pharmacogenetic selection of main groups of drugs, decrease the incidence of complications and mortality level and will promote the introduction of individual strategies of preventive measures and improving health.

Keywords: databases, genetic samples, polymorphisms.

Rapid development of molecular and cell biology has significantly expanded our understanding of biochemical, physiological, molecular, and other processes in the healthy human body and allowed us to draw conclusions regarding subtle pathogenic mechanisms of particular clinical symptoms and diseases. World medical experience shows that the achievement in human genetics is no less important, and its potential could be fully realized in the collaboration of geneticists and physicians provided that the bioethical and deontological research norms will be met.

The need of medical diagnosis and genetic counseling of not only rare genetic diseases associated with severe disorders and complications but also the most common diseases such as diabetes, coronary heart disease, arterial hypertension, and atherosclerosis is currently a significant problem of practical medicine, that's why the creation of genetic database was assigned as a primary task. In the longer term, database and expert systems integration will significantly enhance the ability of doctors and increase the effectiveness of diagnostic decisions. Developing effective prevention programs becomes possible on the basis of genetic monitoring data; the use of such programs will prevent the development of diseases, maintain health and prolong people's lives, generally having a significant positive economic impact for society.

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics among the first institutions in Ukraine had created a genetic database that is growing for the last few years. This database is necessary to monitor such common pathological conditions as metabolic syndrome, diabetes, arterial hypertension, coronary heart disease, allergic inflammation, urogenital infections, pathologies of immune and endocrine systems, and connective tissue pathologies. Despite different clinical manifestations, these diseases do not have completely certain aspects of etiology and pathogenesis making it difficult and sometimes making preventive and therapeutic measures quite ineffective.

Collecting samples was begun within "Diabetes", "Prevention and treatment of arterial hypertension in Ukraine", and "Prevention and treatment of dental diseases" state programs.

Database creation had been conducted in accordance with the subjects of scientific researches that were funded by government "Study of switching of immunoglobulin synthesis in patients with bronchial asthma for developing new methods of etiologic and pathogenetic therapy", № SR 0106U003241; "Development of methods for the prevention and treatment of diseases resulting from metabolic syndrome with drugs that stimulate the receptors, activating PPAR- γ , by improving diagnostic criteria", № SR 0107U01555; "Defining the role of polymorphisms in Toll-like receptors in the development of immune mediated diseases", № SR 0109U001629; "Study of genetic features of allergic inflammation and target organs formation", № SR 0110U003032; "Complex research of genetically determined characteristics of NF- κ B-mediated signal transduction that specifies the development of chronic systemic inflammation in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes", № SR 0111U001774; "The role of inflammatory diseases of teeth-jaw apparatus in the development of diseases associated with systemic inflammation", № SR 0112U001538.

The purpose of creating genetic database of Ukraine's population representatives had become an urgent need to monitor and control the most common infectious and non-infectious diseases rate among Ukrainians, to define and substantiate the leading role of genetic factors contributing to their development, and, based on this, to develop targeted programs for early diagnosis and treatment, risk groups formation and predicting the nature and rate of progression of the pathological process.

Materials and methods

We received an approval of Bioethics Commission of Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy" to conduct the study. According to the standards of Good Laboratory Practice (GLP) and Good Clinical Practice (GCP) all patients signed an informed consent, and a voluntary consent was received from parents of children to the participation in the survey.

Biological materials (blood, serum, dried blood spots, epithelial scraping) were obtaining in the morning on an empty stomach using standard methods for storage or

* To cite this English version: Lyudmila Vesnina and Igor Kaidashev. Creating a genetic database as a strategic challenge of modern medical researches // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 8 -12.

immediate examination. Samples had been stored for a long time using a low-temperature refrigeration (from -24° to -70° C).

During patients' registration, basic parameters were taken into account: passport information, sex, age, established diagnosis, survey results. Primary registration has been made in the current registration journals, and then the patient data and survey results were put into a Microsoft Office Excel 2007 database. Statistical analysis of the research results had been conducted using STATISTICA for Windows 7.0 (StatSoft Inc, USA).

Results and discussion

Main areas of study were identified from the beginning of genetic database creation: monitoring survey of relatively healthy persons (citizens of the Poltava region), patients with urogenital diseases; persons who were initially examined or treated by an endocrinologist for thyroid diseases; patients with signs of allergic inflammation; patients with disorder of lipid metabolism and features of metabolic syndrome; patients with connective tissue diseases.

Below we provide a brief overview of some samples and examples of their practical use.

Population control group was created in the first phase of research and consisted of relatively healthy persons of different age and sex (Table 1). For the cohort survey of population control group, an observation card in a form of questionnaire was pre-designed, each surveyed person should provide there detailed data on age, sex, nationality, social, occupational, genetic, epidemiological, allergy, therapeutic, and surgical anamneses, clinical status data at the time of inspection and objective data regarding various organs and systems. Later, card was supplemented with laboratory research data, and all information was fixed electronically.

Initially, population control group included 114 relatively healthy persons aged from 19 to 62 years. While forming, population control group was supplemented with 185 examples of citizens of Poltava region with different age and sex, who were considered as relatively healthy persons at the time of the survey. Group of people with urogenital diseases (chlamydia, ureaplasmosis, trichomoniasis, gardnerellosis, mycoplasmosis, and bacterial vaginosis) was formed of 156 patients. Overall, the total number of surveyed persons was 455 patients.

How can we use this material? Precisely using named samples, the prevalence of single nucleotide polymorphisms of TLR2 gene Arg753Gln with replacement of G to A at position 2258 (rs5743708), and TLR4 genes Asp299Gly with replacement of A to G at position 896 (rs4986790) and Thr399Ile with replacement of C to T at position 1196 (rs4986791) was investigated for the first time in Ukraine's population among healthy persons of Poltava region's population and among patients with common urogenital diseases [1].

We studied 299 persons from population control group (relatively healthy), balanced by sex, aged from 19 to 62 years, and 156 patients of different age and sex with urogenital infections. Study material was epithelial cells scraped from the urethra or cervix that were obtained via special sterile disposable urogenital probes.

We found a reliable correlation between the presence of mutant A allele in a genotype (GA and AA genotypes) of TLR2 gene and mutant G allele (AG and GG genotypes) of TLR4 gene and the increased risk of infection

with common urogenital infections ($\chi^2=7.99$; OR=2.01; CI=1.26-3.21; $p=0.0047$) that's why these single nucleotide polymorphisms can be considered as an additional prognostic indicator in pathogenetic studies.

Since 2008, we are collecting samples of patients with allergic inflammation (Table 1). Criteria for inclusion in the group are the signs and/or a clearly established diagnosis of allergic inflammation according to ICD-10 (bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, urticaria). The number of samples is 620, creation of database is ongoing. Age range is from 6 months to 84 years, an average age of children is 4.3 ± 3.5 years.

The role of polymorphisms of the genes encoding TLR2 (rs5743708) and TLR4 (rs4986790, rs4986791) in increasing production of specific immunoglobulin E (IgE) and the development of allergic inflammation was determined [5]. We conducted genotyping of these three single nucleotide polymorphisms in the control group and in patients with allergic inflammation. Dry blood spots were used as biological material.

Group of patients consisted of 38 persons with allergic inflammations (19 persons with atopic asthma, 13 ones with atopic dermatitis, and 6 patients with atopic rhinitis). The selection criterion was the high level of allergen-specific IgE (from 3.5 to 100 kU/l) to at least one of allergens. To verify the IgE-dependent allergic inflammations, we studied specific IgE to 20 most important allergens [5]. Population control group consisting of 95 persons with a lack of allergic inflammation in history was used as a control.

As a study result, we established the relationship between TLR2 (rs5743708) and TLR4 (rs4986790) polymorphisms with elevated level of specific IgE production in patients with allergic inflammations that's why these single nucleotide replacements can be considered as an additional prognostic characteristic of individual susceptibility to these diseases.

We formed a separate group of 140 patients with allergic diseases (bronchial asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis), in whom were determined polymorphic variants of TLR2 and TLR4 genes and indicators of the immune system state [7, 9]. The study of polymorphic variants of TLR4 896A/G (rs4986790), 1196C/T (rs4986791) gene and TLR2 2258G/A (rs5743708) gene showed that exactly TLR4 gene 896A/G polymorphism causes the severity and complicated course of atopic dermatitis in children [8].

We are creating a database of patients who contacted Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics about screening for thyroid disease. 2547 samples amount the most significant part of the whole database now. Age range is from 20 to 80 years.

Within the state "Program of prevention and treatment of arterial hypertension in Ukraine" in cooperation with NRC "M. D. Strazhesko Institute of Cardiology" of NAMS of Ukraine, the direction with the purpose to study the pathogenesis of metabolic syndrome (MS) and chronic systemic inflammation was shaped.

Citizens of Poltava aged from 18 to 64 years were surveyed (896 persons in total: 579 women and 317 men). In Cherkasy 388 people were surveyed (222 women aged from 18 to 63 years and 166 men aged from 19 to 64 years) (Table 1).

Table 1

Genetic database structure of Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics

Groups	Number of samples	Sex		Age		Laboratory Methods
		M	F	M	F	
1	2	3	4	5	6	7
Relatively healthy persons	114	47	67	Aged 18-62 years	Aged 18-62 years	lipid metabolism, glucose, cytokines, polymorphisms 2258G/A TLR2 (rs5743708) 896A/G TLR4 (rs4986790)
Patients with urogenital diseases	341	195	146	Aged 20 - 80 years	Aged 20 - 80 years	polymorphisms 2258G/A TLR2 (rs5743708) 896A/G TLR4 (rs4986790) 1196C/T TLR4 (rs4986791)
Patients with thyroid diseases	2547	1018	1529	Aged 20 - 80 years	Aged 20 - 80 years	T3, T4, TSH, Ab to TPO, Ab to TSH
Patients with allergic diseases	620			Aged 6 months- 84 years	Aged 6 months- 84 years	Allergen-specific IgE
Patients with bronchial asthma	45	18	27	Aged 18 - 70 years	Aged 18 - 70 years	IgE, IL-4, IL-10, CD4, CD25, Foxp3 polymorphisms 2258G/A TLR2 (rs5743708), 896A/G TLR4 (rs4986790)
allergic rhinitis	45	23	22	Aged 19 - 65 years	Aged 19 - 65 years	CD4 ⁺ , CD4 ⁺ /25 ⁺ , CD4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 polymorphism 896A/G TLR4 (rs4986790)
atopic dermatitis	50	24	26	Aged 2 - 7 years	Aged 2 - 7 years	CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, IgA, IgM, IgG, IgE, C1C polymorphisms 2258G/A TLR2 (rs5743708), 896A/G TLR4 (rs4986790), 1196C/T TLR4 (rs4986791)
Patients with dyslipidemia	199	95	104	Aged 20 - 80 years	Aged 20 - 80 years	lipid metabolism, ceruloplasmin, polymorphism PPAR γ (Pro12Ala)
Patients with metabolic syndrome	1441	567	874	Aged 18 - 75 years	Aged 18 - 75 years	lipid metabolism, glucose, glycosylated hemoglobin, cytokines, polymorphisms PPAR γ (Pro12Ala), LPL (C \rightarrow T, intron 6); LPDR (C \rightarrow T, intron 15); MTHFR (Ala222Val)
Patients with combined pathology: metabolic syndrome, arterial hypertension	106	106	-	Aged 20 - 80 years	Aged 20 - 80 years	polymorphisms AGTR1 (A1166C); ACE (Alu Ins/Del I>D)
Patients with combined pathology: metabolic syndrome, coronary heart disease, bronchial asthma, endothelial dysfunction	102	69	33	Aged 40 - 75 years	Aged 40 - 75 years	lipid metabolism, glucose, cytokines, CRP, ICAM-1, VCAM-1 polymorphism PPAR γ (Pro12Ala), expression NF-kB1, NF-kB2
Study on the genes of structural proteins	159	72	87	Aged 20 - 95 years	Aged 20 - 95 years	polymorphisms MMP12 (A-82G); MMP20 (g.16250T>A); KLK (g.2142G>A); ELN (g28197 A>G)
Patients with connective tissue disorders	53	22	31	Aged 20 - 80 years	Aged 20 - 80 years	Screening panel: Ro/SS-A, La/SS-B, Scl-70, PM-Scl-100, Jo-1, PCNA, dsDNA, rib.P-Protein, CENP-B, AMA-M2, PR3, MPO, TPO, tireohlobulin

Using the data of this line of research, the prevalence of lipoprotein lipase (LPL) gene PvuII polymorphism and the connection with arterial hypertension development were investigated in Cherkasy population [12].

85 men aged 19-66 years were selected among the patients of Cherkasy 1st clinical hospital to study the polymorphism of LPL gene and divided into two groups. Control group (n=47) consisted of persons with normal blood pressure <140/90 mmHg, main group (n=38) included patients with the level of blood pressure \geq 140/90 mmHg or persons with an arterial hypertension in the anamnesis.

Distribution of LPL polymorphisms in a population control group and in a group of men with arterial hypertension in Cherkasy population was carried out for the first time. In the population of control group, genotype

frequencies were as follows: CC – 29.79% CT – 51.06%, and TT – 19.15%; allele frequencies were: C – 55.32% and T – 44.68%. In men with hypertension, frequency of genotypes and alleles of the LPL gene was not significantly different from the population control group: CC – 34.21%, CT – 47.37%, and TT – 18.42%; C – 57.9% and T – 44.1% for alleles.

Relationship between PvuII polymorphism in the LPL gene and the development of arterial hypertension has not been established. But the findings suggest that it would be appropriate to study this polymorphism in patients with clearly defined features of metabolic syndrome.

Within the determination of genetic risk factors for essential hypertension, we studied the distribution of polymorphisms of angiotensin II type 1 receptor AGTR1

(A1166C) [4]. In healthy persons (n=100), the frequencies of genotypes and alleles were: AA – 51%, AC – 34%, and CC – 15%; A – 68% and C – 32% for alleles. An overwhelming prevalence of C allele and CC genotype in healthy people in the Ukrainian population was assumed. Genotype frequencies in patients with essential hypertension (106 persons) were: AA – 22.85% and AC – 51.9%; and allele frequencies were: CC – 25.3 %; A – 48.7% and C – 51.3%. It was concluded that the development of essential hypertension is associated with the presence of C allele and its homozygous variant, the severity and complications of hypertension depend on the presence of this allele in the genotype. Ukrainian population has a specific distribution of polymorphisms of angiotensin II type 1 receptor with a predominance of C1166 allele and CC genotype that is a risk factor for essential hypertension.

In general, it should be noted that while collecting samples of this trend, the need arose for division into groups allowing to more thoroughly investigate patients and focus on a particular pathology. Thus, we managed to investigate some polymorphic variants of a number of genes: angiotensin II type 1 AGTR1 (A1166C), angiotensin-converting enzyme (ACE) (Alu Ins / Del I> D), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ (Pro12Ala), lipoprotein lipase (LPL) (C \rightarrow T, intron 6), lipoprotein receptor (LPDR) (C \rightarrow T, intron 15) [2, 3]. Material is currently being collected to continue genetic studies of the pathogenesis of metabolic syndrome (Table 1).

The importance of using database to develop effective advanced schemes of therapy should be noted. Thus, while studying pharmacogenetic characteristics of metformin action in patients with coronary artery disease on the background of metabolic syndrome and type 2 diabetes taking into account Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene, we defined its high therapeutic efficacy in patients with coronary artery disease on the background of type 2 diabetes who have the Pro/Pro genotype, significantly enabling individualized therapy [6].

Sampling for further study of the role genetic polymorphisms of structural proteins genes in inflammatory and degenerative processes of organs and tissues is an interesting and promising trend. Matrix metalloproteinases (MMP12 (A-82G); MMP20 (g.16250T> A)), kallikrein (KLK (g.2142G> A)), elastin (ELN (g28197 A> G)) are among them to name a few (Table 1) [10].

Thus, we determined polymorphism of kallikrein 4 (KLK4) gene in exon 4 g.2142 G>A (AF228497) in 72 patients with excessive tooth wear of I-III degree (30 men, 42 women, aged 20-62 years) [11].

It was shown that more serious signs of excessive tooth wear are observed namely in carriers of A allele of g.2142 G>A polymorphism of KLK4 gene. The obtained data confirm the relationship between the presence of polymorphic A allele of KLK4 gene with excessive tooth wear. These data allow us to consider this polymorphism as an additional prognostic indicator of excessive loss of dental hard tissues, and the detection of mutant A allele of KLK4 gene enables purposefully carrying out prevention and treatment of patients with excessive tooth wear.

Data on patients with autoimmune connective tissue diseases such as scleroderma, rheumatoid arthritis, vasculitis, who were examined in the Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics by using modern screening panels, providing sighting diagnosis of disease and significantly

improving the effectiveness of therapy, are of great practical significance (Table 1).

Work on creating genetic database continues. Such work is rather tedious, demanding, but the possibility of its practical use and value is difficult to estimate. We mentioned only some directions of data accumulation and some examples of their use in clinical practice. It should be noted, data on the prevalence of polymorphic variants of genes in the Ukrainian population are supplemented first of all step by step, theoretical foundation of medical genetics is being created, and certain levels of pathogenetic mechanisms are defining.

The creation of genetic databases will allow intensifying significantly medical studies. Systematization and registration of respondents forming groups of patients and population control group is going on using electronic documents that facilitates quick search, working with large data sets, adding additional inspection data, and research data in dynamics. The possibilities of using modern methods of statistical data processing, thorough analysis of frequency of distribution of polymorphic variants of genes in the general population and in selected groups of respondents also increase.

Standardization of methodical approaches to finding genetic markers of the most common diseases allows using modern certified reagents, test systems, and powerful scientific equipment. These factors significantly facilitate a scientific cooperation and interest in conducting joint researches on the collection and processing of data not only between research institutions, but also clinical genetics centers.

Creation of genetic monitoring system and identifying genetic markers of susceptibility to infectious agents and propensity to noninfectious origin diseases development will allow monitoring the level of morbidity in Ukraine by predicting the risk of developing certain pathological conditions, the nature and progression rate of pathological process, the formation of risk groups of possible morbidity since the childhood, and using effective prevention technologies. Development of targeted programs for early diagnosis and treatment taking into account a genetic predisposition will reduce the direct economic costs of medication, duration of outpatient and inpatient treatment by pharmacogenetic selection of main groups of drugs, decrease the incidence of complications and mortality level and will promote the introduction of individual strategies of preventive measures and improving health.

Ultimately, the prime importance of genetic databases is in the strategic direction of determining genetic markers of a number of common diseases that will be the basis for the conservation and sustainability of sanitary-epidemiological welfare of Ukraine. In our opinion, this achievement will bring a new level of basic and applied genetic researches in Ukraine and will deservedly contribute to increase the authority of our state among the scientific community.

References

1. Izmaylova O.V. Zv'yazok polimorfizmiv geniv TLR2 ta TLR4 zi schil'nistyu do okremich urogenital'них infekzij / O.V. Izmaylova, O.A. Shlikova, N.O. Bobrova, I.P. Kaydashev // Zitologiya i genetika. – 2011. – № 4. – S. 29 – 35.
2. Kaydashev I.P. Molekulyarno-biologicheskie aspekty gipertonicheskoy bolezni: rol' polimorfizma belkov renin-angiotenzinovoy sistemy i rezeptorov aktivirovannykh proliferaziyu peroksisom / I.P. Kaydashev, V.N. Zhdan, M.S. Rasin [i dr.] //Ukr. kardiolog. zh.-l. – 2010. - Dodatok 1.- S. 65-74.

3. Kaydashev I. P. Polimorfizm peroksisom polifera-tor-aktiviruyuschich receptorov: novyy aspekt patoge-neza ateroskleroza, essenzial'noy gipertenzii i sa-charnogo diabeta 2 tipa / I.P. Kaydashev, M.S. Rasin, A.M. Rasin // Ukraïns'kiy terapevtichniy zhurnal.-2004. - №4. - S. 57-61.
4. Kaydashev I.P. Polimorfizm receptora angiotenzina II 1-go tipa u bol'nykh essenzial'noy gipertenzii v ukrainskoy populyazii / I.P. Kaydashev, M.S. Rasin, L.G. Savchenko [i dr.] // Zitologiya i genetika. – 2005. – 39, № 5. – S. 51-55.
5. Kuzenko N.L. Svyaz' polimorfizmov genov Toll-podobnykh receptorov 2 i 4 s allergicheskimi zabole-vaniyami s povyshennymi urovnymi spetsificheskikh immunoglobulinov E / N.L. Kuzenko, O.V. Izmaylova, L.E. Vesnina, I.P. Kaydashev // Zitologiya i genetika. – 2012. - № 6. – S. 59-66.
6. Lavrenko A.V. Farmakogeneticheskie osobennosti deystviya metformina u pazientov, stradayuschikh ishemi-cheskoy bolezniyu serdza na fone metabolicheskogo sindroma i sacharnogo diabeta 2 tipa, s uchetom poli-morfizma gena PPAR-γ2 /A.V.
1. Lavrenko, O.A. Shlyko-va, L.A. Kuzenko [i dr.] // Terapevticheskiiy arkhiv. – 2012. - № 9. – S.35 – 40.
7. Levchenko L.Yu. Asoziatsiya polimorfizmu 896A/G genu TLR4 z perebigom atopichnogo dermatitu u ditey zi schil'nisty do gostrich respiratornykh virusnykh infektsiy / L.Yu. Levchenko, O.V. Izmaylova, O.A. Shlikova, I.P. Kaydashev // Problemi ekologii ta medizini.- 2012.- № 3-4.- S. 9-12.
8. Levchenko L.Yu. Polimorfizm 896A/G gena TLR4, a ne 1196C/T gena TLR4 ta 2258G/A gena TLR2 viznachae tyazhkiy ta uskladneniy perebig atopichnogo dermatitu u ditey / L.Yu. Levchenko, O.V. Izmaylova, O.A. Shlikova, I.P. Kaydashev //Zitologiya i genetika. – 2013. – T. 47, № 3. – S. 46-53.
9. Sakevich V.D. Poshirenist' polimorfnykh aleley 2258G/A gena TLR2 ta ich zvyazok z okremimi imunologich-nimi pokaznikami sered khvorich na alergichniy rinit / V.D. Sakevich, O.A. Shlikova, N.O. Bobrova, I.P. Kayda-shev //Astma ta alergiya. – 2013. – № 3. – S. 51-55.
10. Skripnik V.M. Polimorfizm genu elastinu g28197 A>G viznachae schil'nist' do utvorenniya patologichnykh rubziv / V.M. Skripnik, D.S. Avetikov, O.A. Shlikova, I.P.Kaydashev //Problemi ekologii ta medizini. – 2012. - T.16, № 5-6.- S. 61-64.
11. Tkachenko I.M. Vznachennya polimorfizmu geniv kalekrii-nu-4 ta matriksnoi metaloproteinazi-20 u pazientiv z pidvischenoyu steristyu zubiv /I.M. Tkachenko, O.A. Shli-kova, I.P. Kaydashev // Problemi ekologii ta medizini. – 2012. - T.16, № 5-6.- S. 65-68.
12. Shlikova O.A. Rol' polimorfizmu PVU II genu lipopro-teinlipazi u patogenezi arterial'noi gipertenzii / O.A. Shlikova // Problemi ekologii ta medizini. - 2011. - T. 15, № 1-2.- S. 22-25.

Матеріал надійшов до редакції 24.04.2014 р.

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Белоглазов В.А., Попенко Ю.О.

УДК: 616-092:612.017.1:616-002:616.15-07

ДИСБАЛАНС МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СРЕДНЕТЯЖЕЛОЙ И ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ*

Белоглазов В.А., Попенко Ю.О.

ГУ «Крымский Государственный Медицинский Университет имени С.И. Георгиевского», г. Симферополь

Відомо, що мукозальний імунітет це перша лінія захисту організму від чужорідних антигенів. Метою нашого дослідження було визначення стану мукозального імунітету у хворих середньо тяжкою і тяжкою персистуючою бронхіальною астмою, на фоні застосування базисної терапії. Було обстежено 109 пацієнтів (жінок- 63/57, 8%; чоловіків - 46/42, 2%), що знаходяться на амбулаторному лікуванні. Всі хворі були поділені на дві групи: 1 група - хворі з середньо тяжкою бронхіальною астмою 68 чол. (62,4 %), згідно з опитувальником ACQ середній бал - $3,00 \pm 0,14$, ОФВ1 - $67,01 \pm 2,10$ %; 2 група - хворі з тяжкою бронхіальною астмою 41 чол. (37,6 %), згідно з опитувальником ACQ середній бал - $4,06 \pm 0,12$, ОФВ1 - $34,45 \pm 1,50$ %. У результаті дослідження було виявлено, що в 1 та 2 групах достовірно зростали рівні sIgA і анти- ET - sIgA у порівнянні з нормою ($p < 0,01$), між групових відмінностей за даними показниками не визначалося. Виявлені зміни мукозального гуморального імунітету відображають виражену антигенну стимуляцію імунної системи слизових оболонок на тлі функціональної неспроможності епітеліального бар'єру, що і дає змогу реалізувати феномен ендотоксинової агресії.

Ключові слова: імунітет, мукозальний антиендотоксинний, бронхіальна астма, секреторний Ig A.

Мукозальный иммунитет это часть иммунной системы, представляющая собой слизистую оболочку, которая направлена на контакт с антигенами из внешней среды [5]. Данный иммунитет состоит из лимфоидной ткани, которая ассоциирована с слизистой оболочкой (MALT or mucosa-associated lymphoid tissue) и может быть разделена на несколько компонентов: «ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань» (GALT), «ассоциированная с бронхами лимфоидная ткань» (BALT), «ассоциированная с носом лимфоидная ткань» (NALT), молочных и слюнных желез [5,4].

Антигенный материал доставляется в межфолликулярную Т-зависимую зону GALT. Здесь Th-клетки выделяют целый пакет цитокинов, среди них наиболее изучены эффекты трансформирующего фактора роста-β (transforming growth factor-β; TGF-β), который перекладывает В-клетки на продукцию IgA, а не, например, IgG или IgE. IgA-коммитированные (то есть взявшие на себя обязательство производить именно IgA) лимфоциты уходят из фолликула в мезентериальные лимфатические узлы, где превращаются в плазмбласты [2].

Известно, что sIgA обеспечивает местную защиту целостности и функционирования слизистой оболочки благодаря тому, что препятствует креплению микроорганизмов к этим тканям и их проникновению в эпителиальную выстилку. Также считается, что sIgA может непосредственно в клетках эпителия связывать патогенные микроорганизмы, а также связывать антигены в собственной пластинке слизистой оболочки и выводить их через слой эпителия на поверхность

слизистой оболочки, освобождая, таким образом, организм от локально формируемых иммунных комплексов и снижая вероятность их поступления в системное кровообращение [7,8].

Материалы и методы исследования

Целью нашего исследования было определение состояния мукозального иммунитета у больных среднетяжелой и тяжелой персистирующей бронхиальной астмой, на фоне применения базисной терапии.

Поставленная задача для достижения цели - изучения состояния местного общего (секреторный Ig A) и антиэндотоксинного (секреторный ант-ЭТ Ig A) иммунитета у данной категории больных. Было обследовано 109 пациентов (женщин- 63/57,8%; мужчин - 46/42,2%), находящихся на амбулаторном лечении основного заболевания в соответствии с приказом МОЗ Украины от 19.03.2007 №128, которые получали сальметерол 50-100 мкг/сут и флутиказон пропионат 500-1000 мкг/сут. Анализ уровня контроля у больных бронхиальной астмой осуществляли с помощью опросника ACQ Elizabeth Juniper (1999 г). ACQ состоит из 7 вопросов, которые больной заполняет, 5 из которых касаются выраженности наиболее важных симптомов (ночные симптомы/пробуждения, дневные симптомы астмы, ограничение ежедневной активности, одышки, хрипов), использования препаратов неотложной помощи и ОФВ1. Оценка выраженности симптомов происходит по визуально-аналоговой балльной шкале от 0 баллов (симптом отсутствует) до

* Цитування при атестації кадрів: Белоглазов В.А., Попенко Ю.О. Дисбаланс мукозального иммунитета при среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астме // Проблемы экологии и медицины. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 13 –15.

6 баллов – максимально выраженный симптом. Верхней границей контролируемой астмы считали средний балл – 0,75, а средний балл от 0,75 до 1,5 – частично контролируемая астма, неконтролируемая астма – средний бал выше 1,5.

Все больные были разделены на две группы: 1 группа - больные с средне тяжелой бронхиальной астмой 68 чел. (62,4%), согласно опроснику ACQ средний балл – 3,00±0,14, ОФВ1 – 67,01±2,10%; 2 группа - больные с тяжелой бронхиальной астмой 41 чел. (37,6%), согласно опроснику ACQ средний балл – 4,06±0,12, ОФВ1 – 34,45±1,05%.

Секреторный антиэндоксинный иммуноглобулин А (анти-ЛПС-sIgA) и общий иммуноглобулин А в индуцированной мокроте определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа

(ТИФА) по протоколам, разработанным в лаборатории клинической иммунологии ЦНИЛ Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского. Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ТОВ «Альфа», г.Донецк.

Результаты и их обсуждения

Состояние мукозального иммунитета у больных БА оценивалось по уровню анти-ЭТ-sIgA и общего IgA в индуцированной мокроте данной категории больных.

Уровень общего секреторного IgA и анти-ЭТ-sIgA у больных БА представлен в таблице.

Таблица
Уровень общего секреторного IgA и анти-ЭТ-sIgA в индуцированной мокроте у больных БА

Группа	К-во исследований	среднее значение, Ме (I –III квартиль) мг/л Статистический показатель (p)	Среднее значение, Ме (I –III квартиль) ед.опт.пл
			Статистический показатель (p)
Норма	23	31,10 (15,00-41,80)	0,037 (0,030-0,053)
1 группа	68	66,75 (36,40-106,50) P<0,01	0,193 (0,141-0,297) P<0,01
2 группа	41	66,60 (37,75-109,55) P<0,01 P ₁ >0,05	0,195 (0,152-0,274) P<0,01 P ₁ >0,05

Примечание: P – достоверность различий с нормой

P₁ – достоверность различий между группами 1 и 2

Из представленной таблицы следует, что уровень общего sIgA достоверно повышался в исследуемых группах по сравнению с нормой (p<0,01), межгрупповых различий по данному показателю не определялось. С другой стороны, наблюдалось повышение уровня анти-ЭТ-sIgA в 1 и 2 группах больных БА, на уровне значимости p<0,01, по сравнению с нормой. При исследовании между 1 и 2 группами, данного показателя, различий не было выявлено.

Таким образом, при среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астме показатели, характеризующие мукозальный гуморальный общий и антиэндоксинный иммунитет повышены, в то время как по данным литературы при легком течении БА на фоне sIgA не выходящего за пределы диапазона нормы, было обнаружено снижение анти-ЭТ-sIgA [3]. Высокий уровень sIgA рассматривается как отражение интенсивного антигенного стимула на слизистую оболочку и высокого уровня гуморального антительного ответа. Так повышенный уровень общего sIgA был выявлен у больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК), а у больных с болезнью Крона (БК) – повышенный уровень анти-ЭТ-sIgA [6]. Является ли компенсаторная консолидация мукозального барьера физиологически адекватной? Судя по тому, что и при НЯК и при БК регистрируется повышение транслокации ЭТ во внутренние среды организма, данная консолидация мукозального барьера функционально не способна предотвратить эндотоксигенную агрессию. Несостоятельность мукозального антиэндоксинного иммунитета может быть связана как с самой молекулой анти-ЭТ-sIgA (низкая аффинность к ЭТ), так и с нарушением слизистого барьера на уровне межэпителиальных соединений, в результате чего резко возрастает кишечная проницаемость по отношению к различным ксенобиотикам, включая и ЭТ. Кроме этого, антиэндоксинная агрессия при тяжелой астме,

может быть связана с усилением шунтового кровотока (минуя печень через портокавальные анастомозы) за счет активации симпатической нервной системы и применения значительных доз β₂ – симпатомиметиков [1]. Так или иначе, как при тяжелой БА, так и при НЯК и БК активация мукозального гуморального иммунитета на слизистых оболочках требует назначения мощной противовоспалительной и супрессивной (с позиции влияния на иммунный ответ) терапии модулирующей действие провоспалительных медиаторов и факторов, среди которых потенциально важную роль занимает и ЭТ.

Выводы

1. В группах больных с тяжелой и среднетяжелой персистирующей БА уровень секреторного анти-ЭТ-IgA в индуцированной мокроте в 5,3 раза (p<0,01) выше величины данного показателя в группе здоровых доноров. Межгрупповых различий данного показателя не выявлено.

2. У больных БА в 1 и 2 клинических группах уровень общего секреторного Ig A в 2,2 раза (p<0,01) выше величины данного показателя в группе здоровых доноров.

3. Выявленные сдвиги мукозального гуморального иммунитета отражают выраженную антигенную стимуляцию иммунной системы слизистых оболочек на фоне функциональной несостоятельности эпителиального барьера, что и реализует феномен эндотоксигенной агрессии.

Литература:

1. Кишечный эндотоксин как универсальный фактор адаптации и патогенеза общего адаптационного синдрома./ И. А. Аниховская, О. Н. Опарина, М. М. Яковлева, М. Ю. Яковлев// Физиология человека.- 2006.- Т. 32 №2.- С. 87-91.

2. Бизунков А.В. Можно ли управлять мукозальным иммунитетом в дыхательных путях//Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. - 2013.-№1.-С. 17-26.
3. Знаменская Л.К. Антиэндоксинный иммунитет у больных бронхиальной астмой при специфической иммунотерапии: Автореферат дис. кан.мед.наук / Крымский Государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского.- Симферополь 2011.- 15 с.
4. Мукозальная иммунная система// М.Я. Плужников, М.Я. Левин, Н.В. Панова, П.Г. Назаров, Г.В. Лавренова/ Врачебные ведомости.- 2005.-№ 4(34).- С. 41-43.
5. Mucosal immune system: A brief review/ N. Aguilera Montilla, M. Pérez Blas, M. López Santalla, J.M. Martín Villa// Immunología.-2004.-Vol.23.- P. 207-216.
6. Carol G. Mucosal and systemic antibody responses to the lipopolysaccharide of Escherichia coli O157 in health and disease / G.Carol, Kristen McCallum, Lan R. Poxton// Med. Microbiol. – 2001.- Vol.50.- P. 345-354.
7. Mucosal Immunology.- A.Khoruts.- Minnesota, 2008.- 32 p.
8. Michel O. Role of lipopolysaccharide (LPS) in asthma and other pulmonary conditions // J. Endotoxin Res. – 2003.- Vol. 9.-P. 293-300.

ENGLISH VERSION: IMBALANCE OF MUCOSAL IMMUNITY AT MODERATE AND SEVERE BRONCHIAL ASTHMA*

Beloglazov V.A., Popenko Yu.O.

State Institution "Crimean State Medical University Named After S.I. Georgievsky"

It is known that mucosal immunity is the first line of defense against foreign antigens. The objective of our study was to determine the state of mucosal immunity in patients with moderate and severe persistent bronchial asthma during background therapy. We examined 109 patients (63/57.8% of females; 46/42.2% of males) receiving outpatient treatment. All patients were divided into two groups: Group 1 – patients with moderate bronchial asthma (68 subjects with average score of $3,0 \pm 0,14$ according to ACQ, $FEV_1 - 67,01 \pm 2,10\%$; Group 2 – patients with severe bronchial asthma (41 subject with average score of $4,06 \pm 0,12$ according to ACQ, $FEV_1 - 34,45 \pm 1,50\%$). The levels of total sIgA and anti-ET-sIgA were significantly increased in the study groups as compared to the normal value ($p < 0.01$); no differences in this parameter among the groups were detected. Revealed changes of the mucosal humoral immunity reflect expressed antigenic stimulation of the mucosal immune system at the background of functional incompetence of the epithelial barrier which implements the phenomenon of endotoxin aggression

Key words: immunity, mucosal anti-endotoxin, bronchial asthma, secretory Ig A.

Mucosal immunity is a part of immune system represented by a mucous membrane which is aimed at the contact with antigens from the environment [1]. This kind of immunity consists of lymphoid tissue which is associated with mucosa (MALT or mucosa-associated lymphoid tissue) and may be divided into several components: gut-associated lymphoid tissue (GALT), bronchus-associated lymphoid tissue (BALT), nasal-associated lymphoid tissue (NALT), lymphoid tissue of mammary and salivary glands [1, 2].

Antigenic material is delivered to the interfollicular T cell-dependent zone of GALT. Here, Th-cells secrete the whole package of cytokines: effects of transforming growth factor- β (TGF- β), which switches B-cells to produce IgA, for example instead of IgG or IgE, are the most studied. IgA-committed (i.e. obliged to produce exactly IgA) lymphocytes move away from the follicle into the mesenteric lymph nodes where they transform into plasmablasts [5].

It is known that sIgA provides local protection of integrity and functioning of the mucosa by preventing attachment of microorganisms to these tissues and their penetration into the epithelial lining. It is also believed that sIgA can bind pathogenic microorganisms directly into the epithelial cells and also can bind antigens in the lamina propria of mucosa, as well as move them through the epithelial layer to the mucosal surface, thus releasing the organism from locally formed immune complexes and reducing the likelihood of their entry into systemic circulation [3,4].

Materials and methods of the study

Objective of our study was to determine the state of mucosal immunity in patients with moderate and severe persistent bronchial asthma during background therapy.

In order to achieve the objective, assigned task was to study the state of local, general (secretory Ig A) and anti-endotoxin (secretory anti-ET IgA) immunity in this category of patients. We examined 109 patients (63/57.8% of females; 46/42.2% of males) receiving outpatient treatment of the underlying disease in accordance with the order of the Ministry of Health of Ukraine dated March 19, 2007 No. 128, who received salmeterol at a dose of 50-100 μ g/day and fluticasone propionate at a dose of 500-1000 μ g/day. The level of control over the patients with bronchial asthma was analyzed using Asthma Control Questionnaire (ACQ) designed by Elizabeth Juniper (1999). ACQ consists of 7 questions filled out by the patient: 5 of them relate to the severity of the most important symptoms (nocturnal/awakening symptoms, daytime asthma symptoms, limitation of daily activity, shortness of breath, wheezing), the use of emergency drugs and FEV1. Severity of symptoms was evaluated using a visual analogue scale with score ranging from 0 points (no symptom) to 6 points (maximally expressed symptom). The average score of 0.75 was considered the upper limit of controlled asthma; the average score ranging from 0.75 to 1.5 was considered as partially controlled and 1.5 or higher average score – as uncontrolled asthma.

All patients were divided into two groups: Group 1 – patients with moderate bronchial asthma (68 subjects (62,4%), with average score of $3,00 \pm 0,14$ according to ACQ, $FEV_1 - 67,01 \pm 2,10\%$; Group 2 – patients with severe bronchial asthma (41 subject (37,6%), with average score of $4,06 \pm 0,12$ according to ACQ, $FEV_1 - 34,45 \pm 1,50\%$).

Secretory anti-endotoxin immunoglobulin A (anti-LPS-sIgA) and total immunoglobulin A in induced sputum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the protocols developed in the Clinical Immunology Lab of the Central Research Laboratory of Crimean State Medical University named after S.I. Georgievsky. All

* To cite this English version: Beloglazov V.A., Popenko Yu.O. Imbalance of mucosal immunity at moderate and severe bronchial asthma / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 15 -16.

obtained results were statistically processed using nonparametric criteria via the program «MedStat» (serial number MS0011) DNPP TOV «Alpha», Donetsk.

Results and their discussion

The state of mucosal immunity in BA patients was assessed by the level of anti-ET-sIgA and total IgA in the induced sputum of this category of patients.

The level of total secretory IgA and anti-ET-sIgA in BA patients is presented in the table.

Table
The level of total secretory IgA and anti-ET-sIgA in the induced sputum of BA patients<0>

Group	Number of studies	Mean value, Me (quartile I-III) mg/L Statistic parameter (p)	Mean value, Me (quartile I-III) optical density unit Statistic parameter (p)
Normal value	23	31.10 (15.00-41.8)	0.037 (0.030-0.053)
Group 1<0>	68	66.75 (36.4-106.5) <0.01	0.193 (0.141-0.297) P<0.01
Group 2	41	66.60 (37.75-109.55) P<0.01 P1 >0.05	0.195 (0.152-0.274) P<0.01 P1 >0.05

Note: P – significance of differences from the normal value

P1 – significance of differences between Groups 1 and 2 <0>

The table above demonstrates that the level of total sIgA was significantly increased in the study groups as compared to the normal value ($p<0.01$); no differences in this parameter among the groups were detected. On the other hand, the level of anti-ET-sIgA in Groups 1 and 2 of BA patients was elevated ($p<0.01$) as compared to the normal value. No differences in this parameter were revealed during the study between Groups 1 and 2.<0>

Thus, parameters characterizing mucosal humoral general and anti-endotoxin immunity were increased in moderate and severe bronchial asthma; meanwhile, the decrease of anti-ET-sIgA was detected according to the literature data in mild BA with sIgA not exceeding the normal range [6]. High level of sIgA is considered as a reflection of intense antigenic stimulus of mucosa and a high level of humoral antibody response. Thus, elevated level of total sIgA was detected in patients with non-specific ulcerative colitis (NUC), and elevated level of anti-ET-sIgA was observed in patients with Crohn's disease (CD) [7]. Is compensatory consolidation of mucosal barrier physiologically adequate? Judging by the fact that both in NUC and CD elevated translocation of ET into the internal environment of the body are registered, this consolidation of mucosal barrier functionally cannot prevent endotoxin aggression. Incompetence of mucosal anti-endotoxin immunity may be associated both with the molecule of anti-ET-sIgA itself (low affinity to ET) and with violation of the mucosal barrier at the level of interepithelial junctions, resulting in dramatically increased intestinal permeability to various xenobiotics, including ET. Moreover, anti-endotoxin aggression in severe asthma may be associated with increased shunt blood flow (bypassing the liver through the portocaval anastomoses) due to activation of the sympathetic nervous system and the use of significant doses of β_2 -sympathomimetic drugs [8]. Anyway, both in severe BA, in NUC and CD, activation of mucosal humoral immunity on mucous membranes requires prescription of a powerful anti-inflammatory and suppressive (from a perspective of influence on the immune response) therapy modulating effects of

proinflammatory mediators and factors, among which ET plays a potentially important role.

1. In groups of patients with severe and moderate persistent BA the level of secretory anti-ET-IgA in the induced sputum is 5.3 times ($p<0.01$) higher than the value of this parameter in the group of healthy donors. No intergroup differences of this parameter were revealed.<0>

2. In BA patients from clinical groups 1 and 2 the level of secretory IgA is 2.2 times ($p<0.01$) higher than the value of this parameter in the group of healthy donors.

3. Revealed changes of the mucosal humoral immunity reflect expressed antigenic stimulation of the mucosal immune system at the background of functional incompetence of the epithelial barrier which implements the phenomenon of endotoxin aggression.

References:

1. Mucosal immune system: A brief review/ N. Aguilera Montilla, M. Pérez Blas, M. López Santalla, J.M. Martín Villa// *Inmunología*.-2004.-Vol.23.- P. 207-216.
2. Mucosal immune system// M.Ya. Pluzhnikov, M.Ya. Levin, N.V. Panova, P.G. Nazarov, G.V. Lavrenova/Vrachebnie Vedomosti.-2005.-No.4(34).-pp. 41-43.
3. Mucosal Immunology.- A.Khoruts.- Minnesota, 2008.- 32 p.
4. Michel O. Role of lipopolysaccharide (LPS) in asthma and other pulmonary conditions // *J. Endotoxin Res.* – 2003.-Vol. 9.-P. 293-300.
5. Bizunkov A.V. Whether it is possible to control mucosal immunity in the airways//*Clinical immunology. Allergology. Infectology*.-2013.-No.1.-pp. 17-26.
6. Znamenskaya L.K. Anti-endotoxin immunity in patients with bronchial asthma during specific immune therapy: Thesis of Candidate of Medical Sciences / Crimean State Medical University Named After S.I. Georgievsky.-Simferopol 2011.- 15 p.
7. Carol G. Mucosal and systemic antibody responses to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157 in health and disease / G.Carol, Kristen McCallum, Lan R. Poxton// *Med. Microbiol.* – 2001.- Vol.50.- P. 345-354.
8. Intestinal endotoxin as multifunctional factor of adaptation and pathogenesis of general adaptation syndrome./ I.A. Anikhovskaya, O.N. Oparina, M.M. Yakovleva, M.Yu. Yakovlev// *Human Physiology*.-2006.-V.32 No.2.- pp. 87-91.

Матеріал надійшов до редакції 05.03.2014

© Перцева Т.О., Кіреєва Т.В., Штепа О.О.
УДК 616.24-002-66-02-032

ЕФЕКТИВНІСТЬ ТА НЕОБХІДНІСТЬ ПРОВЕДЕННЯ ЕТІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ У ХВОРИХ НА ІНФЕКЦІЙНІ ЗАХВОРЮВАННЯ НИЖНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ*

Перцева Т.О., Кіреєва Т.В., Штепа О.О.

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», м. Дніпропетровськ

*По нашим данным, эффективность проведения микробиологической диагностики у лиц с инфекциями нижних дыхательных путей с последующей установкой этиологического диагноза составила 46%. При этом у больных с внебольничной пневмонией (ВП) этиологический агент был выявлен в 35% случаев, а у больных с инфекционным обострением хронического обструктивного заболевания легких (ИО ХОЗЛ) – в 58% случаев. К наиболее часто выявляемым микроорганизмам у больных с ВП и ИО ХОЗЛ относились *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *H. parainfluenzae* 83,4% и 52,3% соответственно. У лиц с ИО ХОЗЛ значительная часть приходилась на *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (28,5%) и *M. catarrhalis* (14,4%). Резистентность штаммов *S. pneumoniae* к пенициллинам составила 22%, *H. parainfluenzae* и *K. pneumoniae* к аминопенициллинам – 33% и 67% соответственно, *S. aureus* к аминогликозидам и фторхинолонам – 33%. Уровень мультирезистентности составил 3%. Несмотря на достаточно низкий уровень эффективности и учитывая разнообразие выявляемых возбудителей, проведение этиологической диагностики дает возможность скорректировать и улучшить эффективность эмпирической антибактериальной терапии с учетом уровня резистентности выявленного возбудителя.*

Ключевые слова: инфекционные агенты, микробиологическая диагностика, внебольничная пневмония, хронические обструктивные заболевания легких, резистентность к антибактериальным препаратам.

В лікуванні інфекцій нижніх дихальних шляхів (ІНДШ) ключова роль відводиться антибактеріальній терапії (АБТ), призначення якої в більшості випадків носить емпіричний характер, через потребу розпочати лікування в найкоротші терміни і базується на даних світових досліджень [9, 13, 16].

Необхідність проведення етіологічної діагностики обумовлюється потребою корегування АБТ у конкретного пацієнта, при відсутності відповіді на першочергово призначену емпіричну АБТ, що може бути пов'язано з нетиповим легеневим патогеном, або зі зміною профілю резистентності основних респіраторних збудників до антибактеріальних препаратів (АБП). Встановлення етіологічного діагнозу дає можливість, за потреби, переходу з АБП широкого спектру (або комбінованої терапії) на препарат вузького спектру (до монотерапії), сприяючи скороченню витрат, зменшенню ризику розвитку небажаної реакції на лікарські препарати та селекції антибактеріальної резистентності [2, 4, 9].

У пацієнтів з негоспітальною пневмонією (НП), згідно затверджених стандартів, лікування яких проводиться в амбулаторних умовах, не рекомендовано проведення мікробіологічного дослідження мокротиння. Виконання даного виду дослідження проводиться за умови неефективності стартової емпіричної АБТ або за частих рецидивів респіраторних епізодів, враховуючи невеликий проміжок часу, що може свідчити про наявність патогена, життєдіяльність якого не була ефективно припинена за використання попередньо призначеної АБТ [10].

Тоді як у хворих на інфекційне загострення ХОЗЛ проведення мікробіологічного дослідження мокротиння є важливим, як в період загострення процесу з метою визначення етіологічного збудника, так і в стадії

ремісії з метою виявлення мікроорганізмів, носійство яких є характерним для хворого протягом хронічного перебігу захворювання [7, 11]. Через те, що проведення повної ерадикації цих мікроорганізмів з дихальних шляхів не є можливим, володіння даною інформацією дає можливість спрогнозувати, підвищення вірулентності якого збудника може відігравати етіологічну значимість у випадку загострення процесу. Також важливо зважати на можливість отримання позитивного результату пов'язаного з контамінацією патологічного матеріалу мікроорганізмами верхніх дихальних шляхів [8, 9].

В обох випадках слід враховувати величину концентрації мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі згідно з затверджених методик, чим вона вища, тим більш імовірна етіологічна значимість ідентифікованого мікроорганізму у запальному процесі при конкретній нозології.

Проведення мікробіологічної діагностики у хворих, госпіталізованих до стаціонарів, є необхідною умовою для встановлення етіологічного діагнозу і обумовлюється більш тяжким перебігом процесу в порівнянні з амбулаторними пацієнтами та наявністю епідеміологічних факторів ризику [2, 10]. Однак навіть за умов госпіталізації, враховуючи розширені можливості, щодо лабораторної діагностики, виявити етіологічно вагомого збудника у хворих на НП та інфекційне загострення ХОЗЛ, при проведенні мікробіологічного дослідження, вдається лише в 30 – 50% випадків [2, 9, 10].

Отриманий негативний результат в процесі проведення дослідження може бути пов'язаний з багатьма факторами, до яких відносяться: недостатня інформованість пацієнтів, щодо правильного забору клінічного матеріалу, суттєва територіальна роз'єднаність мікробіологічних лабораторій та лікувальних закладів,

* Цитування при атестації кадрів: Т.О. Перцева, Т.В. Кіреєва, О.О. Штепа. Ефективність та необхідність проведення етіологічної діагностики у хворих на інфекційні захворювання нижніх дихальних шляхів // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 17–21.

що може впливати на час та якість умов зберігання та транспортування зразків патологічного матеріалу [4].

З урахуванням вищенаведених даних, метою нашої роботи була оцінка результативності проведення мікробіологічного дослідження патологічного матеріалу отриманого від хворих на НП та інфекційне загострення ХОЗЛ, з подальшим визначенням структури етіологічно вагомих збудників та рівня їх резистентності до основних АБП, шляхом проведення досліджень на базі клінічних лікарень міста Дніпропетровська.

Матеріали та методи дослідження

У дослідження включалися хворі з діагнозами НП та інфекційного загострення ХОЗЛ, які перебували на стаціонарному лікуванні лікарень міста Дніпропетровська. Діагноз пневмонії був підтверджений рентгенографічно і встановлений згідно з Наказом № 128 МОЗ України від 19.03.2007 р. Діагноз ХОЗЛ встановлювався відповідно до критеріїв GOLD (2008) та згідно з Наказом № 128 МОЗ України від 19.03.2007 р. У дослідження не включалися хворі з тривалістю антибактеріальної терапії більше 24 годин.

Усім хворим проводились загальноклінічні методи обстеження, рентгенографія органів грудної клітини у двох проекціях та оцінювалась ФЗД за допомогою спірографа MasterLab (Viasis, Німеччина).

Мікробіологічне дослідження проводилося на базі лабораторії діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» міста Дніпропетровська.

В якості досліджуваного матеріалу при мікробіологічній діагностиці використовувалися мокротиння. Ідентифікація мікроорганізмів проводилася звичайними культуральними методами [4]. Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів проводилося диско-дифузійним методом та шляхом визначення мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК) антибактеріального препарату. Тестування диска чутливості проводили відповідно до CLSI (раніше NCCLS guidelines) [18], як і всі методи визначення чутливості.

Забір матеріалу проводився згідно затверджених методик [4]. Доставка матеріалу в лабораторію здійснюва-

лася протягом 1,5-2 годин з моменту забору з дотриманням загальноприйнятих правил транспортування.

Статистична обробка даних проводилася за допомогою «Microsoft Office Excel» та «Statistica 6» із використанням непараметричних методів статистики.

Результати та їх обговорення

Дослідження було розділено на два етапи. На першому етапі проводилося визначення етіологічно вагомих мікроорганізмів у хворих на НП та інфекційне загострення ХОЗЛ, на другому – аналіз резистентності виявлених збудників до АБП.

В процесі проведення дослідження було оглянуто 102 особи. Серед них 23 (22,6%) особи хворі на НП не мали продуктивного кашлю, навіть при проведенні стимулювання продукції мокротиння і не мали показань до проведення фібробронхоскопії, що дало б нам можливість отримати патологічний матеріал безпосередньо з дихальних шляхів. Цих пацієнтів було виключено з подальшого дослідження. Дані, щодо дизайну дослідження представлені на рисунку 1.

На першому етапі у дослідження було включено 79 осіб (77,4%), що мали продуктивний кашель. Їх було розділено на дві групи відповідно до встановленого діагнозу. До першої групи увійшло 48 осіб, яким було встановлено діагноз НП, середній вік яких склав 58,6 (48,0-62,0) років, серед них 27 чоловіків та 21 жінка, що у відсотковому співвідношенні склало 56% на 44% відповідно. Серед них 12 (25%) хворих надійшли до стаціонару на першу та другу добу від початку захворювання, основна частина хворих – 27 (56%) були госпіталізовані на третю та четверту добу, 9 (19%) хворих були госпіталізовані на п'яту і шосту добу і більший проміжок часу.

До другої групи увійшла 31 особа, яким було встановлено діагноз ХОЗЛ у стадії інфекційного загострення середній вік яких склав 64,7 (53,0-67,0) років, серед них 19 чоловіків та 12 жінок, що у відсотковому співвідношенні склало 61% на 39% відповідно. При цьому 16 (52%) осіб були госпіталізовані на третю - шосту добу від початку захворювання, у всіх інших випадках 15 (48%) – проміжок часу склав більше одного тижня.

I ЕТАП ДОСЛІДЖЕННЯ: виділення патологічного матеріалу з подальшим проведенням мікробіологічної діагностики



II ЕТАП ДОСЛІДЖЕННЯ: дослідження резистентності ідентифікованих респіраторних патогенів

36 (46%) осіб з ідентифікацією етіологічно вагомого мікроорганізма

Рис. 1 Дизайн дослідження

Серед двох груп при проведенні мікробіологічного дослідження патологічного матеріалу нижніх дихальних шляхів, а саме мокротиння, вдалося виявити інфекційних агентів лише у 46% випадків.

Поєднання двох і більше етіологічно вагомих мікроорганізмів зустрічалося у 7% випадків виявлення збудників серед двох груп. Так у хворого на НП було виявлено асоціацію *H. influenzae* та *M. catarrhalis*, а у

хворого на інфекційне загострення ХОЗЛ поєднання трьох основних респіраторних патогенів: *H. influenzae*, *S. pneumoniae* та *M. catarrhalis*. Саме асоціація декількох збудників може створювати умови для збільшення тривалості лікування та затяжного характеру протікання запального процесу легень, через особливості резистентності кожного мікроорганізму окремо.

Стосовно розподілення мікроорганізмів у кожній групі окремо, то ці дані представлені в таблиці 1.

Слід також зазначити, що у першій групі виявити етіологічно вагомого збудника вдалося в 17 (35%) випадках, при цьому об'єм ураженої легеневої тканини у цих хворих був більший ніж у випадках негативного результату дослідження, тоді як у другій етіологічний збудник був виявлений в 19 (58%) випадках.

Таблиця 1
Розподілення інфекційних агентів двох груп (абс (%))

Інфекційні агенти	Кількість виділених мікроорганізмів	
	НП	ХОЗЛ
<i>H. influenzae</i>	7 (39%)	4 (19%)
<i>S. pneumoniae</i>	4 (22,2%)	5 (23,8%)
<i>H. parainfluenzae</i>	4 (22,2%)	2 (9,5%)
<i>M. catarrhalis</i>	1 (5,5%)	3 (14,4%)
<i>S. aureus</i>	2 (11,1%)	1 (4,8%)
<i>K. pneumoniae</i>	-	4 (19%)
<i>P. aeruginosa</i>	-	2 (9,5%)

Аналізуючи отримані дані, слід зазначити, що у хворих першої групи найбільша частка ідентифікацій приходилася на *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *H. parainfluenzae* 15 (83,4%), тоді як у осіб другої групи поряд з основними респіраторними збудниками *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *H. parainfluenzae* 11 (52,3%), визначалася значна дольова частка ідентифікацій таких грамнегативних мікроорганізмів, як *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* 6 (28,5%), що характеризуються тяжким та тривалим перебігом захворювання та складнощами у забезпеченні ефективної АБТ. У хворих другої групи частіше зустрічалися штами *M. catarrhalis* ніж у хворих першої групи.

Штами *H. influenzae* та *S. pneumoniae* відносилися до основних респіраторних патогенів в обох групах, на рівень ідентифікації цих мікроорганізмів може впливати швидка загибель цих мікроорганізмів, через їх «примхливість», ще до початку дослідження. Так *H. influenzae* потребує наявності в поживному середовищі X (гомін) та V (коензим ферменту дегідрازی) факторів крові, поживні середовища *S. pneumoniae* повинні бути збагачені дефібринованою кров'ю тварин в 5%-й концентрації, а також вони потребують інкубації в атмосфері з підвищеним рівнем CO₂ [4, 8].

Також слід зазначити, що в 7 (64%) випадках серед 11, де у хворих на НП були ідентифіковані *H. influenzae* та *H. parainfluenzae*, в анамнезі відзначалася наявність гострого респіраторного епізоду. Інфекційні процеси, що були викликані *H. influenzae* та *H. parainfluenzae* характеризувалися більш легким перебігом захворювання, а також молодим та середнім віком хворих, тоді як штами *S. pneumoniae* ставали етіологічною причиною, як тяжкого перебігу процесу, так і середньої тяжкості та охоплювати усі вікові статуси пацієнтів.

Штами *S. aureus* були виявлені в двох випадках у хворих на НП та в одному – при інфекційному загостренні ХОЗЛ. Серед них двоє пацієнтів з першої та другої груп мали вік старше 60 років, а третій, віком 46 років, мав в анамнезі гострий респіраторний епізод. Хоча *S. aureus* не відноситься до основних етіологічно вагомих збудників при даних нозологіях, передумовою етіологічної ролі цього збудника у виникненні захворювання могли стати похилий вік хворого, вживання алкоголю, а також наявність в анамнезі гострого респіраторного епізоду. В даних випадках, слід також враховувати можливість колонізації мокротиння, що могло маскувати пневмококову чи аспіраційну пневмонію [8, 9].

Штами *P. aeruginosa* та *K. pneumoniae* були виявлені у осіб з інфекційним загостренням ХОЗЛ 2/4 (28,5%) випадків, що більш характерні для захворювань з хронічним перебігом. Серед хворих на НП цих збудників не було виявлено. Вони здатні обумовлювати більш тяжкий перебіг процесу та характеризуються значними рівнями резистентності, що в свою чергу вказує на необхідність встановлення етіологічного діагнозу при грамнегативних інфекціях [6, 7, 8].

Ще однією проблемою, що обумовлює потребу проведення мікробіологічної діагностики у хворих на ІНДШ є глобальна спрямованість зростання резистентності мікроорганізмів до АБП у світі. Визначення їх чутливості до АБП залишається важливою ланкою діагностичної програми.

Через це на другому етапі нашого дослідження було проведено аналіз резистентності виявлених мікроорганізмів до АБП. Розподілення цих етіологічно вагомих мікроорганізмів представлені на рис. 2

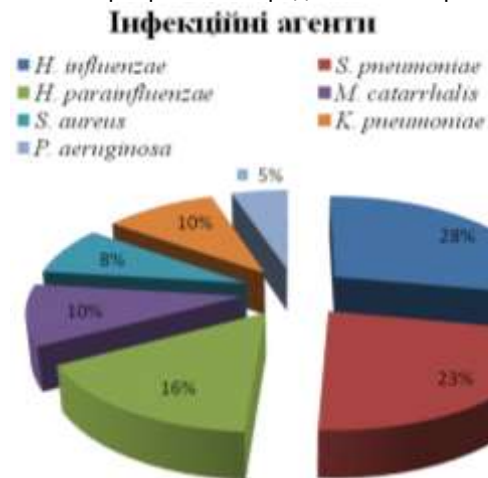


Рис. 2 Розподілення етіологічно вагомих збудників у хворих на НП та інфекційне загострення ХОЗЛ

Основні мікроорганізми та АБП до яких у них була виявлена резистентність представлені в табл. 2

За даними, отриманими в результаті дослідження, *H. influenzae* був чутливим до всіх класів АБП. Серед штамів *S. pneumoniae* резистентними до пеніцилінів виявилися 22% штамів, тоді як чутливим – 78%, помірно чутливих виявлено не було. До макролідів, лінказамідів та фторхінолонів чутливими виявилися 100% штамів *S. pneumoniae*.

Таблиця 2
Рівень резистентності збудників ІНДШ до АБП

АБП	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Пеніциліни	2 (22%)	-	-	-

Амінопеніциліни	-	2 (33%)	-	2 (50%)
Захищені амінопеніциліни	-	1 (17%)	-	-
Аміноглікозиди	-	-	1 (33%)	-
Фторхінолони	-	1 (17%)	-	-

Отримані дані, щодо резистентності до препаратів пеніцилінового ряду штамів *S. pneumoniae* схожі на дані отримані у країнах Європи, таких як Румунія та Болгарія, Іспанія та Литва [13]. Однак вищі ніж в інших країнах Європи, де резистентність до пеніциліну не перевищувала 10%-го бар'єру. Ці дані підтверджуються і багаточисельними дослідженнями, проведеними у світі [12, 13, 14, 15, 16, 17].

Чутливими до всіх класів антибактеріальних препаратів виявилися штами *M. catarrhalis* та *P. aeruginosa*. За даними деяких багаточисельних досліджень, *P. aeruginosa* характеризується досить значними рівнями резистентності до різних класів АБП, на відміну від результатів отриманих у нашому дослідженні [13, 15, 17].

Штами *H. parainfluenzae* виявилися резистентними до амінопеніцилінів в 33% випадків, до захищених амінопеніцилінів та фторхінолонів були чутливими у 83% штамів, тоді як 17% були резистентними.

Резистентними, також, виявилися штами *K. pneumoniae* у 50% випадків до амінопеніцилінів. Тоді як до захищених амінопеніцилінів, цефалоспоринов, фторхінолонів, аміноглікозидів та карбопенемів штами *K. pneumoniae* були 100% чутливими. За світовими даними рівень резистентності *K. pneumoniae* до амінопеніцилінів, також, є досить високим та зумовлює необхідність постійного моніторингу даної проблеми [13].

Стосовно штамів *S. aureus*, то за нашими даними вони були чутливими у 100% випадків до цефалоспоринов та макролідів, тоді як до фторхінолонів та аміноглікозидів відзначалася резистентність у 33% випадків. Помірно-чутливих штамів виявлено не було.

Прогресування тяжкості захворювання, виникнення ускладнень в результаті неефективності антибактеріальної терапії також щільно пов'язано із резистентністю мікроорганізмів до двох і більше антибактеріальних препаратів. За нашими даними мультирезистентність складала 3% і була достатньо низькою.

Підбиваючи підсумки, слід зауважити, що проведення мікробіологічної діагностики патологічного матеріалу хворих на ІНДШ, з урахуванням правильного виконання дослідження, дає змогу отримати відповіді на питання, що постають в процесі постановки етіологічного діагнозу і в подальшому скеровують в бік раціонального корегування, за потреби, емпірично призначеної АБТ, що підвищує ефективність позитивної відповіді на лікувальну програму.

Висновки

1. Інфекційних агентів у хворих на НП та інфекційне загострення ХОЗЛ вдалося виявити лише у 46% випадків. За нашими даними, найбільш часто зустрічалися такі мікроорганізми, як *H. influenzae* (28%), *S. pneumoniae* (23%), *H. parainfluenzae* (16%), *M. catarrhalis* (10%). Грамнегативні інфекційні агенти, так як *P. aeruginosa* та *K. pneumoniae* визначалися у хворих з хронічним перебігом процесу.

2. За отриманими даними, щодо чутливості інфекційних агентів до АБП, була зафіксована резистентність штамів *S. pneumoniae* до пеніцилінів (22%), *H. parainfluenzae* та *K. pneumoniae* до амінопеніцилінів

(33% та 50% відповідно), *S. aureus* до аміноглікозидів (33%), а також *H. parainfluenzae* до захищених амінопеніцилінів та фторхінолонів (17%). Рівень мультирезистентності склав 3%.

3. Мікробіологічна діагностика повинна залишатися невід'ємною ланкою діагностичної програми, незважаючи на достатньо низький рівень результативності та враховуючи невпинне зростання резистентності, тоді як саме дослідження потребує більшої відповідальності у процесі проведення забору та дослідження патологічного матеріалу, задля забезпечення підвищення її ефективності.

Література

- 10 ведущих причин смерти в мире. Изменения за последнее десятилетие (период с 2000 по 2011 год) / ВОЗ. – 2013. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index.html>
- Авдеев С.Н. Антибактериальная терапия при обострении хронической обструктивной болезни легких / С.Н. Авдеев // Пульмонология. – 2010. – №2. – С. 96–104.
- Дзюблик Я.О. Клінічні аспекти антибіотикорезистентності збудників негоспітальних інфекцій дихальних шляхів / Я.О. Дзюблик // Укр. пульмонолог. журн. – 2010. – №3. – С. 53–56.
- Зубков М.Н. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований / М.Н. Зубков // Клин. микробиол. Антимикроб. Химиотет. – 2004. – Том 6, №2. – С. 143 – 154.
- Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность Streptococcus pneumoniae в России в 1999 – 2005гг: результаты многоцентровых проспективных исследований ПегАС-I ПегАС-II / Р.С. Козлов, О.В. Сивая, К.В. Шпынев [и др.] // Клин. микробиол. Антимикроб. Химиотет. – 2006. – Том 8. – №1. – С. 33–47.
- Перцева Т.О. Анамнестичні та клініко-функціональні особливості перебігу хронічного обструктивного захворювання легень у залежності від характеру й ступеня мікробного навантаження нижніх дихальних шляхів / Т.О. Перцева, Л.І. Конопкіна // Укр. пульмонолог. журн. – 2009. – №2. – С. 26–30.
- Перцева Т.А. Клинические значимые возбудители инфекций дыхательных путей. Конспект врача-клинициста и микробиолога Часть 4. «Проблемные» грамотрицательные микроорганизмы: синегнойная палочка и ацинетобактер / Т.А. Перцева., Р.А. Бонцевич. // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2007. – №2. Режим доступа: <http://immuno.health-ua.com/article/80.html>
- Рачина С.А. Структура бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии в многопрофильных стационарах Смоленска / С.А. Рачина, Р.С. Козлов, Е.П. Шаль [и др.] // Пульмонология. – 2011. – №1. – С. 5–18.
- Рачина С.А. Современные подходы к микробиологической диагностике привнебольничной пневмонии / С.А. Рачина, Р.С. Козлов // Пульмонология. – 2010. – №5. – С. 5–14.
- Фещенко Ю.І. Негоспітальна пневмонія у дорослих осіб: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибактеріальна терапія (проект клінічних настанов) Частина 1 / Ю.І. Фещенко, О.А. Голубовська [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. – 2012. – №4. – С. 5–17.
- Фещенко Ю.І. ХОЗЛ в Україні: проблеми і пути решения / Ю.І. Фещенко. // Здоров'я України. – 2009. – №9/1. – С. 3–4.
- Adolf W. Karchmer. Increased Antibiotic Resistance in Respiratory Tract Pathogens: PROTEKT US—An Update. / W. Adolf // Clinical Infectious Diseases. – 2004. – Vol.39. – P. 142–150.

13. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2012 / European Centre for Disease Prevention and Control. – 2013. – 205 p.
14. Burcin S. A survey of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Turkey 2004–2005. / S. Burcin, T. Ferda, U. Sercan [et al.]. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – Vol.60. – P. 587–593.
15. Thornsberry C., Sahm. Survey of Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Isolates to 26 Antimicrobial Agents: a Prospective U.S. Study. / C. Thornsberry, P. T. Ogilvie, H. P. Holley jr., D. F. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1999. – Vol.11. – P. 2612–2623.
16. Kim S H. ANSORP Study Group. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. / S. H. Kim, J. H. Song, D. R. Chung [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – Vol.56. – P. 1418–1426.
17. Michael R. Jacobs et al. and the Alexander Project Group. The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. / R. Michael, Jacobs [et al.]. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol.52. – P. 229–246.
18. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement // M100-S9 – 1999. – V.19. – N.1.

ENGLISH VERSION: THE EFFECTIVENESS AND NECESSITY OF CARRYING OUT ETIOLOGICAL DIAGNOSTICS IN PATIENTS WITH LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS*

Pertseva T. O., Kireyeva T.V., Shtepa O.O.

State Establishment "Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine", Department of Faculty of Therapy and Endocrinology

ACCORDING to our data, the effectiveness of microbiological diagnostics in patients with lower respiratory tract infections with the subsequent establishing etiologic diagnosis was 46%. Etiologic agent was identified in 35% of cases in patients with community-acquired pneumonia (CAP) and 58% of cases in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AE COPD). H. influenzae, S. pneumoniae, H. parainfluenzae were the most common microorganisms detectable in patients with CAP and AE COPD 83,4% and 52,3% respectively. K. pneumoniae and P. aeruginosa (28,5%) accounted a considerable part of cases in patients with AE COPD. M. catarrhalis strains were determined in 14,4% of cases. S. pneumoniae strains resistance to penicillin was 22%, H.parainfluenzae and K. pneumoniae to aminopenicillins - 33% and 67%, respectively, S. aureus to aminoglycosides and fluoroquinolones - 33%. Multiple drug resistance was 3%. Etiologic diagnosis makes it possible to adjust and improve the efficiency of empirical antibiotic therapy based on the level of resistance of the pathogens despite the relatively low level of efficiency and the variety of identified pathogens.

Key words: infectious agents, microbiological diagnostics, community-acquired pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease, antibacterial drugs resistance.

In the treatment of infections of lower respiratory tract (ILRT) a key role belongs to anti-bacterial therapy (ABT), administration of which in the majority of cases is of empiric character, caused by necessity to start treatment in the shortest terms and is based on the data of world researches [9, 13,16].

The necessity of etiologic diagnostics is due to the need of ABT correcting in a concrete patient in the absence of response to initially administered empiric ABT therapy; this may be linked with atypical pulmonary pathogen or with the change of profile of resistance of main respiratory causative agents to anti-bacterial agents (ABA). Establishing etiologic diagnosis gives possibility, if necessary, to pass from ABA of a wide spectrum (or combined therapy) to agent of a narrow spectrum (to mono-therapy), favoring reduction of expenditures, decrease of risk of development of unfavorable reactions to medicinal agents and selection of antibacterial resistance [2,4,9].

In patients with community acquired pneumonia (CAP) undergoing treatment in out-patient unit, in accordance with confirmed treatment standards it is not recommended to carry out microbiologic sputum examination. This examination is being carried out under conditions of inefficiency of started empirical ABT or due to frequent relapses of respiratory episodes, taking into ac-

count short period of time, which may testify to pathogen presence, the activity of which was not stopped while using initially administered ABT [10].

Microbiologic examination of sputum in patients with infectious exacerbation of COPD is important both in the period of exacerbation with the aim to define etiologic causative agent, and in remission stage with the aim of revealing microorganisms, carriage of latter is characteristic for a patient during chronic course of the disease [7,11]. Due to the fact that carrying out a complete eradication of these microorganisms from respiratory ways is not possible, this information gives possibility to prognosticate increase of which causative agent's virulence may have etiologic significance in case exacerbation of the process. In the same manner it is important to pay attention to possibility of achieving positive result, linked with contamination of pathologic material with microorganisms of upper respiratory ways [8, 9].

In both cases amount of microorganisms concentration in the material examined in accordance with confirmed procedures should be considered, the higher the amount the more probable is etiologic significance of identified microorganism in the inflammatory process in a concrete nosology.

Carrying out microbiologic diagnostics in patients hospitalized in in-patient units is a necessary prerequisite

* To cite this English version: T. O. Pertseva, T.V. Kireyeva, O.O. Shtepa The effectiveness and necessity of carrying out etiologic diagnostics in patients with lower respiratory tract infections - / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 21 -25.

for establishing etiologic diagnosis and is caused by a more severe course of the process as compared with out-patients and by presence of epidemiologic risk factors [2, 10]. However, even on condition of hospitalization, considering extended possibilities of laboratory diagnostics in revealing etiologically appreciable causative agents in patients with CAP and infectious exacerbation of COPD, this is possible only in 30-50% of cases, while carrying out microbiologic examination. [2, 9, 10].

Obtained negative result in the course of examination may be linked with a lot of factors, such as: insufficient awareness of patients on correct taking of clinical material, extensive territorial disunity of microbiologic laboratories and medical treatment facilities; this may have impact on time and quality of provision and transport of samples of pathologic material [4].

Taking into account the abovementioned, the aim of our work was assessment of carrying out microbiologic examination of pathologic material obtained from CAP patients and infectious exacerbation of COPD with the further revealing of structure of etiologically appreciable causative agents and level of their resistance to the main ABA, by means of performing investigations at clinical hospitals of Dnipropetrovsk.

Materials and research methods

Patients with diagnosed CAP and infectious exacerbation of COPD undergoing in-patient treatment in clinics of Dnipropetrovsk were included in the investigation. Diagnosis of pneumonia was confirmed by X-ray and established according to the Order N128 of HM of Ukraine from 19.03.2007. Diagnosis of COPD was established in accordance with GOLD criteria (2008) and with the Order N128 of HM of Ukraine from 19.03.2007. Patients with administered anti-biotic therapy lasting less than 24 hours were not included in the study.

All patients underwent general clinical methods of examination, X-ray examination of chest organs in two projections, external respiration function (ERF) was assessed by means of spiograph MasterLab (Viasis, Germany).

Microbiologic examination was carried out at the laboratory of diagnostic center of LLP "Pharmacies of medical academy" of Dnipropetrovsk

Sputum discharge was used as material for investigation in microbiologic diagnostics. Identification of microorganisms was performed by means of conventional cultural methods [4]. Study of sensitivity to anti-bacterial agents was carried out by disc-diffusion method and by defining minimal inhibiting concentration (MIC) of antibacterial agent. Test of disc sensitivity was performed according to CLSI (earlier NCCLS guidelines) [18], as all methods of sensitivity defining.

Sampling was carried out in accordance with confirmed procedures [4]. Delivery of samples into laboratory

lasted for 1,5 -2 hours from the moment of taking, with observance of generally accepted rules of transportation.

Statistical processing of the data was done by means of "Microsoft Office Excel" and "Statistica 6" using non-parameter statistical methods.

Research results

Investigation was divided into two stages. At the first stage etiologically appreciable microorganisms in patients with CAP and infectious exacerbation of COPD were defined, at the second stage - resistance of the revealed causative agents to ABA was analyzed.

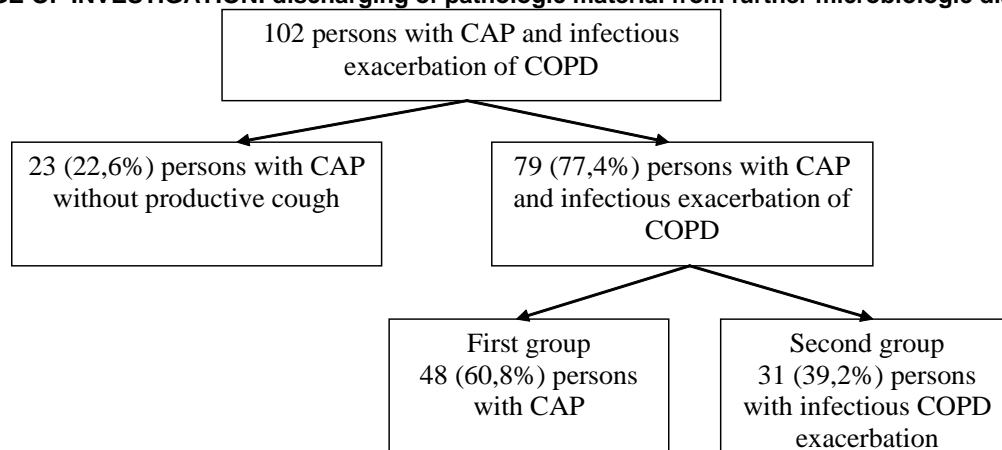
In the process of investigation 102 patients were examined. Of all patients, 23 (22,6%) persons with CAP did not experience productive cough, even in stimulating of sputum production, they did not have indications for fiberoptic bronchoscopy, which would make it possible to obtain pathologic material directly from respiratory ways. These patients were excluded from further investigation. Data on investigation design are presented at figure 1.

At the first stage 79 persons (77,4%) with productive cough were included in the investigation. They were divided into two groups according to the established diagnosis. First group included 48 persons with established diagnosis of CAP, median age was 58,6 (48,0-62,0) years; there were 27 men and 21 women, 56% and 44% correspondingly. Among them 12 (25%) patients were hospitalized on the first or second day from the onset of disease. The basic group of patients – 27 (56%) were hospitalized on the third and fourth day, 9 (19%) patients were hospitalized on the fifth and sixth day and longer period of time.

Second group included 31 persons with established diagnosis of COPD in the stage of infectious exacerbation, median age was 64,7 (53,0-67,0) years; there were 19 men and 12 women, 61% and 39% correspondingly. Herewith, 16 (52%) persons were hospitalized on the third – sixth day from the disease onset, in all other cases 15 (48%) – time period was more than one week.

Among two groups when carrying out microbiologic investigation of pathologic material from lower respiratory ways, namely sputum discharge, we managed to reveal infectious agents only in 46% of cases.

Combining of two or more etiologically appreciable microorganisms occurred in 7% of cases of revealing of causative agents among two groups. So, in the patient with CAP association of *H. influenzae* and *M. catarrhalis* was revealed, and in the patient with infectious exacerbation of COPD – combination of three main respiratory pathogens: *H. influenza*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*. Namely association of some causative agents may create conditions for increasing treatment period and lingering character of inflammatory process course in the lungs, due to specific features of each microorganism taken separately.

I-ST STAGE OF INVESTIGATION: discharging of pathologic material from further microbiologic diagnostics**II-nd STAGE OF INVESTIGATION: study of resistance of identified respiratory pathogens**

36 (46%) of persons with identified etiologically appreciable microorganism

Fig. 1 Design of the investigation

Distribution of microorganisms in each group taken separately is presented in the table 1.

It should also be mentioned, that in the first group we managed to reveal etiologically appreciable causative agent in 17 (35%) of cases, herewith lesion of pulmonary tissue in these patients was more severe than in cases of negative research result, whereas in the second one etiologic causative agent was revealed in 19 (58%) of cases.

Table 1
Distribution of infectious agents of both groups (abs (%))

Infectious agents	Amount of the isolated microorganisms	
	CAP	COPD
<i>H. influenzae</i>	7 (39%)	4 (19%)
<i>S. pneumoniae</i>	4 (22,2%)	5 (23,8%)
<i>H. parainfluenzae</i>	4 (22,2%)	2 (9,5%)
<i>M. catarrhalis</i>	1 (5,5%)	3 (14,4%)
<i>S. aureus</i>	2 (11,1%)	1 (4,8%)
<i>K. pneumoniae</i>	-	4 (19%)
<i>P. aeruginosa</i>	-	2 (9,5%)

Analyzing the data obtained, it should be mentioned that in patients of the first group the most part of identification accounts for *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *H. parainfluenzae* 15 (83,4%), whereas in patients of the second group together with the main respiratory causative agents such as *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *H. parainfluenzae* 11 (52,3%), a significant share of identifications of such gram-negative microorganisms as *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* 6 (28,5%) was defined; this is characterized by a severe and long-termed disease course and complications in providing efficient empirical ABT. In the patients of the second group strains of *M. catarrhalis* occurred the most often, than in the patients of the first group.

Strains *H. influenzae* and *S. pneumoniae* were related to the main respiratory pathogens in the both groups, level of their identification may be impacted by a rapid death of these microorganisms, due to their "nicety" yet before the beginning of investigation.

So, *H. influenzae* requires X and V (coenzyme ferment of dehydrase) blood factors in nutrient medium, nutrient medium of *S. pneumoniae* must be enriched with

defibrinated blood of animals in 5% concentration, they are in need of incubation in the atmosphere with the increased level of CO₂ [4,8].

It should be also mentioned that in 7(64%) of cases among 11 patients with CAP there were identified *H. influenzae* and *H. parainfluenzae*, in case-history presence of acute respiratory episode was noted. Infectious processes, caused by *H. influenzae* and *H. parainfluenzae* were characterized by a milder disease course and affected young and median age patients, whereas strain *S. pneumoniae* became etiologic cause both of severe disease course and moderate one and affected patients of all age statuses.

Strains of *S. aureus* were revealed in two cases in patients with CAP and in one case – in infectious exacerbation of COPD. Of them two patients from the first and second group were older than 60 years, and the third patient, aged 46 had acute respiratory episode in case-history. Though *S. aureus* is not related to the main etiologically appreciable causative agents in these nosologies, elderly age of a patient, alcohol abuse and presence of acute respiratory episode in case-history may be prerequisite of etiologic role of this causative agent in development of the disease. In these cases possibility of sputum colonization, which may mask pneumococcus or aspiration pneumonia should be considered too [8, 9].

Strains *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* were revealed in patients with infectious exacerbation of COPD 2/4 (28,5%) of cases, they are more typical for the diseases running chronic course. Among patients with CAP these causative agents were not revealed. They are able to cause a more severe course and are characterized by substantial levels of resistance, this in its turn, points to the necessity of establishing etiologic diagnosis in gram-negative infections [6, 7, 8].

Yet another problem, causing necessity of carrying out microbiologic diagnostics in patients with ILRT is a global slant of growth of microorganism resistance to ABA in the world. Defining of their sensitivity to ABA remains to be an important chain of diagnostic program.

For this reason at the second stage of our investigation there was carried out analysis of resistance of the revealed microorganisms to ABA. Distribution of these etiologically appreciable microorganisms is presented at the fig. 2.

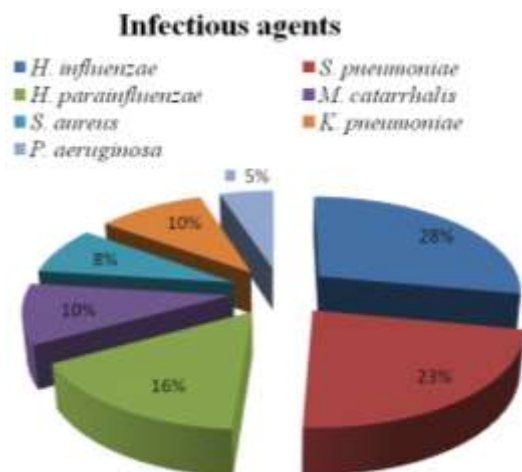


Fig. 2 Distribution of etiologically appreciable causative agents in patients with CAP and infectious exacerbation of COPD

Main microorganisms and ABA to which resistance was revealed are presented in table 2

By the data obtained in the course of investigation, *H. influenzae* was sensitive to the all ABA classes. Among *S. pneumoniae* 22% of strains were resistant to penicillins, 78% - sensitive ones, moderately sensitive were not revealed. 100% of *S. pneumoniae* strains were sensitive to macrolides, lincosamides, cephalosporins.

Obtained data as for resistance of *S. pneumoniae* to agents of penicillin row were similar with the data obtained in European countries, namely Romania and Bulgaria, Spain and Lithuania [13]. However, these data are higher than in other countries of Europe, where resistance to penicillin did not exceed 10% barrier. These data are confirmed by multi-center investigations, carried out in the world [12, 13, 14, 15, 16, 17].

Table 2
Level of resistance of ILRW causative agents to ABA

ABA	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Penicillins	2 (22%)	-	-	-
Aminopenicillins	-	2 (33%)	-	2 (50%)
Defended aminopenicillins	-	1 (17%)	-	-
Aminoglycosides	-	-	1 (33%)	-
Fluoroquinolones	-	1 (17%)	-	-

Strains *M. catarrhalis* and *P. aeruginosa* were sensitive to the all classes of antibacterial agents. By the data of some multi-center investigations, *P. aeruginosa* is characterized by very sufficient levels of resistance to different classes of ABA, as distinct from the results obtained in our investigation [13, 15, 17].

Strains of *H. parainfluenzae* proved to be resistant to aminopenicillins in 33% of cases, to defended aminopenicillins and fluoroquinolones 83% of strains were sensitive, whereas 17% were resistant.

Strains *K. pneumoniae* in 59% of cases were also resistant to aminopenicillins. Whilst to defended aminopenicillins, cephalosporins, aminoglycosides and carbapenems strains *K. pneumoniae* were 100% sensitive. According to the world data, level of *K. pneumoniae* resistance to aminopenicillins is also sufficiently high and this causes necessity of a constant monitoring of this problem [13].

Considering strains of *S. aureus*, according to our data they were sensitive to caphalosporins and macrolids in 100% of cases, whereas resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides was noted in 33% of cases. Moderately sensitive strains were not revealed.

Progressing of the disease severity, development of complications due to inefficiency of antibacterial therapy is also closely connected with microorganism resistance to two or more antibacterial agents. According to our data multi-resistance made up 3% and was sufficiently low.

Summing up it should be mentioned, that carrying out microbiologic diagnostics of pathologic material of patients with ILRT, taking into account accuracy of the performed investigation makes it possible to get answers arising in the process of etiologic diagnosis establishing, and in the following directs to rational correction, if necessary of empirically administered ABT; this increases efficacy of positive response to treatment program.

Conclusions

1. We managed to reveal infectious agents of CAP and infectious exacerbation of COPD only in 46% of cases. According to our data, such microorganisms as *H. influenzae* (28%), *S. pneumoniae* (23%), *H. parainfluenzae* (16%), *M. catarrhalis* (10%) occurred the most often. Gram-negative infectious agents, such as *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* were defined in patients with chronic course of the process.

2. According to the obtained data, concerning sensitivity of infectious agents to ABA, there was determined resistance of *S. pneumoniae* strains to penicillins (22%), *H. parainfluenzae* and *K. pneumoniae* to aminopenicillins (33% and 50% correspondingly), *S. aureus* to aminoglycosides (33%), and *H. parainfluenzae* to defended aminopenicillins and fluoroquinolones (17%).

3. Microbiologic diagnostics must remain an integral chain of diagnostic program, despite sufficiently low level of effectiveness and taking into account a constant growth of resistance, whereas investigation itself requires more responsibility in the process of sampling and studying pathologic material to provide increase of its efficiency.

References

- 10 veduschich prichin smerti v mire. Izmeneniya za poslednee desyatiletie (period s 2000 po 2011 god) / VOZ. – 2013. Rezhim dostupa: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index.html>
- Avdeev S.N. Antibakterial'naya terapiya pri obostrenii khronicheskoy obstruktivnoy bolezni legkich / S.N. Avdeev // Pul'monologiya. – 2010. – №2. – S. 96–104.
- Dzyublik Ya.O. Klinichni aspekti antibiotikorezistentno-sti zbudnikiv negospital'них infekziy dychal'них shlyachiv / Ya.O. Dzyublik // Ukr. pul'monol. zhurn. – 2010. – №3. – S. 53–56.
- Zubkov M.N. Sbor, transportirovka biologicheskogo materiala i traktovka rezul'tatov mikrobiologicheskikh issledovaniy / M.N. Zubkov // Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Chimiotet. – 2004. – Tom 6, №2. – S.143 – 154.

5. Kozlov R.S. Antibiotikorezistentnost' Streptococcus pneumoniae v Rossii v 1999 – 2005gg: rezul'taty mnogozentrovych prospektivnykh issledovaniy PeGAS-I PeGAS-II / R.S. Kozlov, O.V. Sivaya, K.V. Shpynev [i dr.] // Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioter. – 2006. – Tom 8. – №1. – S. 33–47.
6. Perzeva T.O. Anamnestichni ta kliniko-funkcional'ni osoblivosti perebigu chronichnogo obstruktyvnogo zachvoryuvannya legen' u zalezhnosti vid karakteru y stupenya mikrobnogo navantazhennya nizhnich dichal'nich shlyachiv / T.O. Perzeva, L.I. Konopkina // Ukr. pul'monol.zhurn. – 2009. – №2. – S. 26–30.
7. Perzeva T.A. Klinicheski znachimye vzbuditeli in-fekziy dychatel'nykh putey. Konspekt vracha-klinizista i mikrobiologa Chast' 4. «Problemnye» gramnegativnye mikroorganizmy: sinegnoynaya paloch-ka i azinetobakter / T.A. Perzeva., R.A. Bonzevich. // Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya. – 2007. – №2. Rezhim dostupa: <http://immuno.health-ua.com/article/80.html>
8. Rachina S.A. Struktura bakterial'nykh vzbuditeley vnebol'nichnoy pnevmonii v mnogoprofil'nykh stacionarakh Smolenska / S.A. Rachina, R.S. Kozlov, E.P. Shal' [i dr.] // Pul'monologiya. – 2011. – №1. – S. 5–18.
9. Rachina S.A. Sovremennye podchody k mikrobiologicheskoy diagnostike privnebol'nichnoy pnevmonii / S.A. Rachina, R.S. Kozlov // Pul'monologiya. – 2010. – №5. – S. 5–14.
10. Feschenko Yu.I. Negospital'na pnevmoniya u doroslich osib: etiologiya, patogeneza, klasifikaziya, diagnostika, antibakterial'na terapiya (proekt klinichnich nastanov) Chastina 1 / Yu.I. Feschenko, O.A. Golubov'ska [ta in.] // Ukrain'skiy pul'monologichniy zhurnal. – 2012. – №4. – S.5–17.
11. Feschenko Yu.I. ChoZL v Ukraine: problemy i puti resheniya / Yu.I. Feschenko. // Zdorov'ya Ukraini. – 2009. – №9/1. – S. 3–4.
12. Adolf W. Karchmer. Increased Antibiotic Resistance in Respiratory Tract Pathogens: PROTEKT US—An Update. / W. Adolf // Clinical Infectious Diseases. – 2004. – Vol.39. – P. 142–150.
13. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2012 / European Centre for Disease Prevention and Control. – 2013. – 205 p.
14. Burcin S. A survey of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Turkey 2004–2005. / S. Burcin, T. Ferda, U. Sercan [et al]. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – Vol.60. – P. 587–593.
15. Thornsberry C., Sahm. Survey of Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Isolates to 26 Antimicrobial Agents: a Prospective U.S. Study. / C. Thornsberry, P. T. Ogilvie, H. P. Holley jr., D. F. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1999. – Vol.11. – P. 2612–2623.
16. Kim S H. ANSORP Study Group. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. / S. H. Kim, J. H. Song, D. R. Chung [et al] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – Vol.56. – P. 1418–1426.
17. Michael R. Jacobs et al. and the Alexander Project Group. The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. / R. Michael, Jacobs [et al]. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol.52. – P. 229–246.
18. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement // M100-S9 –1999. – V.19. – N.1.

Матеріал надійшов до редакції 05.05.2014 р.

© Перцева Т. О., Кіреєва Т. В., Белослудцева К. О.
УДК 616.24-002-06-02-032

ОСОБЛИВОСТІ ЕТІОЛОГІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКА У ХВОРИХ НА ТЯЖКУ НЕГОСПІТАЛЬНУ ПНЕВМОНІЮ*

Перцева Т. О., Кіреєва Т. В., Белослудцева К. О.

Державна установа «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України».

Важность идентификации возбудителя у больных тяжелой негоспитальной пневмонией (ТНП) не вызывает сомнения. Учитывая неодногласные данные о ведущей роли респираторных возбудителей в этиологии ТНП, а также о роли различных методов их идентификации целью работы было определить спектр возбудителей ТНП, а также эффективность использования такого некультурального метода исследования мокроты как мультиплексная ПЦР. Для этого было обследовано 62 больных с верифицируемой ТНП. Всем больным после госпитализации до назначения антибактериальной терапии проводилась идентификация этиологического возбудителя и определения ВИЧ-статуса. Согласно результатам исследования оказалось, что благодаря комбинации 2 методик исследования мокроты в целом этиология ТНП была определена в 61,2% случаев, при этом обозначились 3 категории больных: с выделенными Гр(+) бактериями, с выделенными Гр(-) бактериями и с выделенной оппортунистической флорой. По результатам анализа структуры идентифицированных бактериальных возбудителей всех больных ТНП преобладает пневмококк, нами была выявлена высокая частота оппортунистической и мультирезистентной Гр(-) флоры. В связи с высоким риском атипичной и Гр(-) этиологии ТНП идентификация респираторных возбудителей должна быть включена в перечень обязательных мероприятий диагностического алгоритма при этой патологии. «Золотым стандартом» идентификации респираторных возбудителей у больных ТНП остается микробиологическое исследование с выявлением чувствительности к антибактериальным препаратам, однако при невозможности его проведения, а также при подозрении на наличие атипичных возбудителей эффективным ориентировочным, однако быстрым, методом является использование ПЦР-исследования мокроты.

Ключевые слова: тяжелая внебольничная пневмония, этиология, возбудители

Актуальність проблеми ведення хворих на тяжку негоспітальну пневмонію (ТНП) не викликає сумніву і обумовлена постійним ростом захворюваності й летальності при цій патології як в нашій країні так і у всьому світі [3, 9, 15, 17]. Постійне зростання кількості негоспітальних пневмоній тяжкого перебігу протягом останніх років деякі дослідники пов'язують, перш за все, зі зміною етіологічної структури цього захворювання, а саме зі збільшенням частоти зустрічальності стафілококів, легіонел і грамнегативних (Гр(-)) мікроорганізмів, які призводять до більш тяжкого перебігу захворювання [1, 2, 16].

Згідно з літературними даними, провідна етіологічна роль при ТНП відводиться таким мікроорганізмам, як *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (у 30% випадків), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (у 1–15% випадків), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (у 7–8% випадків), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (у 10–15% випадків), родина *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus*) (у 22% випадків) [1, 18]. Досить рідко ТНП викликає *Haemophilus influenza* (*H. influenza*) (у 4–5% випадків), атипіві збудники *Mycoplasma Pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) (у 2–2,5% випадків), віруси (у 5% випадків) [20, 21]. Найбільш частими збудниками пневмонії, що закінчується летально, є *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* і *H. influenzae* (31,4, 28,6, 12,9 і 11,4% випадків від усіх виділених штамів відповідно) [5].

Крім того, постійно відбувається збільшення пневмонії у осіб, що страждають різними імунodefіцитними станами не тільки за рахунок постійного збільшення ВІЛ-позитивних пацієнтів [19], а також станів, що

приводять до зниження активності клітинного імунітету (цукровий діабет, алкоголізм, онкологічні захворювання тощо) [4, 7]. Найбільш частими збудниками таких пневмоній є *S. aureus*, *Streptococcus viridians*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus anhaemolyticus*, *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), *Cytomegalovirus*, гриби роду *Candida*, *Aspergillus*, віруси, а також *L. pneumophila*, *Mycobacterium avium-intercellulare*, *Enterobacteriaceae* [8, 10].

З огляду на вищезазначене, необхідно підкреслити важливість ідентифікації збудника саме у хворих на ТНП для можливості індивідуалізації антибактеріальної терапії (АБТ). Однак, російські експерти в області пульмонології вказують на те, що етіологію НП не вдається встановити у 40–60% пацієнтів [1, 14]. Відсутність продуктивного кашлю у ослаблених хворих при пригніченні кашльового рефлексу, неадекватність вимогам посіву біологічного матеріалу, широке нераціональне застосування антибіотиків на догоспітальному етапі, недотримання правил збору, зберігання і доставки харкотиння, тривалість виконання, неможливість ідентифікації внутрішньоклітинних збудників – найважливіші причини негативного результату мікробіологічного дослідження експекторанта.

У той же час існують дані про те, що, завдяки застосуванню комбінації сучасних методів діагностики, ідентифікацію збудника ТНП можна приблизити до 80% [2]. За наявності ТНП, коли швидкий пошук етіологічного агента виходить на перший план, актуальним є впровадження у медичну практику швидких, універсальних, високоспецифічних експрес-методів діагностики респираторних збудників, до яких відноситься експрес-тестування харкотиння за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції

* Цитування при атестації кадрів: Т. О. Перцева, Т. В. Кіреєва, К. О. Белослудцева.. Особливості етіології та ідентифікації збудника у хворих на тяжку негоспітальну пневмонію // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 26–29

(ПЛР) [22]. Завдяки цьому методу можна за лічені години виявити не тільки типових збудників ТНП, а і внутрішньоклітинних мікроорганізмів та пневмоцисту [11].

Враховуючи неодноголосні дані про провідну роль респіраторних збудників в етіології ТНП, а також про роль різних методів їх ідентифікації метою роботи було визначити спектр збудників ТНП у нашому регіоні, а також ефективність використання такого некультового методу дослідження харкотиння як мультиплексна ПЛР у хворих цієї категорії.

Матеріали і методи дослідження

Нами було обстежено 62 хворих на верифіковану (згідно критеріям Наказу МОЗ України №128 від 19.03.2007 р. [12]) ТНП, котрі склали основну групу. Всім хворим після госпіталізації до призначення АБТ проводилась ідентифікація етіологічного збудника та визначення ВІЛ-статусу, згідно з результатами яких хворі на ТНП були розподілені на групи та підгрупи:

- група 1, в яку увійшли 51 хворий на ТНП без супутньої ВІЛ-інфекції, розподілені на підгрупи згідно з етіологічним чинником:
- підгрупа А – 17 хворих на ТНП (середній вік – $57,5 \pm 4,3$ років, чоловіків – 13 (76,5%)) з виділеними Гр(+) бактеріями;
- підгрупа В – 10 хворих на ТНП (середній вік – $50,2 \pm 5,2$ років, чоловіків – 7 (70,0%)) з виділеними Гр(-) бактеріями;
- група 2, в яку увійшли 11 хворих на ТНП (середній вік – $35,8 \pm 2,5$ років, чоловіків – 4 (36,4%)) з супутньою ВІЛ-інфекцією.

Оцінка ВІЛ-статусу проводилась шляхом експрес-тестування крові хворих за допомогою СІТО TEST HIV 1/2 («Фармаско», Україна).

Ідентифікацію збудників у харкотинні, індукованому харкотинні або бронхоальвеолярному змиві проводили методом мікробіологічного дослідження матеріалу та методом визначення ДНК бактерій методом ПЛР. Для цього проводився забір спонтанно експекторованого чи індукованого харкотиння вранці натще після попереднього очищення хворими зубів та ротової порожнини полосканням кип'яченою водою. Індукування харкотиння проводилося шляхом попередньої інгаляції через небулайзер гіпертонічного (3–5%) розчину хлориду натрію протягом 7–10 хвилин з наступним прополіскуванням порожнини рота і експекторацією виділень. Збір бронхоальвеолярного змиву проводився під час діагностичної або санаційної бронхоскопії. Термін доставки діагностичного матеріалу в лабораторію становив не більше 2 годин при зберіганні матеріалу при звичайних умовах.

Для проведення культурального бактеріологічного дослідження харкотиння з ідентифікацією патогенного збудника захворювання використовували класичні живильні середовища. Чутливість мікроорганізмів оцінювалась диско-дифузійним методом.

Ідентифікація ДНК *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* (*N. Meningitidis*), *H. influenza*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *P. jirovecii* проводилась методом мультиплексної ПЛР за допомогою наборів реагентів серії «МультиПрайм» («ІнтерЛабСервис», Росія) для одномоментної ампліфікації ДНК *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. Influenza*, для одномоментної ампліфікації ДНК *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* та за допомогою специфічного праймера pAZ102E для ампліфікації ДНК

P. jirovecii з використанням біоаналізатора Agilent 2100 («Agilent Technologies», США).

Усі хворі дали письмову згоду на проведення досліджень.

Статистична обробка отриманих результатів досліджень проводилась з використанням методів біометричного аналізу, що реалізовані у пакетах програм EXCEL-2003 (№ 74017-641-9475201-57075) та STATISTICA 6.0 (№ 31415926535897) [6, 13].

Результати та їх обговорення

За результатами дослідження виявилось, що завдяки комбінації 2 методик дослідження харкотиння загалом етіологію ТНП було визначено у 61,2% випадків, при цьому окреслились 3 кагорти хворих: з виділеними Гр(+) бактеріями, з виділеними Гр(-) бактеріями та з виділеною опортуністичною флорою (рис. 1), що полягло до основи принципу розподілу хворих на групи та підгрупи.

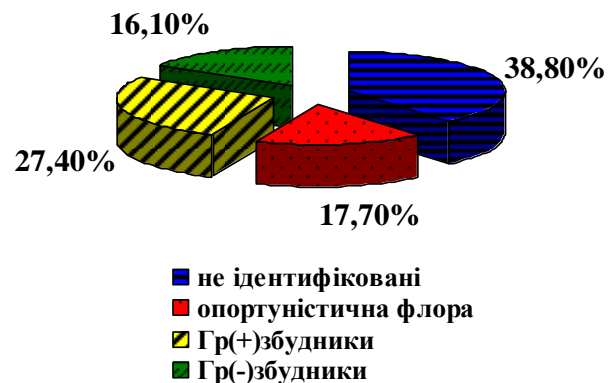


Рис. 1. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП

Що стосується пацієнтів групи 1, серед 51 хворого без ВІЛ-інфекції збудник було ідентифіковано у 27 (52,9%) випадках (табл. 1).

Таблиця 1
Ідентифіковані збудники у хворих групи 1, абс.(%)

Вид мікроорганізму	Група 1 (n=51)
<i>S. aureus</i>	5 (18,5)
<i>S. pneumoniae</i>	12 (44,4)
<i>K. pneumoniae</i>	3 (11,1)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (11,1)
<i>N. meningitidis</i>	2 (7,5)
<i>Acinetobacter</i>	1 (3,7)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,7)
<i>P. jirovecii</i>	-
<i>C. pneumoniae</i>	-
<i>M. pneumoniae</i>	-
<i>L. pneumophila</i>	-
Загалом	27

При цьому у 17 (62,9%) хворих, які склали підгрупу А, виділились Гр(+) бактерії (*S. pneumoniae* (n=11), *S. aureus* (n=6)) (рис. 2).

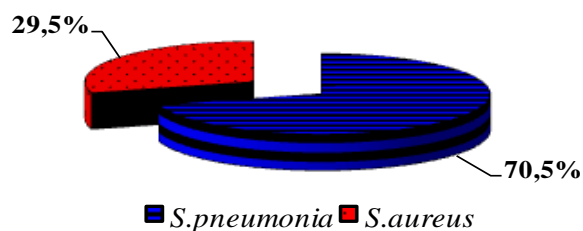


Рис. 2. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП підгрупи А

У підгрупу В увійшли 10 (19,6%) хворих, у яких виділились Гр(-) бактерії (*P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumonia* (n=3), *N. meningitides* (n=2), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)) (рис. 3).

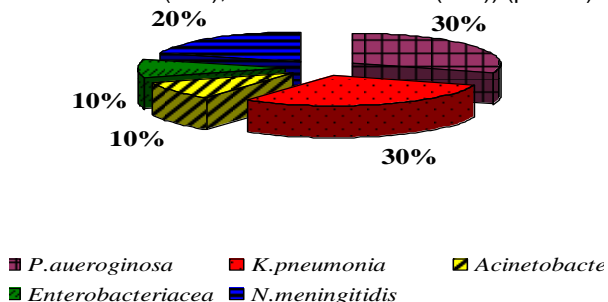


Рис. 3. Структура ідентифікованих збудників у хворих на ТНП підгрупи В

За результатами аналізу структури ідентифікованих бактеріальних збудників у 27 хворих групи 1, виявилось, що майже у половині випадків було виявлено *S. pneumoniae* (табл. 1). Привертає увагу висока частота ідентифікації Гр(-) збудників, які зустрілись у 10 (37,0 %) випадках.

Отримані результати про перевагу пневмокока, золотистого стафілокока, клебсієли, синьогнійної палички у структурі етіологічних збудників ТНП співпадають з іншими даними вітчизняних науковців. Тоді як виявлення *N. meningitides*, *Enterobacteriaceae* та *Acinetobacter* у якості етіологічного чинника потребує обговорення.

Згідно літературним даним, менінгококова ДНК може виділятися методом ПЛР у пацієнтів із назофарингеальним бактеріоносіємством цього збудника, що не вказує на етіологію ТНП. Втім, враховуючи тяжкий перебіг пневмонії у даних хворих і ефективність АБТ з включенням препаратів, що мають високу активність проти Гр(-) флори, можна стверджувати, що *N. meningitides* виступав у якості збудника ТНП.

Enterobacteriaceae та *Acinetobacter* можна розглядати як внутрішньолікарняну інфекцію, що приєдналась у процесі забору харкотиння. Втім, враховуючи, що біологічний матеріал у даних хворих було зібрано ще до використання апаратів дихальної підтримки у одноразовий посуд, що майже виключає контамінацію, можна вважати, що ці мікроорганізми також виступали етіологічним агентом у даних хворих на ТНП.

Слід також зауважити, що жодного випадку виявлення атипичних внутрішньоклітинних збудників ТНП (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* та *L. pneumophila*) методом ПЛР не спостерігалось.

При аналізі діагностичної значущості методів діагностики етіологічних факторів ТНП, що були використані у нашому дослідженні, виявилось, що із 27 штамів мікроорганізмів, котрі були ідентифіковані у хворих групи 1, 8 штамів було виділено тільки методом

мікробіологічного дослідження (*S. aureus* (n=5), *P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumonia* (n=3), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)), 15 – тільки методом ПЛР (*S. pneumoniae* (n=13), *N. meningitides* (n=2), 4 – обома методами одночасно (*S. pneumoniae* (n=4)).

Треба звернути увагу на те, що пневмокок методом ПЛР виділювався у всіх випадках його загального виявлення, а мікробіологічним – тільки у 4 (23,5%) із 17 випадків. Іншими перевагами методу мультиплексної ПЛР були низька вибагливість до кількості харкотиння, отримання результату протягом доби та можливість верифікації внутрішньоклітинних збудників. Втім, неможливість виявлення Гр(-) мікроорганізмів, відсутність інформації про чутливість патогена до антибактеріального препарату, можливість хибно-позитивних результатів виступили основними недоліками методу. Таким чином, зіставлення різних методів ідентифікації респіраторних збудників не має чинності, тоді як розумний вибір та їхня комбінація виходять на перший план у край тяжких хворих на негоспітальну пневмонію.

Що стосується чутливості респіраторних збудників до антибактеріальних препаратів у 4 хворих за результатами мікробіологічного дослідження харкотиння були ідентифіковані *S. aureus*, *S. pneumoniae*, чутливі лише до моксифлоксацину та карбопенемів, у 3 хворих за результатами мікробіологічного дослідження харкотиння було ідентифіковано *K. pneumoniae*, слабо чутливу тільки до іміпенему, що вказує на досить високий ступінь мультирезистентності респіраторних збудників ТНП без супутньої ВІЛ-інфекції.

Що стосується хворих групи 2 за результатами ідентифікації збудника виявити етіологічний фактор вдалось у 100% випадків. Абсолютно переважала пневмонія, що викликана *P. jirivecii* (n=9), тоді як у інших осіб (n=2) було ідентифіковано пневмокок (рис. 4).

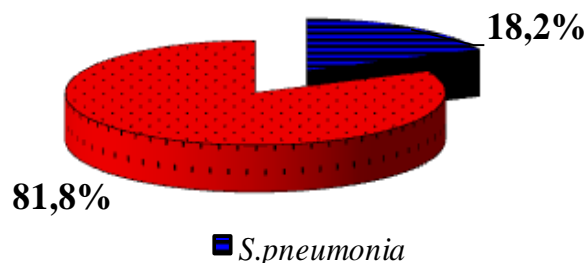


Рис. 4. Структура ідентифікованих збудників у хворих групи 2

При цьому всі штами були виявлені у харкотинні (у 2 (18,2%) випадках) та індукованому харкотинні (у 9 (81,8%) випадках) за допомогою методу ПЛР, перевагами якого була можливість верифікації атипичного опортуністичного збудника *P. jirivecii*, причому у невеликих за кількістю зразках біологічного матеріалу.

Висновки

1. Не дивлячись на те, що, у структурі ідентифікованих бактеріальних збудників усіх хворих на ТНП Дніпропетровського регіону переважає пневмокок, нами було виявлено високу частоту опортуністичної (у 11 (17,7%) випадках) та мультирезистентної Гр(-) (у 10 (16,1%) випадках) флори.

2. У зв'язку з високим ризиком атипової та Гр(-) етіології ТНП ідентифікація респіраторних збудників повинна бути включена до обов'язкових заходів діаг-

ностичного алгоритму при цій патології, сприяти чому може індукція харкотиння та забір змивних вод під час санаційної чи діагностичної бронхоскопії.

3. «Золотим стандартом» ідентифікації респіраторних збудників у хворих на ТНП залишається мікробіологічне дослідження з виявленням чутливості до антибактеріальних препаратів, втім при неможливості його проведення, а також при підозрі на наявність атипичних збудників ефективним орієнтовним, проте швидким, методом є використання ПЛР-дослідження харкотиння.

4. У ВІЛ-інфікованих хворих на ТНП на перше місце при верифікації етіологічного збудника виходить ПЛР-дослідження індукованого харкотиння.

Література

1. Авдеев С. Н. Тяжелая внебольничная пневмония / С. Н. Авдеев, А. Г. Чучалин // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9. – № 5. – С. 1–11.
2. Аверьянов А. В. Антибактериальная терапия внебольничной пневмонии тяжелого течения / А. В. Аверьянов // Участковый терапевт. – 2008. – № 4. – С. 2–3.
3. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Пособие для врачей / А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, Р. С. Козлов. – Москва, 2010. – 146 с.
4. Гемелюк И. Ю. Клинико-иммунологические особенности и антибактериальная химиотерапия пневмоний при вторичных иммунодефицитных состояниях : автореф. ...канд. мед. н. – Самара, 2005. – 19 с.
5. Иванчик Н. В. Этиология фатальных внебольничных пневмоний у взрослых / Н. В. Иванчик, С. Н. Козлов, С. А. Рачина // Пульмонология. – 2008. – № 6. – С. 53–58.
6. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Губенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4. МедиаСфера, 2002. – 312 с.
7. Нейко Є. М. Деякі імунологічні критерії звичайного та затяжного перебігу пневмоній / Є. М. Нейко, М. М. Островський // Український пульмонологічний журнал – 2002. – № 2. – С. 32–34.
8. Новиков Ю. К. Грамотрицательные пневмонии / Ю. К. Новиков // Русский медицинский журнал. – 2004. – № 2. – С. 7–9.
9. Нудьга А. Н. Тяжелые пневмонии с фатальным исходом (анализ течения, особенности) / А. Н. Нудьга, Е. А. Ковалева, В. А. Галинская // Медицина неотложных состояний. – 2006. – №5(6). – С. 10–16.
10. Особенности течения, диагностики и лечения пневмонии при наличии модифицирующих факторов : практическое пособие / Т. А. Перцева [и др.]. – Киев, 2012. – 69 с.
11. Пневмоцистоз – актуальная иммунодефицит-ассоциированная инфекция (эпидемиология, клиника, диагностика и лечение) : методическое пособие / Н. В. Каражас, Т. Н. Рыбалкина, М. Н. Корниенко. – Москва, 2010. – 51 с.
12. Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія» : Наказ МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. – Київ, 2007. – 146 с.
13. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
14. Синопальников А. И. Новые рекомендации по ведению взрослых пациентов с внебольничной пневмонией: диагностика, оценка степени тяжести, антибактериальная терапия, профилактика (По материалам рекомендаций Американского торакального общества, 2001 г.) / А. И. Синопальников, Л. С. Страчунский, О. В. Сивая // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 4. – С. 355–370.
15. Фещенко Ю. І. Негоспітальна пневмонія у дорослих осіб: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибактеріальна терапія (проект клінічних настанов) / Ю. І. Фещенко, О. А. Голубовська, К. А. Гончаров // Український пульмонологічний журнал. – 2012. – № 4. – 132 с.
16. Яковлев С. В. Тяжелая внебольничная пневмония. В кн.: Пневмония : Под ред. А. Г. Чучалина, А. И. Синопальникова, Н. Е. Чернеховской. – Москва, 2002. – 266 с.
17. American Thoracic Society. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: Diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 1730–1754.
18. An emergency department based randomized trial of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage for early pathogen identification in severe community-acquired pneumonia / R. Rodriguez [et al.] // The Journal of Emergency Medicine. – 2001. – Vol. 38. – P. 357–363.
19. Cohen J. HIV Infections and AIDS Deaths Dropping, But Epidemic Still Dauntingby / J. Cohen // Science Insiderer. – 2012. – Vol. 5. – P. 12–15.
20. El-Solh A. A. Etiology of severe pneumonia in the very elderly / A. A. El-Solh, P. Sikka, F. Ramadan // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 645–651.
21. Luna C. M. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome in teaching hospital in Argentina / C. M. Luna, A. Famiglietti, R. Absi // Chest. – 2000. – Vol. 118. – P. 1344–1354.
22. Pozzetto B. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections / B. Pozzetto // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2010. – Vol. 8(3). – P. 251–253.

ENGLISH VERSION: FEATURES OF ETIOLOGY AND PATHOGEN IDENTIFICATION IN PATIENTS WITH SEVERE COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA*

Pertseva T., Kireeva T., Bielosludtseva K.

State establishment "Dnipropetrovsk medical academy of the Health Ministry of Ukraine",

The importance of identifying the causative agent in patients with severe community-acquired pneumonia (CAP) is out of doubt. Different data on the leading role of respiratory pathogens in the etiology of severe CAP are presented, as well as the roles of the various methods of their identifying the aim of study was to determine the spectrum of pathogens of severe CAP, as well as the effectiveness of the use of such non-culture method of sputum as multiplex PCR. To do this 62 patients with verifiable severe CAP were examined. Identification of the etiologic pathogen and HIV status for all patients were performed after hospitalization before prescribing of antibiotic therapy. According to the study it was found that due to a combination of two methods of sputum diagnostic etiology of severe CAP was identified in 61.2% of all cases. There were designated 3 cohorts of patients: with identified Gr(+) bacteria, with identified Gr(-) bacteria and with identified opportunistic flora. According to the analysis of the structure of bacterial pathogens from all identified patients with severe CAP pneumococcus prevails, we revealed a high frequency of opportunistic and multiresistant Gr(-) flora. Due to the high risk of atypical and Gr(-) flora as respiratory pathogens of severe CAP identification of its etiology should be included in the list of mandatory measures in diagnostic algorithm at this pathology. "Gold standard" for identification of respiratory pathogens in patients with severe CAP microbiological research with revealing sensitivity to antibiotics remains, but if it cannot be conducted, as well as by suspected atypical pathogens using of sputum PCR is an efficient approximate, but fast method.

Keywords: severe community-acquired pneumonia, etiology, pathogens

There is no doubt about relevance of management of patients with severe community acquired pneumonia (CAP) due to constant rise of its morbidity and mortality in our country and around the world [3, 9, 15, 17]. Because of constant increase of severe CAP in recent years, some researchers have attributed it most of all to changing of etiological patterns of the disease, namely to increase of the frequency in occurrence of staphylococci, Legionella and gram-negative (Gr (-)) are microorganisms that lead to more severe course of the disease [1, 2, 16].

According to the literature, the leading etiologic role in severe CAP play such microorganisms as *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (approximately 30% of cases), *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (1–15% of cases), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (7–8% of cases), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (10–15% of cases), the family of *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus*) (22% of cases) [1, 18]. Rarely severe CAP is caused by *Haemophilus influenza* (*H. influenza*) (4–5% of cases), atypical pathogens *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) (2–2.5% of cases), viruses (5% of cases) [20, 21]. The most common pathogens of fatal pneumonia are *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* (31.4, 28.6, 12.9 and 11.4% of all isolates respectively) [5].

In addition, there is a steady increase of pneumonia in patients suffering from various immunodeficiency states, not only due to the continuous increase in HIV-positive patients [19] but also due to conditions that lead to a reduction in the activity of cellular immunity (diabetes, alcoholism, cancer, etc.) [4, 7]. The most common causative agents of such severe CAP are *S. aureus*, *Streptococcus viridians*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus ryogenes*, *Streptococcus anhaemolyticus*, *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*), *Cytomegalovirus*, *Candida* fungi,

Aspergillus, viruses, *L. pneumophila*, *Mycobacterium avium-intercellulare*, *Enterobacteriaceae* [8, 10].

In view of the above, we want to draw attention to the importance of identifying the pathogen in patients with severe CAP for opportunities of individualization of antibiotic therapy (ABT). However, Russian experts in the field of pulmonology indicate that the etiology of severe CAP can not be determined in 40–60% of patients [1, 14]. Lack of productive cough in patients with weakened inhibition of cough reflex, inadequate requirements of biological material, widely irrational use of antibiotics in out-patient, violation of the rules for collecting, storing and shipping of specimens, long time diagnostic, the inability to identify intracellular pathogens are the most important reason for the negative results of microbiological studies of expectorant.

At the same time, there is evidence that in case of combination of modern diagnostic methods, identification of the causative agent of severe CAP can bring closer to 80% [2]. In the presence of severe CAP as a quick search of the etiological agent comes to the fore, it is important to introduce fast, versatile, highly specific methods for rapid diagnosis of respiratory pathogens into medical practice, which include the rapid testing of specimens using multiplex polymerase chain reaction (PCR) [22]. This method makes possible to detect in few hours common pathogens of severe CAP including intracellular microorganisms and *Pneumocystis* [11].

Given different data about the leading role of respiratory pathogens in the etiology of severe CAP, as well as the role of the various methods of their identifying the aim of the work was to determine the spectrum of pathogens in patients with severe CAP in our region, and efficiency of such method of nonculture sputum diagnostic as multiplexed PCR in patients of this category.

Materials and methods

We have examined 62 patients with verified (according to the criteria of the Order of the Ministry of Health of Ukraine №128 as of 19.03.2007 [12]) severe CAP, which

* To cite this English version: T. Pertseva, T. Kireeva, K. Bielosludtseva. Features of etiology and pathogen identification in patients with severe community acquired pneumonia - // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 30 -33.

accounted to the main group. All patients after admission before appointment of ABT underwent etiological agent identification and determination of HIV status, according to the results of which they were divided into groups and subgroups:

- group 1, which included 51 patient with severe CAP without HIV infection, divided into subgroups according to the etiological factor:

- subgroup A – 17 patients with severe CAP (mean age – $57,5 \pm 4,3$ years, men – 13 (76.5%)) with isolated Gr(+) bacteria;

- subgroup B – 10 patients with severe CAP (mean age – $50,2 \pm 5,2$ years, men – 7 (70.0%)) with isolated Gr(-) bacteria;

- group 2, which included 11 patients with severe CAP (mean age – $35,8 \pm 2,5$ years, men – 4 (36.4%)) with HIV infection.

Assessment of HIV status was performed by rapid testing of patients using CITO TEST HIV 1/2 ("Pharmas-co", Ukraine).

Identification of pathogens in sputum, induced sputum or bronchoalveolar washings performed by microbiological research material and method for determining bacterial DNA by PCR. For this spontaneous or induced sputum was carried in the morning on an empty stomach after pre-treatment of the patients teeth and rinsing the mouth with boiled water. Induction of sputum was carried out by prior inhalation of nebulized of hypertonic (3–5%) sodium chloride solution during 7–10 minutes, followed by rinsing the mouth and sputum collection.

Collection of bronchoalveolar flush performed during diagnostic or sanation bronchoscopy. Delivery of diagnostic material in the laboratory was not more than 2 hours with material stored under normal conditions.

For the culture and identification of pathogenic causative agent in sputum we used classical culture media. The sensitivity of microorganisms was evaluated by disco-diffusion method.

Identification of DNA of *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *H. influenza*, *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *P. jirovecii* was performed by multiplex PCR using kits of series "Multy-Praym" ("YnterLabServys", Russia) for one-stage DNA amplification of *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenza*, for one-stage DNA amplification of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and by using specific primers to amplify DNA pAZ102E of *P. jirovecii* using bio-analyzer Agilent 2100 («Agilent Technologies", United States).

All patients gave written consent for research.

Statistical analysis of the results of research was carried out by the methods of biometric analysis, implemented in software packages EXCEL-2003 (№ 74017-641-9475201-57075) and STATISTICA 6.0 (№ 31415926535897) [6, 13].

Results and discussion

The study proved that due to the combination of two methods of sputum diagnostic the etiology of severe CAP was identified in 61.2% of cases, with apparent 3 cohorts of patients: with isolated Gr(+) bacteria, with isolated Gr(-) bacteria and isolated opportunistic flora (Fig. 1), which underlay the principle of patients' dividing into groups and subgroups.

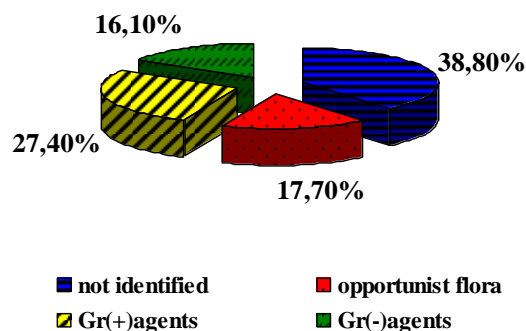


Fig. 1. Structure of identified pathogens in patients with severe CAP

As for the patients of group 1, among the 51 patients without HIV infection pathogens were identified in 27 (52.9%) cases (Table 1).

Table 1
Identified pathogens in patients of group 1, abs. (%)

Agent	Group 1 (n=51)
<i>S. aureus</i>	5 (18,5)
<i>S. pneumoniae</i>	12 (44,4)
<i>K. pneumoniae</i>	3 (11,1)
<i>P. aeruginosa</i>	3 (11,1)
<i>N. meningitidis</i>	2 (7,5)
<i>Acinetobacter</i>	1 (3,7)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,7)
<i>P. jirovecii</i>	-
<i>C. pneumoniae</i>	-
<i>M. pneumoniae</i>	-
<i>L. pneumophila</i>	-
Total	27

Thus in 17 (62.9%) patients included in subgroup A, Gr(+) bacteria (*S. pneumoniae* (n = 11), *S. aureus* (n = 6)) were identified (Fig. 2).

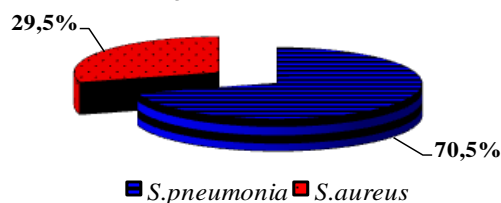


Fig. 2. Structure of identified pathogens in patients with severe CAP of subgroup A

Subgroup B included 10 (19.6%) patients in whom Gr(-) bacteria (*P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumoniae* (n=3), *N. meningitidis* (n=2), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)) were detected (Fig. 3).

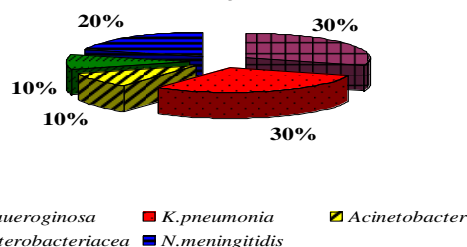


Fig. 3. Structure of identified pathogens in patients with severe CAP of subgroup B

According to the analysis of the structure of identified bacterial pathogens in 27 patients of group 1, it was found that almost in a half of cases *S. pneumoniae* was detected (Table 1). Attention is drawn by high frequency

of Gr(-) pathogens identification, which were diagnosed in 10 (37.0%) of cases.

The results about the superiority of pneumococcus, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* in the structure of the etiologic agents of severe CAP consistent with other data of domestic scientists, while the detection of *N. meningitides*, *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* as an etiologic factor needs discussion.

According to the literature, meningococcal DNA can be recovered by PCR in patients with nasopharyngeal bacteria carrier state of this pathogen that does not indicate the etiology of severe CAP. However, given the state of severe course in these patients and the effectiveness of ABT with high activity against Gr(-) flora, it can be argued that *N. meningitides* acted as the causative agent of severe CAP.

Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* can be considered as nosocomial infections, which joined in the taking of specimens. However, given that biological materials in these patients were collected before the use of respiratory support devices in disposable tableware, which almost eliminates contamination, we can assume that these organisms were also etiologic agents in these patients with severe CAP.

It should also be noted that no cases of atypical intracellular pathogens (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and *L. pneumophila*) by PCR were observed.

During the analysis of the diagnostic value of diagnostic methods of etiologic factors in patients with severe CAP that were used in this study, it was found that out of 27 strains of microorganisms that have been identified in patients of group 1, 8 strains were identified only by microbiological studies (*S. aureus* (n=5), *P. aeruginosa* (n=3), *K. pneumonia* (n=3), *Acinetobacter* (n=1), *Enterobacteriaceae* (n=1)), 15 strains – only by PCR (*S. pneumoniae* (n=13), *N. meningitides* (n=2), 4 strains – by both methods simultaneously (*S. pneumoniae* (n=4)).

It is necessary to point out that the pneumococcus was isolated by PCR in all cases of its overall detection and by microbiological – only 17 4 (23.5%) out of cases. Other advantages of the multiplex PCR were low intelligibility to the number of specimens, obtaining results within a day and the possibility of verification of intracellular pathogens. However, the inability to identify a lot of Gr(-) microorganisms, lack of information about pathogen susceptibility to antibiotics, the possibility of false-positive results were the main disadvantages of the method. Thus, a comparison of different methods for identification of respiratory pathogens has no effect, while the smart choice and their combination come to the fore in severe patients with CAP.

Regarding the sensitivity of respiratory pathogens to antibiotics in 4 patients the results of microbiological examination of sputum were identified *S. aureus*, *S. pneumonia* which sensitive only to moxifloxacin and carbopenems, in 3 patients the results of microbiological examination of sputum were identified as *K. pneumonia* which was weakly sensitive only to imipenem, indicating a fairly high degree of respiratory pathogens multiresistance in patients with severe CAP without HIV infection.

As for the patients in group 2 the results of the identification of the pathogen reveal the etiologic agent succeeded in 100% of cases. Absolutely dominated pneumonia caused by *P. jirivecii* (n=9), whereas others (n=2) were identified as pneumococcus (Fig. 4).

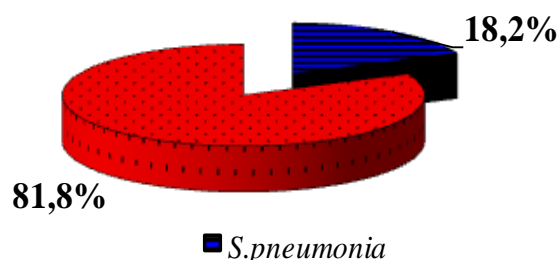


Fig. 4. Structure of identified pathogens in patients of group 2

Moreover, all strains were found in the sputum (in 2 (18.2%) cases) and induced sputum (in 9 (81.8%) cases) using PCR, the advantages of which was the possibility of verification atypical opportunistic pathogen *P. jirivecii* and in small number of samples of biological material.

Conclusions

1. In spite of the fact that *S. pneumoniae* dominated in the structure of all bacterial pathogens identified at patients with severe CAP in Dnipropetrovsk region, we found a high frequency of opportunistic (in 11 (17.7%) cases) and multiresistant Gr(-) (10 (16.1%) cases) flora.

2. Due to high risk of atypical and Gr(-) respiratory pathogens in patients with severe CAP identification of its etiology should be included in the mandatory measures of the diagnostic algorithm at this pathology, aided to sputum induction and flush water intake during sanation or diagnostic bronchoscopy.

3. "Gold standard" of respiratory pathogens identification in patients with severe CAP is microbiological research with identification of susceptibility to antibiotics, however with the inability of it, as well as by suspected atypical pathogens the use of sputum PCR is efficient approximate but rapid method.

4. PCR studies of induced sputum are on the first place in the verification of etiologic pathogen in HIV-infected patients with severe CAP.

References

1. Avdeev S. N. Tjazelajaja vnebol'nichnaja pnevmonija / S. N. Avdeev, A. G. Chuchalin // Russkij medicinskij zhurnal. – 2001. – T. 9. – № 5. – S. 1–11.
2. Aver'janov A. V. Antibakterial'naja terapija vnebol'nichnoj pnevmonii tjazhelogo techenija / A. V. Aver'janov // Uchastkovyj terapevt. – 2008. – №4 – S. 2–3.
3. Vnebol'nichnaja pnevmonija u vzroslyh: prakticheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniju i profilaktike. Posobie dlja vrachej / A. G. Chuchalin, A. I. Sinopal'nikov, R. S. Kozlov. – Moskva, 2010. – 146 s.
4. Gemeljuk I. Ju. Kliniko-immunologicheskie osobennosti i antibakterial'naja himioterapija pnevmonij pri vtorichnyh immunodeficitnyh sostojanijah : avtoref. ...kand. med. n. – Samara, 2005. – 19 s.
5. Ivanchik N. V. Jetiologija fatal'nyh vnebol'nichnyh pnevmonij u vzroslyh / N. V. Ivanchik, S. N. Kozlov, S. A. Rachina // Pul'monologija. – 2008. – № 6. – S. 53–58.
6. Lapach S. N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskij issledovanijah s ispol'zovaniem Exel / S. N. Lapach, A. V. Gubenko, P. N. Babich. – K. : Morion, 2000. – 320 s. – ISBN 966-7632-16-4. MediaSfera, 2002. – 312 s.
7. Nejko E. M. Dejaki imunologichni kriterii zvichajnogo ta zatzajznogo perebigu pnevmonij / E. M. Nejko, M. M. Ostrovs'kij // Ukraïns'kij pul'monologichnij zhurnal – 2002. – № 2. – S. 32–34.
8. Novikov Ju. K. Gramotricatel'nye pnevmonii / Ju. K. Novikov // Russkij medicinskij zhurnal. – 2004. – № 2. – S. 7–9.
9. Nud'ga A. N. Tjzhelye pnevmonii s fatal'nym ishodom (analiz techenija, osobennosti) / A. N. Nud'ga, E. A. Kovačeva, V. A. Galinskaja // Medicina neotlozhnyh sostojanij. – 2006. – №5(6). – S. 10–16.

10. Osobennosti techenija, diagnostiki i lechenija pnevmonii pri nalichii modificirujushhih faktorov : prakticheskoe posobie / T. A. Perceva [i dr.]. – Kiev, 2012. – 69 s.
11. Pnevmoctoiz – aktual'naja immunodeficit-associirovannaja infekcija (jepidemiologija, klinika, diagnostika i lechenie) : metodicheskoe posobie / N. V. Karazhas, T. N. Rybalkina, M. N. Kornienko. – Moskva, 2010. – 51 s.
12. Pro zatverdzhennja klinichnih protokoliv nadannja medicinoj dopomogi za special'nistju «Pul'monologija» : Nakaz MOZ Ukraïni № 128 vid 19.03.2007 r. – Kiïv, 2007. – 146 s.
13. Rebrova O. Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnih programm STATISTICA / O. Ju. Rebrova. – M. : MediaSfera, 2002. – 312 s.
14. Sinopal'nikov A. I. Novye rekomendacii po vedeniju vzroslyh pacientov s vnebol'nichnoj pnevmonie: diagnostika, ocenka stepeni tjazhesti, antibakterial'naja terapija, profilaktika (Po materialam rekomendacij Amerikanskogo torakalnogo obshhestva, 2001 g.) / A. I. Sinopal'nikov, L. S. Strachunskij, O. V. Sivaja // Klinicheskaja mikrobiologija i antimmikrobnaja himioterapija. – 2001. – T.3. – № 4. – S. 355–370.
15. Feshhenko Ju. I. Negospital'na pnevmonija u doroslih osib: etiologija, patogenez, klasifikacija, diagnostika, antibakterial'na terapija (proekt klinichnih nastanov) / Ju. I. Feshhenko, O. A. Golubovs'ka, K. A. Goncharov // Ukraïns'kij pul'monologichnij zhurnal. – 2012. – № 4. – 132 s.
16. Jakovlev S. V. Tjazhelaja vnebol'nichnaja pnevmonija. V kn.: Pnevmonija : Pod red. A. G. Chuchalina, A. I. Sinopal'nikova, N. E. Chemehovskoj. – Moskva, 2002. – 266 s.
17. American Thoracic Society. Guidelines for the initial management of adults with community-acquired pneumonia: Diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 1730–1754.
18. An emergency department based randomized trial of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage for early pathogen identification in severe community-acquired pneumonia / R. Rodriguez [et al.] // The Journal of Emergency Medicine. – 2001. – Vol. 38. – P. 357–363.
19. Cohen J. HIV Infections and AIDS Deaths Dropping, But Epidemic Still Dauntingby / J. Cohen // Science Insiderer. – 2012. – Vol.5. – P. 12–15.
20. El-Solh A. A. Etiology of severe pneumonia in the very elderly / A. A. El-Solh, P. Sikka, F. Ramadan // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 163. – P. 645–651.
21. Luna C. M. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome in teaching hospital in Argentina / C. M. Luna, A. Famiglietti, R. Absi // Chest. – 2000. – Vol. 118. – P. 1344–1354.
22. Pozzetto B. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections / B. Pozzetto // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2010. – Vol. 8(3). – P. 251–253.

Матеріал надійшов до редакції 05.05.2014 р.

ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

© Бугаснко Н.С., Сергеева Т.А. *

УДК 616.98:578.828ВІЛ-167.1

ПРОБЛЕМА СНІД-ІНДИКАТОРНИХ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ*

Бугаснко Н.С., Сергеева Т.А. *

Міський центр профілактики і боротьби зі СНІД. м. Київ

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», м. Київ

В Киеве среди ВИЧ-положительных лиц отмечаются высокие уровни заболеваемости оппортунистическими инфекциями, которые занимают первое место в структуре вторичной СПИД-ассоциированной патологии – в среднем около 90 %. В 2006-2012 гг. среди оппортунистических инфекций наибольший удельный вес приходился на ТБ (71,65 %), затем бактериальные инфекции (12,07 %) и грибковые поражения (5,08 %). Бактериальные и грибковые инфекции чаще ассоциировались с половым путем передачи ВИЧ, туберкулез – с заражением при инъекционном потреблении наркотиков. У 57,1-59,0 % пациентов с сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ была терминальная стадия ВИЧ-инфекции, что подтверждалось низким уровнем CD4-лимфоцитов (<200 кл/мл); 61,4 % из них употребляли наркотические препараты инъекционным способом. У более 60 % лиц диагноз ВИЧ-инфекции устанавливался при наличии выраженного иммунодефицита и тяжелых оппортунистических инфекций, что ограничивало эффективность АРТ. Необходимо совершенствование медицинской помощи и наблюдения за ВИЧ-положительными лицами с акцентом на своевременном выявлении болезни.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, оппортунистические инфекции, туберкулез.

ВІЛ-інфекція не має власної чітко визначеної клінічної картини і, головним чином, представлена СНІД-асоційованими патологічними станами. Серед них суттєва роль належить опортуністичними інфекціями (ОІ) – вторинними захворюваннями, що розвиваються в осіб з імунodefіцитами. Частіше етіологічним чинником ОІ є умовно-патогенні збудники, котрі не викликають хвороби в імункомпетентних осіб, але вони можуть бути викликані і патогенними інфекційними агентами (наприклад, *M. tuberculosis*). У міру поглиблення ураження імунної системи у ВІЛ-позитивних осіб розвиваються захворювання, які включають в себе як ОІ, так і інші хвороби інфекційної та неінфекційної природи, які, в свою чергу, суттєво впливають на тривалість життя та смертність людей, які живуть з ВІЛ (ЛЖВ). З-поміж останніх особливе місце займає туберкульоз (ТБ), який на сьогодні розглядають не тільки як ВІЛ/СНІД-асоційовану, ВІЛ/СНІД-індикаторну, але й ВІЛ/СНІД-маркерну інфекцію серед певних контингентів населення [2, 5].

Туберкульоз залишається основною причиною смерті серед ЛЖВ. У глобальному масштабі за розрахунками на 2012 р. на ЛЖВ припадало 13 % (1,1 млн. осіб) з оціненої у 8,7 млн. кількості людей, в яких розвинувся ТБ. З числа 2,8 млн. хворих на ТБ, які пройшли тестування на маркери ВІЛ-інфекції у 2012 р., 20 % виявилися ВІЛ-позитивними [10]. У свою чергу, що ВІЛ-інфекція є найпотужнішим фактором ризику для ТБ і, більш того, призводить до його «вродження» [16].

У ряді країн (зокрема, в тих, що розвиваються або з перехідною економікою) найпоширенішою ОІ є ТБ, найближчі місця за ним посідають кандидоз ротової порожнини, герпетична інфекція (оперізуєчий лишай), криптококоз (криптококовий менінгіт), церебральний токсоплазмоз, цитомегаловірусна (ЦМВ) інфекція та ін. В розвинених країнах світу, завдяки широкому впровадженню антиретровірусної терапії (АРТ) та високоефективної АРТ (БААРТ), починаючи з середини 90-х років минулого століття, відбулось значне скорочення рівня ОІ серед ВІЛ-позитивних осіб та зміна спектру збудників інфекцій [9]. Цього року Coelho L. з колегами, проаналізувавши захворюваність на ОІ ВІЛ-позитивних осіб у різних країнах світу, оцінили, що з 1982 по 2008 р. рівні інцидентності пневмонії, викликані *Pneumocystis carinii*, в середньому зменшились у 2,0–15,6 разу, церебрального токсоплазмозу – у 1,2–8,0 разу; хвороби, пов'язаної з *Mycobacterium avium complex* – у 2,4–25,8 разу [17]. І ці дані є надзвичайно позитивними, оскільки свідчать про можливість контролювання ОІ у ВІЛ-позитивних осіб, водночас вказуючи на постійну проблему своєчасної діагностики ВІЛ-інфекції. Але існують суттєві відмінності щодо тягаря та спектру ОІ між країнами з високим рівнем доходів та з обмеженими ресурсами, і більшість доказових даних щодо зниження рівня інфекцій надходять саме з країн з розвинутою економікою, де раніше почали широко застосовувати БААРТ, і ВІЛ-позитивні особи мають вільніший доступ до специфічної діагностики та лікування [12, 14]. Проте, незважа-

* Цитування при атестації кадрів: Н.С. Бугаснко, Т.А. Сергеева. Проблема СНІД-індикаторних інфекційних хвороб // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 34–39

ючи на можливості ВААРТ, ОІ залишаються фактором підвищеного ризику хворобливості та смертності осіб з ВІЛ-інфекцією/СНІДом, і спектр збудників основних ОІ варіює у різних регіонах. Саме з цих міркувань необхідна ідентифікація домінуючих патогенів, відповідних за розвиток ОІ у розрізі окремих регіонів з метою належного лікування, догляду та менеджменту.

Мета дослідження. Оцінити рівні захворюваності на ОІ і визначити провідні СНІД-асоційовані інфекції серед ВІЛ-позитивних осіб у м. Києві; встановити основні фактори, що сприяють розвитку поєднаної патології ВІЛ-інфекції/ТБ.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на базі Міського центру профілактики і боротьби зі СНІД м. Києва (КМЦ СНІДу) за період 2005-2012 рр. В роботі використаний комплекс описово-оціночних та аналітичних прийомів епідеміологічного методу дослідження та методів математичної статистики. Для аналізу поширення СНІД-індикаторних захворювань серед пацієнтів КМЦ СНІДу були використані наступні матеріали офіційної реєстрації МОЗ України: форма звітності №2 – ВІЛ/СНІД, ф. №502-1/о – «Реєстраційна карта ВІЛ-інфікованої особи», ф. №502-2/о – «Повідомлення про зміни в Реєстраційній карті ВІЛ-інфікованої особи», ф. №025/о – «Медична карта амбулаторного хворого», ф. №003/о – «Медична карта стаціонарного хворого». Крім цього використовували оперативні епідеміологічні дані КМЦ СНІДу.

При статистичному опрацюванні результатів роботи користувались уніфікованими функціями програми Microsoft Office Excel. Динаміку захворюваності та багаторічні тенденції визначали методами найменших квадратів. Виразували відносний відсотковий показник та його середню похибку ($P \pm m_p$), 95% довірчий інтервал (95% ДІ). Силу та спрямованість зв'язків між явищами оцінювали шляхом обчислення коефіцієнта кореляції ($r \pm m_r$); достовірність різниці визначали за t -критерієм Ст'юдента; результати оцінювали на рівні достовірності не більше ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

В м. Києві, як і в цілому по Україні, в останні роки серед ВІЛ-позитивних осіб відмічаються високі рівні захворюваності на ОІ та інші СНІД-асоційовані хвороби. За період 2005-2012 рр. з-поміж ВІЛ-позитивних осіб, які знаходились під спостереженням у КМЦ СНІДу, в середньому лише 2,59 % (95% ДІ: 1,14 – 4,05) не мали означеної патології, і їх частка зменшувалась у динаміці. Біля 90 % вторинних захворювань (95% ДІ: 88,82 – 90,98) були представлені інфекційними, серед яких, у свою чергу, найбільша питома вага припала на туберкульоз – 71,65 % (95% ДІ: 67,67 – 75,64). Другою за рангом сходинку у переліку інфекційних хвороб пацієнтів КМЦ СНІДу посідали бактеріальні інфекції – у 2006-2012 рр. їх питома вага в середньому дорівнювала 12,07 % (95% ДІ: 8,95 – 15,19), потім грибові ураження – 5,08 % (95% ДІ: 1,94 – 8,23), токсоплазмоз мозку – 4,66 % (95% ДІ: 2,35 – 6,97), пневмоцистна пневмонія – 2,90 % (95% ДІ: 1,38 – 4,42), герпетична інфекція – 1,65 % (95% ДІ: 0,50 – 2,80), CMV-інфекція – 1,22 % (0,67 – 1,65) та інші ОІ – 0,76 % (95% ДІ: -0,52 – 2,04). Серед грибових інфекцій, крім дисемінованого кандидозу, щорічно реєструвалися позалегенова форма криптококової інфекції, яка часто за прогресування ВІЛ-інфекції набувала генералізованого перебі-

гу; зареєстровані випадки аспергильозу з ураженням легень. Бактеріальні інфекції у ВІЛ-позитивних осіб представлені переважно пневмоніями або сепсисом, основними етіологічними чинниками були пневмококи, стафілококи, стрептококи, рідше – ешерихії.

У динаміці реєстрації інфекцій в цілому не виявлено чіткої тенденції до суттєвої зміни питомої ваги тих чи інших ОІ за весь період спостереження (рис.). Разом з цим, відмітимо, що частка ТБ у загальній структурі СНІД-асоційованих інфекцій достовірно збільшилась з 2005 р. по 2012 р. ($p < 0,01$), проте середній багаторічний темп приросту свідчив про стабільну тенденцію (+0,07 %). Натомість, доля бактеріальних інфекцій зменшилась (темپ зниження -3,87 % – помірна тенденція; $p < 0,05$), але це не стосувалось пневмоцистної пневмонії, котра в більшості випадків діагностується у пацієнтів, в яких ВІЛ-інфекцію виявлено вже на IV клінічній стадії, тобто при пізньому зверненні за медичною допомогою: її питома вага збільшилась (+29,10 % – виражена тенденція), втім, це може бути пов'язано з налагодженням діагностики. Достовірно зменшилась питома вага грибових уражень в загальній структурі ОІ (темп зниження -23,41 % – тенденція виражена; $p < 0,05$). Щодо інших інфекційних захворювань, то різниця між порівнюваними відносними показниками не сягнула статистично значимого рівня.

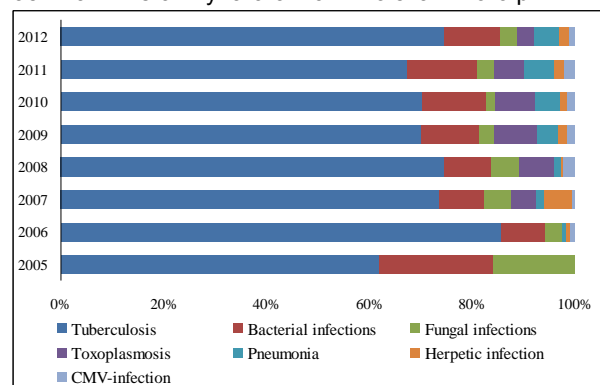


Рис. Структура СНІД-асоційованих інфекцій у ВІЛ-позитивних осіб за весь період спостереження, 2005-2012 рр.

Результатами оперативного епідеміологічного аналізу 2013 р. встановлено, що за винятком ТБ, всі інші ОІ асоціювалися переважно із статевим (частіше при гетеросексуальних контактах) шляхом передачі ВІЛ: бактеріальні інфекції – 47,7 проти 40,5 % випадків інфікування штучним парентеральним шляхом, ЦМВ-інфекція – 75,0 проти 25,0 % ($p < 0,001$), герпетична інфекція – 100 %, кандидоз – 54,5 проти 36,4 %, криптококоз – 66,7 проти 0 %, пневмоцистна пневмонія – 63,6 проти 36,4 % ($p < 0,01$), токсоплазмоз мозку – 75,0 проти 25,0 % ($p < 0,05$). Лише у 2-х випадках ОІ (кандидоз та криптококоз) шлях передачі ВІЛ встановити не вдалось; 5 випадків бактеріальних інфекцій (11,9 %) були пов'язані з передачею збудника від матері до дитини.

Клінічна діагностика ОІ у ВІЛ-позитивних хворих ускладнена, оскільки їх основні прояви (астенічний синдром, лихоманка, лімфаденопатія, гепатоспленомегалія) часто розцінюються як ознаки прогресування основного захворювання. Широкий діапазон клінічної маніфестації і часте переважання інапарантних інфекційного процесу визначають специфіку діагностики цієї групи інфекцій, висуваючи на перше місце лабо-

раторні методи і визначення провідних діагностичних критеріїв.

Обговорюючи представлені дані, слід відмітити, що вони значно відрізняються від наведених в літературі матеріалів з розвинених і навіть не дуже розвинених країн світу у бік перевищення рівнів інфікованості збудниками ОІ. Так, в роботі лікарів із США показано, що серед дорослих осіб з вперше виявленими випадками СНІДу 27,4 % пацієнтів мали принаймні одну ОІ і найчастіше пневмоцистну пневмонію – 12,2 % та туберкульоз – 5,3 % [6]. При визначенні провідної опортуністичної патології ВІЛ-позитивних осіб у Непалі 30,4 % припадало на туберкульоз, 14,3 % – на кандидоз, по 3,6 % – на пневмоцистну пневмонію та криптококові інфекції [13]. Серед ВІЛ-позитивних пацієнтів у Тайвані останнім часом частіше реєструвалися кандидоз, пневмоцистна пневмонія та туберкульоз, і паралельно з розширенням ВААРТ кількість випадків цих інфекцій суттєво зменшувалась [9]. За даними з Польщі, через п'ять років після запровадження ВААРТ знизилася захворюваність на СНІД, а найпоширенішими ОІ серед ВІЛ-позитивних осіб стали грибові інфекції та ТБ [14]. Тобто, на сьогодні ми маємо картину, майже характерну для країн Суб-Сахарської Африки та Південно-Східної Азії у період, що передував широкому впровадженню АРТ.

Наведені вище матеріали свідчать про те, що на сьогодні в Україні в цілому та м. Києві зокрема найсерйознішою СНІД-асоційованою хворобою є ТБ, котрий в ході клінічного розвитку ВІЛ-інфекції виникає раніше,

ніж інші ОІ, сприяє більш швидкому розвитку і прогресуванню хвороби, формуванню мультирезистентних форм, високій смертності ВІЛ-позитивних пацієнтів. Останніми роками проблема ТБ у поєднанні з ВІЛ-інфекцією/СНІДом набула для мешканців м. Києва загрозливого характеру. Однією з основних негативних тенденцій епідемії ВІЛ-інфекції і СНІДу в місті є зростання числа нових випадків захворювання на поєднану патологію ВІЛ-інфекція/ТБ. Так, якщо до 2000 р. зустрічались лише поодинокі випадки поєднаної інфекції, у 2005 р. було офіційно зареєстровано 39 пацієнтів з ВІЛ-інфекцією/ТБ, то в 2012 р. їх кількість збільшилась майже в 10 разів (табл.).

Оцінюючи інтенсивність епідемічного процесу поєднаної патології, необхідно відмітити такий вкрай несприятливий фактор, як швидкий темп зростання кількості випадків ВІЛ-інфекції/ТБ в м. Києві – середній багаторічний темп приросту за 2005-2013 рр. дорівнював +14,1 % (виражена тенденція). При цьому виявлено недостатній протилежний кореляційний зв'язок у динаміці захворюваності населення міста на активний ТБ із захворюваністю на конфекцію ВІЛ/ТБ ($r = -0,38$), але прямий середньої сили коефіцієнт кореляції із захворюваністю на ВІЛ-інфекцію ($r = +0,63$, $m_r = 0,21$). Це дозволяє констатувати, що у зростанні кількості ВІЛ-позитивних осіб з ТБ в місті найбільший внесок належить саме ВІЛ-інфекції. Згідно з даними літератури, у ЛЖВ активний ТБ розвивається у 6-50 разів частіше, ніж в осіб, не інфікованих ВІЛ [18].

Таблиця
Деякі показники інтенсивності епідемічного процесу ВІЛ-інфекції, туберкульозу та поєднаної інфекції ВІЛ/ТБ у м. Києві (2005-2013 рр.)

Показники \ Роки	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Кількість уперше виявлених випадків ВІЛ-інфекції (абс. число)	1022	1146	1183	1258	1094	1077	1269	1302	1405
Захворюваність на ВІЛ-інфекцію (на 100 тис. населення)	39,1	42,4	43,4	46,8	40,0	39,4	45,4	46,1	49,0
Кількість уперше виявлених всіх форм активного ТБ (абс. число)	1228	1403	1256	1280	1023	950	1073	1143	1473
Захворюваність на ТБ (на 100 тис. населення)	46,8	52,9	46,9	47,4	37,6	34,6	38,9	41,2	51,8
Кількість уперше зареєстрованих випадків ВІЛ/ТБ (абс. число)*	39	107	179	226	241	230	284	309	302
Захворюваність на ВІЛ/ТБ (на 100 тис. населення)	1,4	4,0	6,6	8,2	8,7	8,2	10,1	11,0	10,5

*за даними форми №2 – ВІЛ/СНІД

Як видно з матеріалів таблиці, у 2012 р. ТБ було діагностовано у 309 хворих на СНІД, що становило 67,7 % від усіх випадків СНІДу в місті, у тому числі: 231 випадок легеневого – ($74,8 \pm 2,5$) % та 78 випадків позалегенового ТБ – ($25,2 \pm 2,5$) %. 3-поміж позалегенових форм переважав ТБ нервової системи (туберкульозний менінгоенцефаліт) – ($9,7 \pm 3,4$) % і периферичних лімфовузлів – ($8,1 \pm 3,1$) %; у 0,9 % хворих діагностовано ТБ кісток та суглобів. Серед ВІЛ-позитивних осіб з вперше в житті встановленим діагнозом ВІЛ-інфекція/ТБ у ($30,0 \pm 2,6$) % осіб виявлено бактеріовиділення *M. tuberculosis*.

У 2013 р. вперше за період спостереження зафіксовано деяке зменшення рівня захворюваності на ТБ серед ВІЛ-позитивних осіб у столиці попри зростання захворюваності, як на ВІЛ-інфекцію, так і на ТБ в цілому серед населення міста. Як і в попередньому році, пропорція осіб з конфекцією ВІЛ/ТБ серед ВІЛ-позитивних пацієнтів була значною – 63,8 % (по Україні – 51,9 %), але намітилася тенденція до зменшення питомої ваги хворих на ТБ серед пацієнтів з вперше встановленим діагнозом СНІД (річний темп зниження – -5,9%). Порівняно з попереднім роком, серед загального числа хворих, які перебувають під наглядом в КМЦ СНІДу, дещо збільшилась кількість осіб з леге-

невими формами ТБ – $(79,8 \pm 2,3) \%$ і, відповідно, зменшилась пропорція ВІЛ-позитивних пацієнтів з позалегеновими формами – $(20,2 \pm 2,3) \%$. Серед останніх, як і в минулому році, переважав туберкульозний менінгоенцефаліт, ТБ периферичних лімфовузлів, кісток та суглобів. Збільшилось число хворих з бактеріовиділенням *M. tuberculosis* – майже половина осіб з вперше в житті встановленим діагнозом ВІЛ-інфекція/ТБ.

Для порівняння: у Казахстані ТБ займає також перше місце серед ОІ при ВІЛ-інфекції, проте складає лише 16 % від загальної кількості зареєстрованих ВІЛ-позитивних осіб [1].

Вікова структура та гендерні ознаки в групі пацієнтів з конфекцією ВІЛ/ТБ суттєво не відрізнялись від таких у загальній групі ВІЛ-позитивних осіб: у 2012 р. 69,5 % становили чоловіки та 30,4 % жінки. У віковому розподілі найбільша питома вага припадала на пацієнтів віком 25-49 років – 93,8 %; 2,6 % хворих належали до вікової групи 18-24 роки, 3,5 % – 50 років і більше. Тенденції у віковій структурі, та гендерних ознаках пацієнтів з коінфекцією ВІЛ/ТБ у 2013 р. також були подібними до загальної групи ВІЛ-позитивних осіб, але дещо зменшилась питома вага чоловіків (до 64,4 %), в той час як доля жінок збільшилась (33,6 %). Даний факт ми розцінюємо як несприятливу ознаку, яка підтверджує тенденцію до більш активного залучення в епідемічний процес жінок [4]. За віком, як і в попередньому році, більшість припадала на осіб 25-49 років.

За матеріалами 2012 р., у структурі шляхів передачі ВІЛ у пацієнтів з конфекцією ВІЛ/ТБ домінував штучний парентеральний при ін'єкціях наркотичних речовин, який був визначений для 230 осіб, в той час як статевим шляхом інфікувалися 79 пацієнтів – $(74,4 \pm 2,5) \%$ проти $(25,6 \pm 2,5) \%$ ($p < 0,01$). У 2013 р. передача ВІЛ у коінфікованих осіб також асоціювалася переважно з «ін'єкційним» шляхом передачі – у 198 проти 131 осіб, які заразилися при сексуальних контактах з ВІЛ-позитивними особами – відповідно, $(60,0 \pm 2,7) \%$ і $(39,7 \pm 2,7) \%$. Але різниця, порівняно з 2012 р., дещо зменшилась і не була достовірною, що підтверджує загальну тенденцію до початку перерозподілу домінуючих шляхів інфікування ВІЛ у місті з парентерального на статевий [3]. У 1-ї особи (0,3 %) передача ВІЛ відбулась від матері до дитини.

У 2012 р. у 57,1 % пацієнтів з діагнозом ВІЛ-інфекція/ТБ, в яких визначали рівень CD4-лімфоцитів ($n = 293$), їх кількість була меншою за 200 кл/мл, що є підтвердженням термінальної стадії ВІЛ-інфекції. За результатами досліджень 2013 р., серед таких хворих число осіб з термінальною стадією ВІЛ-інфекції (за критерієм CD4+) збільшилось до $59,0 \pm 2,9) \%$. При цьому, у $(16,0 \pm 2,1) \%$ кількість клітин CD4+ була у межах 50-100 кл/мл, а у $(25,9 \pm 2,6) \%$ – < 50 кл/мл. При цьому відомо, що кількість CD4-лімфоцитів є «сурогатним маркером», який відображає ймовірність розвитку інших ОІ.

Найбільша кількість хворих з ВІЛ/ТБ у термінальній стадії ВІЛ-інфекції була представлена СІН – $(61,4 \pm 2,8) \%$; $(34,8 \pm 2,7) \%$ інфікувалися ВІЛ внаслідок гетеросексуальних контактів з ВІЛ-позитивними особами, а решта $(3,8 \pm 1,1) \%$ – гомосексуальних контактів. А, як відомо, вживання ін'єкційних наркотиків підсилює негативний вплив ВІЛ на імунну систему (також як і коінфекція вірусами гепатитів В і С, інші поєднані інфекції).

У 2011 р. в КМЦ СНІДу було проведено операційне дослідження з метою визначення місця туберкульозу в структурі летальності серед ЛЖВ на базі аналізу 150 медичних карт померлих протягом року ВІЛ-позитивних осіб. В результаті дослідження встановлено, що значна частка померлих – $(75,3 \pm 3,5) \%$ – інфікувалися ВІЛ внаслідок вживання ін'єкційних наркотиків; $(55,3 \pm 4,1) \%$ осіб були взяті під медичний нагляд в IV стадії ВІЛ-інфекції, а $(23,3 \pm 3,5) \%$ мали III стадію хвороби; $(19,3 \pm 3,2) \%$ пацієнтів прожили менше 1 місяця після взяття на облік; у $(68,0 \pm 3,8) \%$ осіб ТБ було діагностовано прижиттєво, з них $(60,7 \pm 4,0) \%$ прожили менше 1 року з моменту взяття на облік; $(12,0 \pm 2,7) \%$ з числа померлих отримували хіміо-профілактику ТБ ізоніазидом. Серед померлих з конфекцією ВІЛ/ТБ у $(44,0 \pm 4,1) \%$ діагностовано легеновий, $(10,0 \pm 2,4) \%$ пацієнтів хворіли на міліарний та позалегенову форми ТБ; у $(2,0 \pm 1,1) \%$ осіб визначений мультирезистентний ТБ, а у $(32,0 \pm 3,8) \%$ пацієнтів ТБ було діагностовано вперше в житті; $(34,7 \pm 3,9) \%$ пацієнтів отримували АРТ. Залежно від стадії ВІЛ-інфекції, середня тривалість життя хворих з конфекцією ВІЛ/ТБ від моменту взяття на диспансерний облік в середньому становила: в I стадії – 4,3 роки, в II стадії – 3,1 роки, в III стадії – 2,3 роки, в IV стадії – 5,6 місяців.

За статистичними даними (форма №33-здоров.), кількість хворих на ТБ, померлих від хвороби, зумовленої ВІЛ в м. Києві збільшується, як в абсолютних цифрах, так і у відносних показниках. Починаючи з 2006 р. і по 2013 р. їх число в місті зросло з 67 до 99 – з 2,5 до 3,5 на 100 тис. населення з середнім багаторічним темпом приросту $+5,27 \%$ (виражена тенденція), а темп приросту кількості померлих у 2013 р., порівняно з 2012 р., склав $+29,6 \%$. За наявності ТБ у ВІЛ-позитивних пацієнтів надзвичайно високі рівні смертності пов'язані з несвоєчасною діагностикою і неадекватним лікуванням ТБ, множинною і широкою лікарською стійкістю *M. tuberculosis*. Відповідно до матеріалів форми №2 (ВІЛ/СНІД), у 2013 р. 14,0 % хворих померли безпосередньо від ТБ, в той час як переважна більшість $(76,9 \%)$ – внаслідок конфекції і біля 9,1 % – через причини, не пов'язані з ВІЛ-інфекцією/СНІДом (передозування наркотиків, самогубство, нещасні випадки тощо). За даними фахівців Павлодарського обласного центру профілактики і боротьби зі СНІД (Республіка Казахстан), ТБ послугував безпосередньо причиною смерті для 40,2 % коінфікованих осіб, а тривалість життя при поєднаній інфекції становила: до року – 40 %, до 2-х років – 28,8 %, до 3-х років – 11,9 %, до 5-ти років 3,4 %, 6-8 років – 5,1 % [1].

АРТ – важливіший компонент менеджменту ВІЛ/ТБ, що дозволяє зменшити ризик смертності у пацієнтів з коінфекцією на 64-95 % [15]. Крім того, специфічна терапія також відіграє велику роль у попередженні коінфекції, зменшуючи ризик її розвитку в середньому на 67 % [8]. За даними літератури, в теперішній час захворюваність ВІЛ-позитивних осіб на ОІ, у тому числі на ТБ, в основному пов'язана із пізньою діагностикою та/або презентацією АРТ, що розглядають як один з найбільш складних аспектів епідемії ВІЛ-інфекції [7, 11]. Не слід також забувати про відсутність або низьку прихильність до терапії, що призводить до вірусологічних невдач та прогресування захворювання. З відсутністю прихильності до терапії асоціюються такі фактори, як низький рівень освіти,

молодий вік, безробітний статус, алкоголізм, вживання наркотичних речовин, тобто, головним чином, соціально-економічні чинники. І, нарешті, суттєвим фактором є множинна стійкість до противірусних препаратів.

Незважаючи на постійне розширення доступу до специфічного лікування в Україні та м. Києві, ОІ залишаються основною причиною летальних наслідків серед ВІЛ-позитивних осіб. Високі рівні захворюваності та смертності у пацієнтів із ОІ мають свої причини: значна кількість ВІЛ-позитивних пацієнтів, не знаючи про свій інфекційний статус, звертаються за медичною допомогою пізно, знаходячись в дуже важкому стані, коли ОІ вже є індикаторами хвороби. На сьогоднішній день в місті у понад 60 % осіб діагноз ВІЛ-інфекції встановлюється при наявності вираженого імунodefіциту та важких ОІ. Разом з цим, за даними літератури, пізнє виявлення ВІЛ-інфекції (наприклад, приблизно за 6 міс. до діагностування СНІДу) підвищує ризик приєднання ОІ у 3,5 разу, порівняно з особами, яких виявили раніше, і яким була своєчасно розпочата відповідна терапія [6]. За даними аналізу випадків вперше діагностованого ТБ у 2012-2013 рр. встановлено, що ризик його розвитку у хворих на ВІЛ-інфекцію найменший за умови їх медичного нагляду, а пізня діагностика ВІЛ-інфекції в більшості випадків призводить до захворювання на ТБ.

ВІЛ-позитивні пацієнти перебуваючи під наглядом в Центрі СНІДу не завжди отримують АРТ по ряду причин (низька прихильність, психосоціальні фактори та ін.); не всі особи, які отримують АРТ, можуть досягти адекватної вірусологічної і імунологічної відповіді.

Підсумовуючи результати роботи, вважаємо за доцільне навести нещодавні дані міжнародних експертів: серед 41 країни з важким тягарем ВІЛ-інфекції у поєднанні з ТБ у 2004-2012 рр. Україна (поруч із Анголою, Бразилією, Конго, Індонезією, Лесото, Мозамбіком, Сьєра Леоне, Південною Африкою, Суданом, Того, В'єтнамом та деякими іншими) посідала місце в останній третій групі за показником зниження кількості смертей, пов'язаних з ТБ, серед ЛЖВ (менше 25 %). В той же час, за глобальною метою, до 2015 р. необхідно зменшити кількість смертей у ЛЖВ від ТБ не менше, ніж удвічі (< 250000). Але закінчити варто більш оптимістичними даними – у зазначеному переліку пріоритетних країн лише чотири, у тому числі Україна, у 2012 р. досягли охоплення АРТ серед ВІЛ-позитивних осіб, хворих на ТБ, на рівні не менше 50 % [10].

Висновки

1. В м. Києві в останні роки серед ВІЛ-позитивних осіб відмічаються високі рівні захворюваності на ОІ, на долю яких припадає не менше 90 % від всієї СНІД-асоційованої вторинної патології.

2. Туберкульоз посідає перше місце серед ОІ у ВІЛ-позитивних осіб і в 2012-2013 рр. складав понад 65 % серед загальної кількості зареєстрованих хворих з новими випадками ВІЛ-інфекції. Найчастішою формою ТБ у коінфікованих осіб є легенева; з-поміж позалегенових форм переважає туберкульозний менінгоенцефаліт, ТБ периферичних лімфовузлів, кісток та суглобів. Збільшується кількість хворих з бактеріовиділенням *M. tuberculosis*.

3. В структурі інших ОІ провідні місця посідають бактеріальні інфекції (12,07 %) грибкові ураження (5,08 %), токсоплазмоз мозку (4,66 %), пневмоцистна

пневмонія (2,90 %) герпетична інфекція (1,65 %), ЦМВ-інфекція (1,22 %).

4. Встановлені протилежні тенденції в динаміці захворюваності на ВІЛ-інфекцію/ТБ та ТБ серед населення міста та односпрямованість розвитку епідемічного процесу поєднаної патології ВІЛ/ТБ та ВІЛ-інфекції.

5. Понад 60 % хворих на ВІЛ-інфекцію/ТБ звертаються за медичною допомогою на пізніх стадіях розвитку інфекційного процесу. У 57,1-59,0 % пацієнтів з діагнозом ВІЛ-інфекція/ТБ кількість CD4-лімфоцитів не перевищує 200 клітин/мл, що є підтвердженням термінальної стадії ВІЛ-інфекції. Найбільша кількість хворих з ВІЛ/ТБ у термінальній стадії ВІЛ-інфекції представлена СІН (61,4 %).

6. З метою своєчасної діагностики та лікування ТБ необхідне вдосконалення медичної допомоги та спостереження за ВІЛ-позитивними особами. Наріжним каменем залишається своєчасне виявлення хвороби.

Перспективи подальших досліджень

Необхідна подальша робота щодо вдосконалення системи епідеміологічного нагляду за ОІ у ВІЛ-позитивних осіб на регіональних рівнях з урахуванням комплексу складових, таких як територіальна характеристика епідемічного процесу, імунологічні особливості пацієнтів, вірусне навантаження тощо. Окремого розвитку заслуговують дослідження, спрямовані на визначення епідеміологічної ролі хворих як джерел збудників подвійної інфекції.

Література

1. Алшинбаева Г.У. ВІС-інфекция в сочетании с туберкулезом / Г.У. Алшинбаева, А.Ш. Сергалинба, М.Е. Сорокина // Актуальные вопросы инфекционной патологии / Под ред. В.М. Семенова. – Материалы Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням (Витебск, 5-6 июня 2008 г.). – Витебск, 2008. – Т. 1. – С. 35-36.
2. Беляков Н.А. Вирус иммунодефицита человека – медицина / Н.А.Беляков, А.Г.Рахманова. – Санкт-Петербург. – 2011. – С. 190-286.
3. Бугаєнко Н.С. Еволюція епідемічного процесу ВІЛ-інфекції в мегаполісі (на прикладі м. Києва) / Н.С. Бугаєнко, Т.А. Сергеева // Проблеми військової охорони здоров'я. – 2013. – Випуск №37. – С. 267-276.
4. Вивчення поширеності ВІЛ-інфекції серед уразливих груп населення в м. Києві за результатами дозорних епідеміологічних досліджень / Н.С. Бугаєнко, Т.А. Сергеева, О.В. Юрченко, Ю.В. Круглов // Профілактична медицина. – 2012. – №2. – С. 16-23.
5. Спектр и частота оппортунистических заболеваний у больных ВІС-инфекцией / Е. Голохвастова, С. Царенко, Н. Литвинова [и др.] // Врач. – 2012. – С. 26-30.
6. AIDS-defining opportunistic illnesses in the HAART era in New York City / Hanna D.B., Gupta L.S., Jones L.E. [et al.] // AIDS Care. – 2007. – Vol. 19 (2). – P. 264-272.
7. AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study / K. Buchacz, R.K. Baker, F.J. Palella [et al.] // AIDS. – 2010. – Vol. 24 (10). – P. 1549-1559.
8. Antiretrovirals and isoniazid preventive therapy in the prevention of HIV-associated tuberculosis in settings with limited health-care resources / Lawn S.D., Wood R., De Cock K.M. [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 489-498.
9. Changes in the clinical spectrum of opportunistic illnesses in persons with HIV infection in Taiwan in the era of highly active antiretroviral therapy / Sun H.Y., Chen M.Y., Hsieh S.M. [et al.] // Jpn. J. Infect. – Dis. 2006. – Vol. 59 (5). – P. 311-316.
10. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013 / WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. – 2013. – P. 60-68.
11. In the era of highly active antiretroviral therapy, why are HIV-infected patients still admitted to hospital for an

- inaugural opportunistic infection? / I. Perbost, B. Malafronte, C. Pradier [et al.] // HIV Med. – 2005. – Vol. 6 (4). – P. 232-239.
12. Morbidity before and after HAART initiation in Sub-Saharan African HIV-infected adults: a recurrent event analysis / C. Seyler, E. Messou, D. Gabillard [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2007. – Vol. 23 (11). – P. 1338-1347.
13. Opportunistic infection among HIV seropositive cases in Manipal Teaching Hospital, Pokhara, Nepal / Dhungel B.A., Dhungel K.U., Easow J.M., Singh Y.I. // Kathmandu University Med. J. – 2008. – Vol. 6, No. 3, Issue 23. – P. 335-339.
14. Opportunistic infections and other AIDS-defining illnesses in Poland in 2000-2002 / R.B. Podlasin, A. Wiercinska-Drapalo, A. Olczak [et al.] // Infection. – 2006. – Vol. 34 (4). – P. 196-200.
15. Recurrent tuberculosis in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil / Golub J.E., Durovni B., King B.S. [et al.] // AIDS. – 2008. – Vol. 22 (18). – P. 2527-2533.
16. The HIV-associated tuberculosis epidemic – when will we act? / A.D. Harries, R. Zachariah, E.L. Corbett [et al.] // Lancet. – 2010. – Vol. 375 (9729). – P. 1906-1919.
17. Trends in overall opportunistic illnesses, *Pneumocystis carinii* pneumonia, cerebral toxoplasmosis and *Mycobacterium avium* complex incidence rates over the 30 years of the HIV epidemic: a systematic review / L. Coelho, V.G. Veloso, B. Grinsztejn, P.M. Luz // Braz. J. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 18 (2). – P. 196-210.
18. Global tuberculosis control: Surveillance, planning financing [Електронний ресурс] / Geneva, WHO, 2006. – Режим доступу : www.who.int/tb/publications/global_report/en.

ENGLISH VERSION: PROBLEM OF AIDS INDICATOR INFECTIOUS DISEASES*

Bugayenko N.S., Sergeyeva T.A. *

Kiev City AIDS Prevention Center

*Institute of Epidemiology and Infectious Diseases named after L.V. Gromashevsky of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (Kiev)

Kiev, Ukraine, is experiencing high incidence of opportunistic diseases that rank first (around 90% on the average) in the structure of secondary AIDS-associated pathologies. In 2006-2012, TB was the most common opportunistic infection (71.65%), followed by bacterial infections (12.07%) and fungal lesions (5.08 %). Bacterial and fungal infections were mostly related to the sexual transmission of HIV, and TB – to the infection through injecting drug use. 57.1-59.0% of patients with HIV/TB co-infection were in the terminal stage of HIV infection with a low CD4 count (< 200 cells/ml); 61.4% of them were injecting drug users. HIV infection in over 60% of patients was diagnosed when they had a manifest immune deficiency and severe opportunistic infections, which was reducing the efficiency of ART. There is a need to improve the system of health care for, and monitoring of HIV positive individuals with a focus on a timely detection of the disease.

Key words: HIV infection, opportunistic infections, tuberculosis (TB).

Introduction

HIV infection does not have a clear clinical picture and is mostly manifested by AIDS-related conditions, such as opportunistic infections (OI), which are secondary diseases developed in patients with immune deficiency. Most frequent etiologic factors of OI include potentially pathogenic infectious agents that do not cause diseases in immune competent individuals, but they can also be caused by pathogenic infectious agents (such as *M. tuberculosis*). On the background of immune system suppression, HIV positive people develop various diseases including both OI and other conditions of infectious and non-infectious etiology, which, in their turn, have a significant impact on the life time and mortality of people living with HIV (PLH). Tuberculosis (TB) is of special importance among these conditions as today it is considered not only as HIV/AIDS related, HIV/AIDS-indicator, but also as HIV/AIDS-marker infection among certain populations [2, 5].

Tuberculosis remains a key cause of mortality among PLH. Globally, according to 2012 estimates, 13% (1.1 million people) of the estimated 8.7 million people living with HIV, had developed TB. Of 2.8 million people living with TB, who were tested for HIV markers in 2012, 20% were HIV positive. [10]. At the same time, HIV infection is the most important risk factor for TB infection and, even more, it leads to TB "revival" [16].

TB is the most common OI in some countries (especially developing ones or countries with transition economies); it is followed by oral candidiasis, Herpes zoster, cryptococcosis (cryptococcal meningitis), cerebral toxoplasmosis, cytomegalovirus (CMV) infection, etc. Significant reduction of the OI incidence among HIV positive people and changes in the spectrum of infectious agents have been observed in the developed countries thanks to the broad introduction of antiretroviral therapy (ART) and highly active antiretroviral therapy (HAART) since mid-1990s [9]. This year Coelho L. et. al, having analyzed the OI incidence among HIV positive people in different countries of the world have estimated that from 1982 to 2008 the levels of *Pneumocystis carinii* incidence have reduced, at an average, by 2.0–15.6 times; of cerebral toxoplasmosis – by 1.2–8.0 times; of diseases caused by *Mycobacterium avium* complex – by 2.4–25.8 times [17]. These data are extremely encouraging, as they provide evidence that OI can be controlled in HIV positive people, while underscoring the ongoing need in the timely diagnostic of HIV infection. However, there are significant differences in the burden and range of OI between economically developed countries and countries with limited resources, and the majority of evidence about the reduction of infection levels come mostly from the developed countries, which started to introduce HAART earlier and where HIV positive people have better access to specific

* To cite this English version: Bugayenko N.S., Sergeyeva T.A.. Problem of aids indicator infectious diseases // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 39 -43.

diagnostics and treatment services [12, 14]. However, in spite of the HAART opportunities, OI still remain the factor of higher risk of morbidity and mortality for people living with HIV/AIDS, and the range of infectious agents of the most common OI varies in different regions. That is why there is need to identify the prevailing pathogens responsible for the development of OI disaggregated by regions in order to ensure appropriate treatment, care and management.

Study Goal. To assess the level of OI incidence and to identify the most common AIDS-related infections among HIV positive people in Kiev; to identify key factors contributing to the development of HIV/TB co-infection.

Study Objective and Methods

The study was conducted on the basis of the Kiev City AIDS Prevention Center (Kiev AIDS Center) for the period of 2005-2012. A comprehensive set of descriptive, estimative and analytical tools of the epidemiological research methods and mathematical statistical methods. To assess the prevalence of AIDS-indicator diseases among the patients of Kiev AIDS Center, the following official reporting materials of the MoH of Ukraine were used: Reporting Form №2 – HIV/AIDS, f. №502-1/o – «Registration Form of HIV infected person», f. №502-2/o – «Notice on changes in the Registration Form of HIV infected person», f. №025/o – «Medical Card of outpatient patient», f. №003/o – «Medical Card of inpatient patient». Also, operational epidemiological data of Kiev AIDS Center were used for the study.

Unified functions of Microsoft Office Excel were used for statistical processing of the results. The incidence dynamics and long-term trends were defined with the methods of least squares. A relative percentage and its mean bias ($P \pm m_p$), 95% confidence interval (95% CI) were also calculated. The power and direction of causal links were evaluated by the calculation of correlation ratio ($r \pm m_r$); certainty of difference was defined by Student's t -distribution; the results were estimated on a confidence level that did not exceed ($p < 0.05$).

Study Results and Their Discussion

In recent years in Kiev, as well as in Ukraine in general, high incidence of OI and other AIDS-related diseases among HIV positive people have been observed. In 2005-2012 only and average of 2.59% (95% CI: 1.14 – 4.05) of HIV positive people followed up by Kiev AIDS Center did not have these infections and this proportion was gradually declining. Almost 90% of secondary infections (95% CI: 88.82 – 90.98) had infections, mostly TB – 71.65 % (95% CI: 67.67 – 75.64). Bacterial infections were second most frequent infections among Kiev AIDS Center patients – in 2006-2012 their average proportion amounted to 12.07 % (95% CI: 8.95 – 15.19), followed by fungal lesions – 5.08 % (95% CI: 1.94 – 8.23), cerebral toxoplasmosis – 4.66 % (95% CI: 2.35 – 6.97), PCP – 2.90 % (95% CI: 1.38 – 4.42), herpetic infection – 1.65 % (95% CI: 0.50 – 2.80), CMV-infection – 1.22 % (0.67 – 1.65) and other OI – 0.76 % (95% CI: - 0.52 – 2.04). Annually, fungal infections, in addition to disseminated candidiasis, included reported cases of extrapulmonary cryptococcal infection, which, on the background of HIV progression, developed to generalized form; cases of pulmonary aspergillosis were also reported. Most common bacterial infections in HIV positive people included pneumonia or sepsis with such key etiological factors as pneumococci, staphylococci, streptococci and, less frequently – escherichia.

Study of a general dynamics of infection reporting did not identify any clear trend of a significant change in proportion of various OI for the entire period of observation (Fig.). At the same time, it should be noted that the proportion of TB in the structure of AIDS-related infections had evidentially grown from 2005 to 2012 ($p < 0.01$), although an average long-term rate of growth indicated a stable trend (+0.07 %). At the same time, the proportion of bacterial infections had decreased (the declining rate was -3.87 % – a moderate trend; $p < 0.05$), except pneumocystis pneumonia, which in most cases is diagnosed in patients with HIV infection that was detected on IV stage, that is, among late presenters: its proportion has increased (+29.10 % – an expressed trend), but it can be explained by better diagnostic services. The proportion of fungal infections in the general structure of OI has evidentially decreased (the declining rate -23.41% – an expressed trend; $p < 0.05$). As far as other infections are concerned, the difference between the comparative relative indicators did not achieve any statistically significant level.

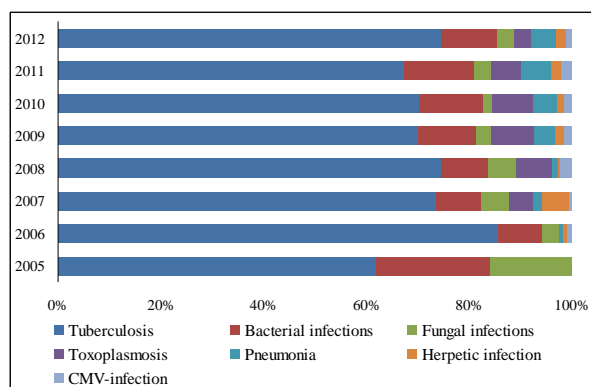


Fig. Structure of AIDS-indicator infectious conditions in HIV positive people over time, 2005-2012

In 2013 the results of operational epidemiological analysis demonstrated that with the exclusion of tuberculosis all other OI was mostly associated with sexual (most frequently heterosexual) HIV transmission route: bacterial infections – 47.7 versus 40.5 % cases of infection through parenteral transmission; CMV infection – 75.0 versus 25.0% ($p < 0.001$), herpetic infection – 100%, candidiasis – 54.5 versus 36.4 %, cryptococcosis – 66.7 versus 0 %, pneumocystis pneumonia – 63.6 versus 36.4 % ($p < 0.01$), cerebral toxoplasmosis – 75.0 versus 25.0% ($p < 0.05$). HIV transmission route was not identified only in 2 OI cases (candidiasis and cryptococcosis); 5 cases of bacterial infections (11.9 %) were related to mother-to-child transmission of the infectious agent.

Clinical diagnostics of OI in HIV positive patients is complicated because their common manifestations (asthenic syndrome, fever, lymphadenopathy, hepatosplenomegalia) are often considered to be the signs of progression of the underlying condition. A broad range of clinical manifestations and frequent prevalence of inapparent infectious processes define the specific approaches to the diagnostic of this group of infections with the focus on laboratory methods and identification of the key diagnostic criteria.

It should be also noted, that the data presented here differ significantly from materials referred to in the literature published in the developed and less developed countries and exceed the levels of infection with OI infec-

tious levels. For instance, the reports of the US physicians indicate that 27.4% of patients with newly diagnosed AIDS had at least one OI, most frequently pneumocystis pneumonia – 12.2% and TB – 5.3 % [6]. The most common opportunistic infection among HIV positive people in Nepal was TB (30.4%), followed by candidiasis (14.3%) and pneumocystis pneumonia and Cryptococcus infections (3.6% each) [13]. Most frequently reported OI among HIV positive patients in Taiwan included candidiasis, pneumocystis pneumonia and tuberculosis, while the number of these cases began to reduce significantly after the scaling up of HAART [9]. According to the data from Poland, five years after the introduction of HAART the AIDS incidence reduced and the most common OI among HIV positive people were fungal infections and TB [14]. So, today we are facing the situation, which is very similar to that in Sub-Saharan Africa and South East Asia in the period that preceded a broad introduction of ART.

These data confirm that today in Ukraine in general and in Kiev city in particular, tuberculosis is the most severe AIDS-related disease and it occurs in the process of HIV infection progression earlier than other OI, contributes to a faster development and progression of infection, development of multidrug-resistant forms and high

mortality rates among HIV positive patients. In recent years the problem of TB in combination with HIV/AIDS has become a real threat to Kiev residents. One of the key negative tendencies of HIV/AIDS epidemic in the city is the growing number of new cases of HIV/TB co-infection. If before 2000 we registered only single cases of this co-infection, then in 2005 we officially registered 39 patients with HIV/TB co-infection and in 2012 their number grew almost tenfold (Table).

While assessing the intensity of epidemic process of this co-infection, one should note such extremely unfavorable factor as a quick rate of growth of the number of HIV/TB cases in the city of Kiev – an average long-term growth rate was +14.1% (an expressed trend) in 2005-2013. At the same time we observe a doubtful opposite correlation in the dynamics of active TB incidence in the city and HIV/TB incidence ($r = -0.38$), but a direct mean power ratio of correlation with HIV incidence ($r = +0.63$, $m_r = 0.21$). So, we can presume that the growing number of HIV positive people with TB in the city is caused by HIV infection in the first place. According to the literature, an active form of TB develops in a HIV infected person 6-50 times quicker than in people, who are not HIV infected [18].

Table
Some indicators of intensity of epidemic process of HIV infection, tuberculosis and HIV/TB co-infection in the city of Kiev (2005-2013)

Indicators	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Number of newly detected HIV infections (abs. number)	1022	1146	1183	1258	1094	1077	1269	1302	1405
HIV incidence (per 100,000 population)	39.1	42.4	43.4	46.8	40.0	39.4	45.4	46.1	49.0
Number of newly detected (all forms) of active TB (abs. number)	1228	1403	1256	1280	1023	950	1073	1143	1473
TB incidence (‰)	46.8	52.9	46.9	47.4	37.6	34.6	38.9	41.2	51.8
Number of newly reported HIV/TB cases (abs. number)*	39	107	179	226	241	230	284	309	302
HIV/TB incidence (per 100,000 population)	1.4	4.0	6.6	8.2	8.7	8.2	10.1	11.0	10.5

*based on the data in Form №2 – HIV/AIDS

This table demonstrates that in 2012 TB was diagnosed in 309 people with AIDS, which accounted to 67.7 % of all ADIS cases, including 231 cases of pulmonary TB (74.8 ± 2.5 %) and 78 cases of extrapulmonary TB (25.2 ± 2.5 %). Extrapulmonary TB cases mostly included tuberculosis of nervous system (TB meningoencephalitis) – (9.7 ± 3.4 %) and TB of intermediate glands – (8.1 ± 3.1 %); while 0.9% of patients were diagnosed with osteoarticular tuberculosis. Among HIV positive patients with the newly diagnosed HIV/TB co-infection, (30.0 ± 2.6 %) of patients were shedding *M. Tuberculosis* bacteria.

In 2013, for the first time in the period of observation, some reduction in TB incidence among HIV positive people was observed in the capital city in spite of the growing rates of both HIV and TB incidence among general population of the city. As in the previous year the proportion of people with HIV/TB co-infection among HIV positive people was significant – 63.8 % (in Ukraine – 51.9 %), while the proportion of TB cases among patients with newly diagnosed AIDS had a declining trend (annual reduction rate – -5.9 %). Compared to the previous year,

the proportion of people with pulmonary TB in the general group followed up by Kiev AIDS Center has slightly increased (79.8 ± 2.3 %) – and, correspondingly, the proportion of HIV positive patients with extrapulmonary TB had reduced – (20.2 ± 2.3 %). The latter, as in the previous year, were mostly infected with tuberculosis meningoencephalitis, TB of intermediate glands and osteoarticular tuberculosis. The number of *M. tuberculosis* bacteria shedding patients also increased – almost half of people with newly diagnosed HIV/TB co-infection.

Just for comparison: in Kazakhstan, TB also stands first on the list of HIV associated OI, but accounts for only 16% of the total number of officially reported HIV positive people [1].

Age structure and gender distribution in the group of patients with HIV/TB co-infection did not differ significantly in the general group of HIV positive people: in 2012, 69.5% were men and 30.4% - women. In terms of age, the largest proportion was in the age group of 25-49 patients – 93.8 %; 2.6% of patients belonged to the age group 18-24 years and 3.5% – 50 years and older. In 2013 the trends in the age and gender structure of the

patients with HIV/TB co-infection were similar to the general group of HIV infected people, but the share of men had slightly decreased (to 64.4%) while the share of women increased (33.6 %). We consider this fact as an unfavorable sign that confirms the trend of more active involvement of women in the epidemic process [4]. In terms of age, most cases were found in the age group of 25-49 years.

According to the materials for 2012, artificial parenteral transmission of HIV through drug injections was prevailing in the structure of HIV transmission routes – 230 people were infected parenterally and 79 people – through sexual transmission – (74.4 ± 2.5)% versus (25.6 ± 2.5)% ($p < 0.01$). In 2013, HIV transmission among co-infected individuals was mostly associated with injecting route – 198 versus 131 people, who were infected through sexual contacts with HIV positive people, that is, respectively, (60.0 ± 2.7) % and (39.7 ± 2.7) %. However, this difference has slightly reduced compared to 2012 and was not reliable, which confirms the general trend towards the beginning of redistribution of the prevailing HIV transmission routes in the city from parenteral to sexual transmission [3]. In one case (0.3%) HIV was transmitted from mother to child.

In 2012, CD4 count of 57.1 % living with HIV/TB co-infection ($n = 293$) was less than 200 cells/ml, which is a confirmation of the terminal stage of HIV infection. According to the studies conducted in 2013, the number of people with terminal stage of HIV infection (on the basis of CD4 count) among these patients increased to 59.0 ± 2.9%. At the same time, 16.0 ± 2.1% of patients had CD4 count within 50-100 cells/ml and 25.9 ± 2.6% – < 50 cells/ml. Also, it is well known that CD4 count is a 'surrogate marker' that reflects probability of development of other OI.

The largest number of patients with HIV/TB co-infection on the terminal stage of HIV infection was found among IDUs – (61.4 ± 2.8)%; (34.8 ± 2.7)% were infected through heterosexual contacts with HIV positive people and the rest (3.8 ± 1.1)% – through homosexual contacts. It is common knowledge that injecting drug use is increasing the negative effect of HIV on the immune system (as well as co-infection with viral hepatitis B and C and other co-infections).

In 2011, Kiev AIDS Center conducted an operational research to identify the place of TB in the mortality structure of PLH on the basis of analysis of 150 medical cards of HIV positive people, who died in the previous year. The research found that a significant proportion of the deceased – (75.3 ± 3.5)% – were HIV infected through injecting drug use; (55.3 ± 4.1)% of patients were enrolled in care on the stage IV of HIV infection, and (23.3 ± 3.5)% had stage III; (19.3 ± 3.2) % of patients lived less than a month after enrollment; in (68.0 ± 3.8)% of patients TB was diagnosed intravital and 60.7 ± 4.0% lived less than 1 year after enrollment; (12.0 ± 2.7)% of those who died were receiving isoniazid prophylaxis of TB. Among people, who died with HIV/TB co-infection, (44.0 ± 4.1)% were diagnosed with pulmonary TB, (10.0 ± 2.4)% had miliary and extrapulmonary TB; (2.0 ± 1.1)% had MDR TB and (32.0 ± 3.8)% were newly diagnosed TB patients; (34.7 ± 3.9)% of patients were receiving ART. Depending on the stage of HIV infection, an average life time of people with HIV/TB co-infection since the moment of enrollment was 4.3 years on stage I; 3.1 years on stage II; 2.3 years on stage III and 5.6 months on stage IV.

According to the statistical reporting forms (Form №33-healthcare), the number of TB patients who died of HIV related disease in Kiev is growing in both absolute figures and relative indicators. Starting from 2006 and till 2013 their number in the city has grown from 67 to 99 –

from 2.5 to 3.5 cases per 100,000 population with an average long term growing rate of +5.27% (an expressed trend), while the growth of the number deceased in 2013 was +29.6% compared to 2012. When HIV positive patients have TB, the extremely high mortality rate is related to an untimely diagnostic and inadequate treatment of TB, multi- and extra-drug resistance of *M. tuberculosis*. In 2013, according to the data from Form №2 (HIV/AIDS), 14.0% of patients died directly of TB, while the overwhelming majority (76.9 %) – of co-infection and around 9.1% - of causes that were not related to HIV/AIDS (drug overdose, suicide, accidents, etc.). According to the specialists of Pavlodar Oblast AIDS Prevention Center (Republic of Kazakhstan), TB was a direct cause of death for 40.2% of co-infected people, and the life duration with co-infection was following: up to a year – 40%, up to 2 years – 28.8%, up to 3 years – 11.9%, up to 5 years – 3.4%, 6-8 years – 5.1 % [1].

ART is the most important component of HIV/TB management as it helps to reduce the risk of mortality in patients with co-infection by 64-95 % [15]. Besides, the specific therapy also plays a big role in the prevention of co-infection, reducing the risk of its development by 67% at an average [8]. According to the literature, today OI incidence in HIV positive people, including TB incidence, is mostly related to late diagnostic or late initiation of ART, and it is considered to be one of the most complicated aspects of HIV epidemic [7, 11]. Also, one should not forget about the lack or poor adherence to the therapy, which leads to virological failures and disease progression. Lack of adherence is associated with such factors as a low educational level, young age, unemployment status, alcohol abuse, and drug use – that is, mostly social and economic factors. And, finally, another important factor is multiple resistance to antiviral medicines.

In spite of an ongoing scaling-up of access to specific treatment in Ukraine and Kiev, opportunistic infections remain the main cause of deaths among HIV positive people. High incidence and mortality among patients with OI have their underlying causes: a significant number of HIV positive patients do not know their status and thus turn to health care services late, in the very severe condition, when OI serve as indicators of their disease. Today over 60% of new HIV diagnoses in the city are made on the background of expressed immune deficiency and severe OI conditions. At the same time, according to the literature, late detection of HIV infection (e.g., approximately 6 months before the AIDS diagnosis) increases the risk of OI overlay by 3.5 times compared to people, who were diagnosed earlier and offered a respective therapy [6]. Data of the analysis of newly diagnosed TB cases in 2012-2013 demonstrate, that risk of TB development in patients with HIV infection is the least if they receive health care services, and late diagnostic of HIV infection leads to TB infection in most cases.

HIV positive patients under follow up at the AIDS Center do not always receive ART due to a number of reasons (low adherence, psychosocial factors, etc.); not all individuals, who receive ART, can achieve an adequate virological and immunological response.

Summing up the results of this work, we believe that it would be expedient to share the recent data of international experts: among 41 countries with a heavy burden of HIV and TB co-infection in 2004-2012, Ukraine (together with Angola, Brazil, Congo, Indonesia, Lesotho, Mozambique, Sierra Leone, South Africa, Sudan, Togo, Viet Nam and some others) was in the last third group of countries with a declining number of TB related deaths among PLH (less than 25%). At the same time, the global goal is to reduce the number of TB related deaths among PLH at least twofold (< 250,000) by 2015. But we would like to conclude with the more optimistic data – in 2012

only four countries including Ukraine from the above mentioned list of priority countries managed to achieve ART coverage among HIV positive people living with TB at the level of at least 50% [10].

Conclusions

1. In Kiev, high incidence of OI that account for at least 90% of all AIDS-related secondary infections is observed among HIV positive people in recent years.

2. Tuberculosis is the most common OI in HIV positive people and in 2012-2013 it accounted for over 65% of all newly reported cases of HIV infection. Pulmonary TB is the most frequent form in co-infected individuals; extrapulmonary forms include tuberculosis meningoencephalitis, TB of intermediate glands and osteoarticular TB. The number of patients with *M. tuberculosis* bacteria shedding is growing.

3. Bacterial infections (12.07%) prevail in the structure of other OI, followed by fungal infection (5.08%), cerebral toxoplasmosis (4.66%), pneumocystis pneumonia (2.90%), herpetic infection (1.65%) and CMV-infection (1.22%).

4. Adversative trends are observed in the dynamics of HIV/TB incidence and TB cases among the city population, and one-way development of the epidemic process of HIV/TB co-infection and HIV infection.

5. Over 60% of patients with HIV/TB turn to health services on the later stages of infection process development. In 57.1-59.0% of patients with HIV/TB diagnosis the number of CD4 lymphocytes does not exceed 200 cells/ml, which is an evidence of the terminal stage of HIV infection. The majority of patients with HIV/TB in the terminal stage are IDUs (61.4%).

6. To ensure timely diagnostics and treatment of TB there is a need to improve health services to, and monitor HIV positive people. Timely diagnostics remains a corner stone to settle this issue.

Prospects for further studies

Further efforts are needed to improve the system of epidemiological surveillance of OI in HIV positive people on the regional levels, taking into consideration all integral components, such as territorial characteristics of the epidemic process, immunological characteristics of the patients, viral load, etc. Studies that are focused on the determination of the epidemiological contribution of the patients as the sources of dual infection should be specifically developed.

References

1. Alshinbaeva G.U. VICH-infekziya v sochetanii s tuberkulezom / G.U. Alshinbaeva, A.Sh. Sergalinv, M.E. Sorokina // Aktual'nye voprosy infekzionnoy patologii / Pod red. V.M. Semenov. – Materialy Evro-Aziatskogo kongressa po infektsionnym boleznyam (Vitebsk, 5-6 iyunya 2008 g.). – Vitebsk, 2008. – T. 1. – S. 35-36.
2. Belyakov N.A. Virus immunodefizita cheloveka – meditsina / N.A. Belyakov, A.G. Rachmanova. – Sankt-Peterburg. – 2011. – S. 190-286.
3. Bugaenko N.S. Evolyuziya epidemichnogo procesu VIL-infekzii v megapolisi (na prikladi m. Kiya) / N.S. Bugaenko, T.A. Sergeeva // Problemi viys'kovoï ochoroni zdorov'ya. – 2013. – Vipusk №37. – S. 267-276.
4. Vivchennyya poshirenosti VIL-infekzii sered urazliviv grup naselennyya v m. Kiya za rezul'tatami dozornich epidemiologichnich doslidzhen' / N.S. Bugaenko, T.A. Sergeeva, O.V. Yurchenko, Yu.V. Kruglov // Profilaktichna meditsina. – 2012. – №2. – S. 16-23.
5. Spektr i chastota oportunisticheskikh zabolevaniy u bol'nykh VICH-infekziy / E. Golochvastova, S. Zarenko, N. Litvinova [i dr.] // Vrach. – 2012. – S. 26-30.
6. AIDS-defining opportunistic illnesses in the HAART era in New York City / Hanna D.B., Gupta L.S., Jones L.E. [et al.] // AIDS Care. – 2007. – Vol. 19 (2). – P. 264-272.
7. AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study / K. Buchacz, R.K. Baker, F.J. Palella [et al.] // AIDS. – 2010. – Vol. 24 (10). – P. 1549-1559.
8. Antiretrovirals and isoniazid preventive therapy in the prevention of HIV-associated tuberculosis in settings with limited health-care resources / Lawn S.D., Wood R., De Cock K.M. [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 489-498.
9. Changes in the clinical spectrum of opportunistic illnesses in persons with HIV infection in Taiwan in the era of highly active antiretroviral therapy / Sun H.Y., Chen M.Y., Hsieh S.M. [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 59 (5). – P. 311-316.
10. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013 / WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. – 2013. – P. 60-68.
11. In the era of highly active antiretroviral therapy, why are HIV-infected patients still admitted to hospital for an inaugural opportunistic infection? / I. Perbost, B. Malafronte, C. Pradier [et al.] // HIV Med. – 2005. – Vol. 6 (4). – P. 232-239.
12. Morbidity before and after HAART initiation in Sub-Saharan African HIV-infected adults: a recurrent event analysis / C. Seyler, E. Messou, D. Gabillard [et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2007. – Vol. 23 (11). – P. 1338-1347.
13. Opportunistic infection among HIV seropositive cases in Manipal Teaching Hospital, Pokhara, Nepal / Dhungel B.A., Dhungel K.U., Easow J.M., Singh Y.I. // Kathmandu University Med. J. – 2008. – Vol. 6, No. 3, Issue 23. – P. 335-339.
14. Opportunistic infections and other AIDS-defining illnesses in Poland in 2000-2002 / R.B. Podlasin, A. Wiercinska-Drapalo, A. Olczak [et al.] // Infection. – 2006. – Vol. 34 (4). – P. 196-200.
15. Recurrent tuberculosis in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil / Golub J.E., Durovni B., King B.S. [et al.] // AIDS. – 2008. – Vol. 22 (18). – P. 2527-2533.
16. The HIV-associated tuberculosis epidemic – when will we act? / A.D. Harries, R. Zachariah, E.L. Corbett [et al.] // Lancet. – 2010. – Vol. 375 (9729). – P. 1906-1919.
17. Trends in overall opportunistic illnesses, Pneumocystis carinii pneumonia, cerebral toxoplasmosis and Mycobacterium avium complex incidence rates over the 30 years of the HIV epidemic: a systematic review / L. Coelho, V.G. Veloso, B. Grinsztejn, P.M. Luz // Braz. J. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 18 (2). – P. 196-210.
18. Global tuberculosis control: Surveillance, planning financing [website] / Geneva, WHO, 2006. – Accessed at: www.who.int/tb/publications/global_report/en.

Матеріал надійшов до редакції 11.06.2014 р.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Кучерявченко М.А., Зайцева О.В., Жуков В.И., Книгавко В. Г.
УДК 614.777:543.39:547.42

СОСТОЯНИЕ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ ЛАПРОКСИДОВ*

Кучерявченко М.А., Зайцева О.В., Жуков В.И., Книгавко В. Г.

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

Проведено дослідження тривалого впливу (1,5 місяця) нової групи синтезованих лапроксидів Л-303 і Л-500 у дозах 1/10, 1/100, 1/1000 LD50 на стан обміну макроергічних сполук та їх метаболітів у печінці білих щурів за такими показниками: вміст аденозинтрифосфату (АТФ), аденозиндифосфату (АДФ), аденозинмонофосфату (АМФ), циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), неорганічного фосфату, креатинфосфату, суми аденінових нуклеотидів, а також активність Ca^{2+} - та Mg^{2+} -залежної АТФ-ази. Встановлено, що в умовах довгострокової дії субтоксичних доз лапроксидів Л-303 і Л-500 в організмі білих щурів спостерігається інгібіція біоенергетичних процесів, перевага катаболізму над відновлювальними синтезами. Дані ксенобіотики у дозах 1/10 і 1/100 LD50 мають властивість знижувати у печінці вміст АТФ, АДФ, цГМФ, аденінових нуклеотидів, креатинфосфату, величину енергетичного потенціалу клітини, суттєво послаблювали активність Mg^{2+} -АТФ-ази, Ca^{2+} -АТФ-ази. Негативний вплив лапроксидів Л-303 і Л-500 на обмін макроергічних сполук у печінці проявився у збільшенні рівнів АМФ, цАМФ, неорганічного фосфату у порівнянні з контролем. При дії лапроксидами у дозі 1/1000 LD50 не встановлено статистично значущих відмінностей між отриманими результатами у дослідних групах і контролем. Порушення балансу в показниках біоенергетичного обміну в організмі білих щурів підтверджують наявність гепатотоксичної дії лапроксидів у субтоксичних дозах, що призводить до подальших метаболічних порушень.

Ключові слова: лапроксиди, макроергічні сполуки, білі щури, підгострий токсикологічний експеримент.

Введение

Развитие химической промышленности сопровождается увеличением производства химических веществ, к которым человек эволюционно не адаптирован. Накопление ксенобiotиков в объектах окружающей среды и их губительное действие на флору и фауну часто формирует экологически обусловленные заболевания и патологические состояния [1,3]. Многочисленным химическим соединениям присущи не только прямое токсическое действие, но и способность влиять на развитие отдаленных последствий: канцерогенез, мутагенез, тератогенное действие, атерогенез, иммунологическая недостаточность, ускорение старения организма и пр. [2,6]. На сегодняшний день одним из самых мощных источников загрязнения биосферы являются предприятия химии органического синтеза. Это в полной мере относится и к химическим комбинатам по выпуску «Лапроксидов», объемы производства которых постоянно увеличиваются. Данные химические соединения широко используются для получения эпоксидных смол, лаков, эмалей, красок и др. и нашли применение во многих отраслях народного хозяйства – строительстве, ма-

шиностроении, электрохимии, нефтедобыче, сельском хозяйстве.

Вместе с тем, отсутствие комплексной характеристики потенциальной опасности этих соединений для здоровья населения и состояния окружающей среды диктует необходимость глубокого изучения механизмов биологического действия лапроксидов и разработки способов коррекции метаболических нарушений, возникающих под влиянием малых субтоксических доз данных ксенобiotиков.

Целью работы явилось изучение длительного воздействия субтоксических доз новой группы лапроксидов на состояние биоэнергетического обмена в условиях токсикологического эксперимента.

Материалы и методы исследования

В работе была использована новая группа лапроксидов с регламентированными физико-химическими свойствами, относящаяся к классу простых полиэфиров: олигоэфирмоноэпоксид молекулярной массы 500 (Л-500) и триглицидиловый эфир полиоксипропилентриола молекулярной массы 303 (Л-303). По результатам параметров острого опыта данные вещества являются малотоксичными и сла-

* Цитування при атестації кадрів: Кучерявченко М.А., Зайцева О.В., Жуков В.И., Книгавко В. Г. Состояние биоэнергетического обмена в организме белых крыс в условиях длительного воздействия субтоксических доз лапроксидов // Проблемы экологии и медицины. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 44 –46

бокумулятивными, не обладающими видовой и половой чувствительностью. Среднесмертельные дозы (LD50) Л-303 и Л-500 для белых крыс установлены на уровнях 5,75 г/кг и 26,7 г/кг массы животного, а коэффициенты кумуляции (Кк) составляли 7,61 и 9,28. Программа исследования предусматривала проведение длительного подострого токсикологического эксперимента на половозрелых белых крысах линии Вистар массой 0,19-0,20 кг. В соответствии с условиями опыта, животным на протяжении 1,5 месяца ежедневно утром до кормления с помощью металлического зонда перорально вводились водные растворы лапроксидов в дозах 1/10; 1/100; 1/1000 LD50 (6 групп по n=10 животных). Контрольная группа (n=10 животных) получала соответствующие объемы питьевой воды. В эксперименте строго выполнялись требования биоэтики и принципы «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для научных и других целей» (Страсбург, 1986г.) [9]. По завершению подострого опыта исследовалось состояние обмена макроэргических соединений и их метаболитов в печени, при этом определялось содержание аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ), циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), неорга-

нического фосфата, креатинфосфата, суммы адениновых нуклеотидов, а также активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы. Определение Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы в гепатоцитах осуществлялось общепринятым биохимическим методом [4]. Содержание АТФ в тканях печени определялось по методу Е. Beutler [8], АДФ - по D. Jaworek [10], креатининфосфата - по Е.Д. Сонин [5], неорганического фосфата - по методу, описанному Н.П. Мешковой и С.Е. Севериным [4]. Величину энергетического потенциала (ЭП) вычисляли по формуле D.E. Atrinson [7]. Содержание цАМФ и цГМФ в печени определяли по Ch. W. Parker [11]. Полученные результаты обрабатывались методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и их обсуждение

Изучение влияния субтоксических доз 1/10 и 1/100 LD50 лапроксидов Л-303 и Л-500 в условиях длительного подострого опыта выявило снижение содержания в печени АТФ, АДФ, цГМФ, суммы адениновых нуклеотидов, креатининфосфата, энергетического потенциала клетки и активности Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы на фоне повышения уровней АМФ, неорганического фосфата и цАМФ (табл.), по сравнению с результатами контрольной группы.

Таблица
Влияние субтоксических доз лапроксидов Л-303 и Л-500 на показатели биоэнергетического обмена в организме белых крыс в подостром опыте

Показатели	Группа наблюдения, доза LD50, М±m				
	Марка лапроксида	Контроль (n=10)	1/10 (n=10)	1/100 (n=10)	1/1000 (n=10)
АТФ (мкмоль/г печени)	Л-303	2,24±0,12	0,53±0,04*	0,71±0,09*	2,27±0,16
	Л-500	2,24±0,12	0,48±0,04*	0,69±0,03*	2,23±0,14
АДФ (мкмоль/г печени)	Л-303	1,28±0,07	0,46±0,04*	0,53±0,04*	1,26±0,05
	Л-500	1,28±0,07	0,41±0,03*	0,5±0,04*	1,26±0,06
АМФ (мкмоль/г печени)	Л-303	0,82±0,06	1,73±0,14*	1,56±0,08*	0,83±0,07
	Л-500	0,82±0,06	1,65±0,13*	1,58±0,12*	0,85±0,05
Неорганический фосфор (мкмоль/г печени)	Л-303	5,79±0,64	13,8±1,2*	9,38±0,74*	5,68±0,54
	Л-500	5,79±0,64	14,8±1,27*	9,52±0,87*	5,66±0,47
цАМФ (нмоль/г печени)	Л-303	650,4±27,2	935,4±41,6*	896,2±38,5*	640,2±31,4
	Л-500	650,4±27,2	940,6±37,2*	895,4±41,6*	645,7±31,2
цГМФ (нмоль/г печени)	Л-303	37,5±3,6	16,7±1,15*	22,3±1,84*	38,3±3,5
	Л-500	37,5±3,6	18,5±1,63*	20,6±1,73*	36,8±4,1
Сумма адениновых нуклеотидов (мкмоль/г печени)	Л-303	4,34±0,08	2,78±0,07*	2,84±0,07*	4,36±0,09
	Л-500	4,34±0,08	2,54±0,07*	2,77±0,06*	4,34±0,23
Креатинфосфат (мкмоль/г печени)	Л-303	1,27±0,06	0,47±0,03*	0,56±0,04*	1,25±0,08
	Л-500	1,27±0,06	0,45±0,03*	0,62±0,04*	1,32±0,07
Энергетический потенциал: (АТФ+1/2 АДФ): (АТФ+АДФ+АМФ)	Л-303	0,66±0,02	0,27±0,03*	0,349±0,02*	0,66±0,03
	Л-500	0,66±0,02	0,27±0,02*	0,34±0,03*	0,65±0,04
Mg^{2+} -АТФ-аза (мкмоль Р/мг белка • 1 час), митохондрии гепатоцитов	Л-303	81,46±4,7	42,58±3,7*	54,6±3,8*	82,53±5,26
	Л-500	81,46±4,7	45,3±3,44*	56,23±4,52*	79,6±4,82
Ca^{2+} -АТФ-аза (мкмоль Р/мг белка • 1 час), митохондрии гепатоцитов	Л-303	73,52±5,1	39,65±3,2*	43,76±4,1*	74,37±4,93
	Л-500	73,52±5,1	38,93±3,56*	48,63±3,74*	71,96±5,43

Примечание: * — $p \leq 0,05$ относительно контроля.

При дозе 1/1000 LD50 данных ксенобиотиков в опытных группах не установлены статистически достоверные отличия с контролем в показателях энергетического обмена в печени.

Результаты исследования показывают, что в организме животных, получавших лапроксид Л-303 в дозах 1/10 и 1/100 LD50 снижалось соответственно содержание в печени АТФ на 76,34% и 68,31%, АДФ – 64,07% и 58,60%, цГМФ – 55,47% и 40,54%, сумма

адениновых нуклеотидов – 35,95% и 34,57%, креатинфосфата – 63% и 55,91%, уменьшались величины энергетического потенциала клетки на 59,1% и 47,22% и активности Mg^{2+} -АТФ-азы – 47,73% и 32,98%, Ca^{2+} -АТФ-азы – 46,07% и 40,48% на фоне повышения уровней АМФ на 110,97% и 90,24%, неорганического фосфата – 138,34% и 62%, цАМФ – 43,8% и 37,8% по сравнению с контрольной группой.

Воздействие лапроксида Л-500 в дозах 1/10 и 1/100 LD50 приводило соответственно к снижению содержания АТФ на 78,52% и 69,2%, АДФ – 68,22% и 60,94%, цГМФ – 50,67% и 45,07%, суммы адениновых нуклеотидов – 41,48% и 36,18%, креатинфосфата – 64,57% и 51,19%, величины энергетического потенциала клетки – 59,1% и 48,49%, активности Ca^{2+} -АТФ-азы – 47,05% и 33,86%, Mg^{2+} -АТФ-азы – 44,39% и 39,98% на фоне повышения концентрации АМФ на 101,2% и 92,68%, неорганического фосфата – 155,6% и 64,4%, цАМФ – 44,6% и 37,6%.

Выводы

1. В условиях длительного воздействия субтоксических доз лапроксидов Л-303 и Л-500 в организме белых крыс наблюдается ингибирование биоэнергетических процессов, преобладание катаболизма над восстановительными синтетами.

2. Исследуемые ксенобиотики в дозах 1/10 и 1/100 LD50 обладают способностью снижать в печени содержание АТФ, АДФ, цГМФ, адениновых нуклеотидов, креатинфосфата, величину энергетического потенциала клетки, существенно ослабляли активность Mg^{2+} -АТФ-азы, Ca^{2+} -АТФ-азы.

3. Негативное влияние лапроксидов Л-303 и Л-500 на обмен макроэргических соединений в печени проявилось в увеличении по сравнению с контролем уровней АМФ, цАМФ, неорганического фосфора.

4. При воздействии лапроксидами в дозе 1/1000 LD50 не установлены статистически достоверные отличия между полученными результатами в опытных группах и контроле.

5. Нарушение баланса в показателях биоэнергетического обмена в организме белых крыс подтверждает наличие гепатотоксического действия лапроксидов в субтоксических дозах, ведущего к дальнейшим метаболическим нарушениям.

Перспективы дальнейших исследований

Полученные результаты могут быть основой для дальнейшего изучения влияния субтоксических доз

лапроксидов на метаболическое состояние митохондрий гепатоцитов в условиях подострого опыта.

Литература

1. Богоявленська В.Ф. Вплив забруднювачів довкілля на систему природних кілерних клітин / В.Ф. Богоявленська, А.В. Сташенко, Д.В. Риженко [та ін.]// Сучасні проблеми токсикології. – 2002. – № 2. – С. 5-3.
2. Жуков В.И. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В.И. Жуков, Л.Д. Попова, О.В. Зайцева [и др.] – Харьков: Торнадо, 2000. – 437 с.
3. Марченко М.М. Біохімічна біотрансформація ксенобіотиків у організмі / М.М. Марченко, О.В. Кеца, М.М. Великий. – Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2011. – 280 с.
4. Мешкова Н.П. Практикум по биохимии / Н.П. Мешкова, С.Е. Северин. – М.: МГУ, 1979. – 428 с.
5. Сонин Е.Ф. Основы биохимии мышц / Е.Ф. Сонин. – К.: Изд-во Киевского университета, 1960. – 181 с.
6. Цыганенко А.Я. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, Н.Г. Щербань [и др.] – Белгород: Белвитамины, 2001. – 422 с.
7. Atrinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter / D.E. Atrinson // Biochemistry. – 1968. – Vol. 7, № 41. – P. 4030-4034.
8. Beutler E. Method of enzymatic analysis / E. Beutler // Biochemistry. – 1975. – Vol 1, № 3. – P. 560-566.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg. – 1986. – № 123 – 52 p.
10. Jaworek D. Adenosin-5-diphosphate and Adenosin-5-monophosphate / D. Jaworek, W. Gruber, H.V. Bergmeyer; In: Bergmeyer H.V. (ed.). Methoden der enzymatischen analyse – Bd. N. Wierhheim / Chemic. – 1974. – S. 2174-2181.
11. Parker Ch.W. Radioimmunoanalysis for measurement of cyclic nucleotides / Ch.W. Parker // Advances in cyclic nucleotides research. – Raven Cress, H.J. – 1972. – Vol. 2. – P. 51-52.

ENGLISH VERSION: BIOENERGETIC METABOLISM STATE IN ALBINO RATS UNDER THE LONG-LASTING EXPOSURE OF THE LAPROXIDES SUBTOXIC DOSES*

Kucheryavchenko M.A., Zaitseva O.V., Zhukov V.I., Knigavko V.G.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

It was investigated the long-lasting exposure (1,5 months) of L-303 and L-500 laproxides in doses of 1/10, 1/100, 1/1000 LD50 on metabolism of the macroergic compounds and their metabolites in albino rats liver by such indexes: content of adenosinotriphosphate (ATPh), adenosindiphosphate (ADPh), adenosinmonophosphate (AMPh), cyclic guanosinmonophosphate (cGMPh), inorganic phosphate, creatinphosphate, adenine nucleotides as well as Ca²⁺- and Mg²⁺-ATPh-ase activity. It was determined the inhibition of bioenergetic processes, catabolism predominance over restoration synthesis in albino rats organism under L-303 and L-500 laproxides long-lasting exposure. These xenobiotics in 1/10 and 1/100 LD50 doses decreased the content of ATPh, ADPh, cGMPh, adenine nucleatides, creatinphosphate, value of cell energetic potential, reduced Mg²⁺- ATPh-ase, Ca²⁺-ATPh-ase activity. Negative effect of L-303 and L-500 laproxides on macroergic compounds metabolism in liver manifested in augmentation AMPh, cAMPh, inorganic phosphate levels with respect to control. It wasn't detect statistic differences between obtained results in experimental groups and control under laproxides effect in 1/1000 LD50 dose. Disorders in balance of bioenergetic metabolism indexes in albino rats organism confirm the presence of laproxides hepatotoxic effect which causes subsequent development metabolic disorders.

Key words: laproxides, macroergic compounds, albino rats, subacute toxicologic experiment.

Introduction

Development of the chemical industry is accompanied by an increase in the production of chemicals to which people are not evolutionarily adapted. Accumulation of xenobiotics in the environment and their devastating effect on flora and fauna often generates environmentally caused diseases and pathological conditions [1,3]. Numerous chemical compounds have not only a direct toxic effect, but also the ability to influence the development of long-term effects: carcinogenesis, mutagenesis, teratogenic effect, atherogenesis, immunological deficiency, accelerated aging, etc. [2,6]. Today, one of the most powerful sources of pollution of the biosphere are enterprises of synthetic organic chemistry. This fully applies to the chemical plant for the production of "Laproxides". These chemicals are widely used to produce epoxy resins, lacquers, enamels, paints, etc. and have found application in many sectors of the economy - construction, engineering, electrochemistry, oil production and agriculture.

However, the absence of comprehensive characteristics of the potential danger of these compounds for human health and the environment dictates the need for a thorough study of the mechanisms of laproxides biological action and develop of metabolic disturbances correction ways that occur under the influence of the xenobiotics small data sub-toxic doses.

The aim of the work was to study the long-term impact of sub-toxic doses of the laproxides new group on the bioenergetic metabolism state in toxicological experiment.

Materials and methods

In this study we used a new group of laproxides with regulated physicochemical properties. These compounds are related to the class of polyethers: oligoethermonoepoxid with molecular weight of 500 (L-500) and triglycidyl ether polioksipropilentriol with molecular weight of 303 (L-303). With respect to the results of acute experiments, these substances have a low toxicity and weak cumulation, have not the species

and gender sensitivity. The mean lethal doses (LD50) of L-303 and L-500 for white rats are set at levels of 5.75 g/kg and 26.7 g/kg of body weight of the animal, and the coefficients of cumulation (Kk) were 7.61 and 9.28. The research program included a long subacute toxicological experiment on mature white Wistar rats weighting 0.19-0.20 kg. Under the experimental conditions, the animals for 1.5 months every morning before feeding with a metal probe orally were administered aqueous solutions of laproxides doses of 1/10; 1/100; 1/1000 of LD50 (6 groups of n = 10 animals). The control group (n = 10 animals) received the appropriate volume of drinking water. In the experiment we strictly met the requirements of the bioethics and the principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes" (Strasbourg, 1986) [9]. Upon completion of the subacute experiment investigated the macroergic compounds metabolism and their metabolites in the liver, were moreover, it the content of the adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), inorganic phosphate, phosphocreatine, the amount of adenine nucleotides and the activity of Ca²⁺- and Mg²⁺-dependent ATP-ase were determined. Determination of Ca²⁺- and Mg²⁺-dependent ATP-ase in rat hepatocytes was performed by conventional biochemical method [4]. ATP content in liver tissues was determined by the method of E. Beutler [8], ADP - by D. Jaworek [10], phosphocreatine - by ED Sonnin [5], an inorganic phosphate - on the method described by N. Meshkova and S. Severin [4]. The magnitude of the energy potential (EP) was calculated as D.E. Atrinson [7]. CAMP and cGMP content in the liver was determined by Ch. W. Parker [11]. The results obtained were processed by methods of variation statistics using Student -Fisher t-test.

Results and discussion

Study of the L-303 and L-500 laproxides effect at subtoxic doses of 1/10 and 1/100 of LD50 in terms long subacute experiment revealed liver of reduction of ATP, ADP, cGMP content, the amount of adenine nucleotides,

* To cite this English version: Kucheryavchenko M.A., Zaitseva O.V., Zhukov V.I., Knigavko V.G. Bioenergetic metabolism state in albino rats under the long-lasting exposure of the laproxides subtoxic doses // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 47 - 49.

phosphocreatine, the energy potential of the cell and the activity of Ca^{2+} - and Mg^{2+} - dependent ATP-ase against a background increased AMP levels, the inorganic

phosphate and cAMP (Table), when compared with the results of the control group.

Table

Influence of L-303 and L-500 laproxides at sub-toxic doses on indicators of bioenergy metabolism in white rats in subacute experiment

Indicators	Monitoring Group, the dose of LD50, M ± m				
	Brand of laproxides	Control (n = 10)	1/10 (n = 10)	1/100 (n = 10)	1/1000 (n = 10)
ATP (mcmol/g liver)	L-303	2,24 ± 0,12	0,53 ± 0,04*	0,71 ± 0,09*	2,27 ± 0,16
	L-500	2,24 ± 0,12	0,48 ± 0,04*	0,69 ± 0,03*	2,23 ± 0,14
ADP (mcmol/g liver)	L-303	1,28 ± 0,07	0,46 ± 0,04*	0,53 ± 0,04*	1,26 ± 0,05
	L-500	1,28 ± 0,07	0,41 ± 0,03*	0,5 ± 0,04*	1,26 ± 0,06
AMP (mcmol/g liver)	L-303	0,82 ± 0,06	1,73 ± 0,14*	1,56 ± 0,08*	0,83 ± 0,07
	L-500	0,82 ± 0,06	1,65 ± 0,13*	1,58 ± 0,12*	0,85 ± 0,05
Inorganic phosphorus (mcmol/g liver)	L-303	5,79 ± 0,64	13,8 ± 1,2*	9,38 ± 0,74*	5,68 ± 0,54
	L-500	5,79 ± 0,64	14,8 ± 1,27*	9,52 ± 0,87*	5,66 ± 0,47
cAMP (nmol/g liver)	L-303	650,4 ± 27,2	935,4 ± 41,6*	896,2 ± 38,5*	640,2 ± 31,4
	L-500	650,4 ± 27,2	940,6 ± 37,2*	895,4 ± 41,6*	645,7 ± 31,2
cGMP (nmol/g liver)	L-303	37,5 ± 3,6	16,7 ± 1,15*	22,3 ± 1,84*	38,3 ± 3,5
	L-500	37,5 ± 3,6	18,5 ± 1,63*	20,6 ± 1,73*	36,8 ± 4,1
Sum of adenine nucleotides (mcmol/g liver)	L-303	4,34 ± 0,08	2,78 ± 0,07*	2,84 ± 0,07*	4,36 ± 0,09
	L-500	4,34 ± 0,08	2,54 ± 0,07*	2,77 ± 0,06*	4,34 ± 0,23
Phosphocreatine (mcmol/g liver)	L-303	1,27 ± 0,06	0,47 ± 0,03*	0,56 ± 0,04*	1,25 ± 0,08
	L-500	1,27 ± 0,06	0,45 ± 0,03*	0,62 ± 0,04*	1,32 ± 0,07
Energy potential : (ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)	L-303	0,66 ± 0,02	0,27 ± 0,03*	0,349 ± 0,02*	0,66 ± 0,03
	L-500	0,66 ± 0,02	0,27 ± 0,02*	0,34 ± 0,03*	0,65 ± 0,04
Mg^{2+} - ATP-ase (P mcmol/mg protein · 1 h), the mitochondria	L-303	81,46 ± 4,7	42,58 ± 3,7*	54,6 ± 3,8*	82,53 ± 5 26
	L-500	81,46 ± 4,7	45,3 ± 3,44*	56,23 ± 4,52*	79,6 ± 4,82
Ca^{2+} ATP-ase (P mcmol/mg protein · 1 h), the mitochondria	L-303	73,52 ± 5,1	39,65 ± 3,2*	43,76 ± 4,1*	74,37 ± 4 93
	L-500	73,52 ± 5,1	38,93 ± 3,56*	48,63 ± 3,74*	71,96 ± 5,43

Note: * — reliable differences with control, $p < 0,05$.

Statistically significant differences in terms of the control of energy metabolism in the liver, in the experimental and control groups are not established at LD50 1/1000 dose of the given xenobiotics.

The results show that in the animals treated L-303 laproxid at doses of 1/10 and 1/100 of LD50 ATP content in liver has decreased, respectively, by 76.34 % and 68.31%, ADP – 64.07 and 58%, 60%, cGMP - 55.47% and 40.54 %, the amount of adenine nucleotides - 35.95 % and 34.57 %, phosphocreatine - 63% and 55.91 %, the energy potential value of cells has decreased by 59.1% and 47.22% as well as the activity of Mg^{2+} - ATP-ase – 47.73 % and 32.98%, Ca^{2+} - ATP-ase - 46.07 % and 40.48 % on higher levels of cAMP by 110.9 % and 90.24%, an inorganic phosphate - 138.34% and 62%, cAMP - 43.8% and 37.8% compared with the control group.

Under L-500 laproxide influence at doses of 1/10 and 1/100 of LD50, respectively, ATP content has reduced by 78.52% 69.2%, as well as ADP - 68.22% and 60.94%, cGMP - 50.67% and 45.07%, the amount of adenine nucleotides - 41.48% and 36.18%, phosphocreatine - 64.57% and 51.19%, value of the energy potential of the cell - 59.1% and 48.49%, the activity of Ca^{2+} - ATP-ase – 47.05% and 33,86%, Mg^{2+} - ATP-ase - 44.39% and 39.98% on increasing the concentration of cAMP by 101.2% and 92.68%, inorganic phosphate – 155.6% and 64.4%, cAMP - 44.6% and 37.6%.

Conclusions

Under conditions of prolonged influence of the L-303 and L-500 laproxides at sub-toxic doses in white rats

inhibition of bioenergetic processes, the prevalence of the catabolism over restoration synthesis is observed.

2. Investigated xenobiotics at doses of 1/10 and 1/100 of LD50 have the ability to reduce the liver ATP content, ADP, cGMP, adenine nukletidov, creatine phosphate, the value of the energy potential of the cells, they significantly weakened the activity of Mg^{2+} - ATP-ase, Ca^{2+} - ATP-ase.

3. Negative effect of the L-303 and L-500 laproxides on macroergic compounds metabolism in the liver is manifested by an increase, compared with the control, of AMP, cAMP, inorganic phosphorus levels.

4. Statistically significant differences have not been established between the results obtained in the experimental groups and control if laproxide toxification was at a dose of 1/1000 of LD50.

5. Imbalance in terms of bioenergy metabolism in albino rats confirms the presence of laproxides hepatotoxicity under influence at the sub-toxic doses leading to further metabolic disturbances.

Prospects for further research

The results can be the basis for further study of the laproxides influence at sub-toxic doses on the hepatocytes mitochondria metabolic state under subacute experiment.

References

1. Bogoyavlens'ka V.F. Vpliv zabrudnyuvachiv dovkilliya na sistemu prirodnych kilernich klitin / V.F. Bogoyavlens'-ka, A.V. Stashenko, D.V. Rizhenko [ta in.]// Suchasni problemi toksikologii. - 2002. - № 2. - S. 5-3.
2. Zhukov V.I. Prostye i makroziklicheskie efiry: nauch-nye osnovy ochrany vodnykh ob'ektov / V.I. Zhukov, L.D.

- Popova, O.V. Zayzeva [i dr.] - Char'kov: Tornado, 2000. - 437 s.
3. Marchenko M.M. Biochimichna biotransformaziya ksenobiotikiv u organizmi / M.M. Marchenko, O.V. Keza, M.M. Velikiy. – Chernivzi: Chernivez'kiy naz. un-t, 2011. – 280 s.
4. Meshkova N.P. Praktikum po biochimii / N.P. Meshkova, S.E. Severin. – M.: MGU, 1979. – 428 s.
5. Sonin E.F. Osnovy biochimii myshz / E.F. Sonin. – K.: Izd-vo Kievskogo universiteta, 1960. - 181 s.
6. Zyganenko A.Ya. Nauchnye osnovy obosnovaniya prognoza potentsial'noy opasnosti detergentov v svyazi s reglamentaziey v vode vodoemov / A.Ya. Zyganenko, V.I. Zhukov, N.G. Scherban' [i dr.] - Belgorod: Belvitaminy, 2001. - 422 s.
7. Atrinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a repylatory parameter / D.E. Atrinson // Biochemistry. – 1968. – Vol. 7, № 41. – P. 4030-4034.
8. Beutler E. Method of enzymatic analysis / E. Beutler // Biochemistry. – 1975. – Vol 1, № 3. – P. 560-566.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg. – 1986. – № 123 – 52 p.
10. Jaworek D. Adenosin-5-diphosphate and Adenosin-5-monophosphate / D. Jaworek, W. Gruber, H.V. Bergmeyer; In: Bergmeyer H.V. (ed.). Methoden der enzymatishen analyse – Bd. N. Wierhheim / Chemic. – 1974. – S. 2174-2181.
11. Parker Ch.W. Radioimmunoanalysis for measurement of cyclic nucleotides / Ch.W. Parker // Advances in cyclic nucleotides research. – Raven Cress, H.J. – 1972. – Vol. 2. – P. 51-52.

Матеріал надійшов до редакції 29.05.2014 р.

© Багмут И.Ю.

УДК 614.777:543.39:547.42

СОСТОЯНИЕ ОБМЕНА L-ТРИПТОФАНА В УСЛОВИЯХ ПОДОСТРОГО ОПЫТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ОЛИГОЭФИРЦИКЛОКАРБОНАТА В СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗАХ*

Багмут И.Ю.

Харьковская академия последипломного образования, г. Харьков

На 40 статевозрілих щурах популяції Вістар в підгострому досліді вивчено дію малих субтоксических доз ксенобіотика - олігоєфірціклокарбоната марки П-803 з розрахунку 1/10; 1/100 і 1/1000 ЛД50 на організм. У сироватці крові дослідних і контрольних тварин визначали вміст L-триптофану та його метаболітів - серотоніну, мелатоніну, 5-оксіндолюксусної кислоти (5-ОІУК), тваринного індікана, в печінці активність ферменту триптофан-2,3-діоксигенази (ТДО). У сироватці крові визначався також один з кінцевих продуктів окисного дезамінування амінокислот, біогенних амінів, пуринових азотистих основ та ін - аміак (NH₃). Встановлено, що ксенобіотик в 1/10 і 1/100 ЛД50 знижував вміст у плазмі крові мелатоніну і триптофану на тлі підвищення серотоніну, 5-ОІУК, індікана, аміаку та активності в печінці ферменту ТДО. Результати свідчать, що олігоєфірціклокарбонат в 1/10 і 1/100 ЛД50 призводить до глибокого порушення білкового, нейромедіаторного, гормонального, кофакторного обмінів в організмі щурів.

Ключові слова: ксенобіотики, L-триптофан, серотонін, мелатонін, 5-оксіндолюксусна кислота (5-ОІУК), тваринний індикан, печінка, сироватка крові щурів.

Данная работа является фрагментом НИР ХНМУ «Вивчення механізмів біологічної дії простих полієфірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища», государственный регистрационный номер 0110U001812.

Вступление

За последние десятилетия синтезированы десятки, а то и сотни тысяч новых химических веществ, зачастую химически стойких, высокоактивных, обладающих выраженной биотропностью, к которым человек эволюционно не адаптирован [7,3]. Возник значительный разрыв между высокой способностью современной цивилизации создавать новый химический потенциал и ограниченными возможностями по нейтрализации вредного его воздействия на флору и фауну. Такая ситуация обеспечивает реальные условия для формирования различных экологических обусловленных заболеваний и патологических состояний. Вместе с тем, механизмы действия многих химических соединений и их комбинаций в большинстве случаев остаются не изученными [4]. Необходимость всестороннего и глубокого изучения патохимических механизмов формирования патологических состояний, тесно сопряжена с разработкой профилактических мероприятий и коррекцией структурно-метаболических нарушений, которые возникают в условиях длительного субтоксического воздействия на организм химических веществ [8]. Особенно актуальной эта задача становится для новых и совершенно не изученных химических соединений, способных оказывать не только непосредственное токсическое действие на организм, но и формировать развитие возможных отдаленных эффектов-мутагенеза, канцерогенеза, атерогенеза, иммунологической недостаточности, тератогенеза и др. В связи с этим, изучение патофизиологических механизмов действия на организм малых субтоксических доз ксенобиотиков является первоочередной задачей в составлении прогноза потенциальной опасности новых химических соединений, которые находятся на стадии опытного производства и внедрения в народное хозяйство. Это

в полной мере относится и к новому химическому соединению промышленности полиоксипропиленполиолов – олигоэфирциклокарбонату, который нашел широкое применение в различных отраслях народного хозяйства для получения эпоксидных смол, лаков, эмалей, пластмасс, пенопластов, термопластов и др. [4,8,9]. Учитывая вышесказанное, целью работы являлось изучение влияния субтоксических доз олигоэфирциклокарбоната, в условиях длительного поступления в организм, на обмен незаменимой аминокислоты L – триптофан в подостром опыте.

Материалы и методы исследования

Программа исследования предусматривала проведение подострого токсикологического опыта на половозрелых белых крысах популяции Вистар, массой 180-200 г. В соответствии с условиями эксперимента животные ежедневно на протяжении 45 суток утром до кормления с помощью металлического зонда подвергались пероральной заправке водными растворами олигоэфирциклокарбоната марки П-803 из расчета 1/10; 1/100 и 1/1000 ЛД₅₀. Контрольная группа получала соответствующие объемы питьевой воды. На основании параметров острой токсичности П-803 относится к малотоксичным соединениям (4 класс опасности), не обладающим кумулятивными свойствами и видовой чувствительностью. Среднесмертельная доза (ЛД₅₀) для белых крыс была установлена на уровне 18,75 г/кг массы животного, а коэффициент кумуляции (Кк) на уровне 7,82. Выбор данного ксенобиотика для научных исследований был обоснован отсутствием прогностической характеристики потенциальной опасности для теплокровных животных и человека, большими объемами производства, широким контактом населения с данным ксенобиотиком, а также необходимостью обоснования гигиенических нормативов в качестве предельно

* Цитування при атестації кадрів: Багмут И.Ю. Состояние обмена L-триптофана в условиях подострого опыта под влиянием олигоэфирциклокарбоната в субтоксических дозах // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 50 –53

допустимых концентраций в объектах окружающей среды. Проведение подострого опыта сопровождалось соблюдением биозтики и принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для научных и других целей» - Страсбург, 1985 г. Всего было использовано в экспериментальной части работы 40 белых крыс, по 10 в каждой опытной и контрольной группе.

Исследование обмена триптофана предусматривали определение в сыворотке крови опытных и контрольных животных содержания L-триптофана и его метаболитов – серотонина, мелатонина, 5 – оксиндолюксусной кислоты (5-ОИУК), животного индикана, в печени активность фермента триптофан-2,3-диоксигеназы (ТДО). В сыворотке крови определялся также один из конечных продуктов окислительного дезаминирования аминокислот, биогенных аминов, пуриновых азотистых оснований и др. – аммиака (NH₃). Определение аммиака в сыворотке крови осуществлялось методом ионообменной хроматографии на ионитах. После разделения субстратов на ионитах регистрация концентрации NH₃ осуществлялась на автоматическом анализаторе аминокислот Т-339 (Чехия). Триптофан и его метаболиты обмена – серотонин, 5- ОИУК определялись по Atack C., Magnusson T. [10]. Мелатонин исследовался иммуноферментным методом с помощью моноклональных антител. Для этих целей использовался набор реактивов Melatonin ELJSA (Hamburg). Kat-N2RE 54021. О функциональном состоянии процессов превращения аминокислот в толстом кишечнике под влиянием микрофлоры и обезвреживающей функции печени судили по количеству конечного продукта обмена триптофана – животного индикана в сыворотке крови общепринятым методом [2]. Известно, что L-триптофан является стабилизатором фермента ТДО. Способствуя образованию устойчивого конформационного состояния, ТДО печени обладает абсолютной субстратной специфичностью по отношению к L-триптофану и катализирует необратимую ключевую реакцию катаболизма аминокислоты по кинурениновому пути ее обмена с образованием N-формилкинурина, а в последствии одного из ключевых конечных метаболитов – НАД+. Этот фермент ускоряет встраивание молекулярного кислорода непосредственно в молекулу L-триптофана, а катализируемая им реакция является скоростью лимитирующей стадией превращения субстрата. Активность ТДО определяли по Vadahe A.A. – B., Evans M.[11]. Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение влияния олигоэфирциклокарбоната П-803 на обмен скорость лимитирующей аминокислоты L-триптофана обнаружило, что ксенобиотик в 1/10 и 1/100 ЛД₅₀ снижал содержание в плазме крови мелатонина и триптофана на фоне повышения серотонина, 5-ОИУК, индикана, аммиака и активности в печени фермента ТДО (табл.). Так, L-триптофан снижался на 39,04% и 21,64%, мелатонин на 73,79% и 53,23% при этом серотонин повышался на 721,42% и 560,71%, 5-ОИУК на 454,76% и 326,19%, индикан на 269,56% и

179,13%, аммиак повышался на: 128,34% и 92,3%, соответственно под влиянием 1/10 и 1/100 ЛД₅₀. Известно, что триптофан является источником образования никотинамидных коферментных форм (НАД+ и НАДФ) витамина РР – ниацина, синтеза биогенного моноамина – серотонина, гормона – мелатонина, индуктора клеточной дифференцировки и пролиферации – 5 – оксиндолацетата, которые способны оказывать значительное влияние на обменные процессы различных органов и тканей организма [5]. Было убедительно показано влияние серотонина на медиаторные процессы в нервной системе, он выполняет роль местного регулятора функций периферических органов и тканей, является мощным сосудосуживающим агентом и стимулятором сокращения гладкомышечных тканей.

Около 95% серотонина взрослого человека вырабатывается в энтерохромаффинных клетках кишечника. Остальная часть его находится в тучных клетках соединительной ткани кожи, селезенки, печени, почках, легких, эпифизе, коре головного мозга, гипоталамусе, тромбоцитах крови и др. [5]. L-триптофан и непосредственный предшественник серотонин, являются субстратами для синтеза гормона эпифиза, обеспечивающего циркадные ритмы метаболических процессов в организме – мелатонина, который образуется путем N-ацетилирования и последующего метилирования 5-окситриптамина [6]. Этот гормон регулирует половое созревание, теплообмен, дыхание, водно-солевой обмен, бодрствование, циркадную динамику обменных процессов в различных органах и тканях организма в зависимости от времени суток, сезонов года, является иммуномодулятором и активным субстратом, обладающим антирадикальными и антиперекисными свойствами и др. Вместе с тем, L- триптофан может превращаться в желудочно-кишечном тракте под влиянием микрофлоры толстого кишечника в индол, скатол, крезол и др. индольные производные. Конечным продуктом этих превращений, экскретируемых с мочой является в основном 5-оксиндолацетат, который выступает сильным митогенным фактором дифференцировки и пролиферации быстро обновляющихся тканей [5,6]. Эти нарушения характеризовались и существенным повышением продукта окислительного дезаминирования аминокислот, биогенных моноаминов – аммиака (NH₃), а также животного индикана (Табл.). Известно, что главным, если не единственным механизмом, посредством которого активность ТДО влияет на синтез серотонина в организме, служит изменение уровня свободного L-триптофана [5,6]. Исследования обнаружили повышение активности ТДО и снижение содержания L-триптофана в сыворотке крови. В этих метаболических условиях открывается путь повышенного синтеза коферментных форм НАД+ и НАДФ необходимых для усиления окислительно-восстановительных процессов, дифференцировки и пролиферации, как результат защитно-приспособительных реакций организма, которые направлены на активацию восстановительных синтезов в условиях субтоксической токсификации.

Таблица
Влияние олигоэфирциклокарбоната П-803 на состояние обмена L-триптофана в условиях субтоксического длительного поступления в организм.

Показатели	Группа наблюдения, ЛД ₅₀ , М ± m
------------	---

	Контроль	1/10	1/100	1/1000
Л-триптофан (мкм/л)	68,4±3,2	41,7±2,8*	53,6±3,5*	49,6±4,3
Серотонин (мкм/л)	0,56±0,04	4,6±0,52*	3,7±0,46*	0,53±0,05
5-ОИУК (мкм/л)	0,42±0,02	2,33±0,18*	1,79±0,14*	0,38±0,04
Мелатонин (пкг/л)	178,5±7,3	46,8±4,10*	83,5±6,2*	184,7±8,5
Индикан (мкм/л)	2,3±0,26	8,5±0,76*	6,42±0,57*	2,17±0,24
Аммиак (нмоль/л)	24,7±1,54	56,4±4,3*	47,5±3,3*	26,4±2,5
ТДО (нмоль кинурени-на/мг белка·1час)	36,5±2,7	71,6±5,8*	63,7±4,9*	35,6±3,2

Примечание: * различия достоверные, $p < 0,05$

Регуляция ТДО осуществляется по типу обратной связи конечными продуктами кинуренинового пути обмена Л-триптофана - НАД⁺ и НАДФ⁺. Активация фермента сопряжена с повышением содержания субстрата окисления - Л-триптофана. Положительными активаторами фермента ТДО являются ионы Cu²⁺, гематин, ферригем и 6-аминолевуленовая кислота (6-АЛК). Гемин, при этом, является коферментом ТДО. Существенное повышение активности ТДО позволяет судить о снижении белоксинтетической функции синтеза гемоглобина, в результате чего гем окисляется кислородом в гемин, являющийся коферментным активатором данного фермента, а с другой стороны – окисленная форма гема (гемин) тормозит активность митохондриального энзима 6-аминолевуленат-синтазы, катализирующей первую реакцию синтеза гема из сукцинил-КоА из глицина – 6-аминолевуленовой кислоты.

Обнаруженные изменения в обмене Л-триптофана и активности ТДО может свидетельствовать о нарушении сопряженных метаболических процессов, связанных с анаболическими и катаболическими превращениями белков, нейромедиаторов, гормонов, индукторов дифференцировки и пролиферации, конечных метаболитов обмена и др. Значительная часть метаболита Л-триптофана, биогенного амина – серотонина, подвергается окислительному дезаминированию с образованием аммиака, H₂O₂, альдегида, 5-ОИУК, при этом превращение триптофана может быть связано и с синтезом мелатонина, уровни которого были существенно ниже под влиянием 1/10 и 1/100 ЛД₅₀ олигоэфирциклокарбоната. Серотонин занимает промежуточное положение между гормонами и нейромедиаторами. Этот медиатор суживает артериолы и повышает артериальное давление, усиливает перистальтику кишечника, оказывает антидиуретическое действие. В центральной нервной системе серотонин выполняет функцию медиатора и является источником синтеза в эпифизе гормона мелатонина. Литературные источники свидетельствуют, что мелатонин в неонатальном периоде развития влияет на дифференциацию центров головного мозга, контролируя функцию гонад и надпочечников в «критическом» периоде развития [5,6]. Он угнетает секрецию гонадотропинов в гипоталамусе и обуславливает антагонистические взаимоотношения между этим органом и половыми железами, являясь физиологическим ингибитором преждевременного полового созревания. Ему принадлежит важная роль в работе механизма «биологических часов», периодичности активации и ингибирования функций организма в разное время суток, сезонов года [1,5,6].

Результаты динамики серотонина и мелатонина указывают о серьезной дисфункции нейроэндокринной системы в регуляции структурно-метаболических процессов и механизмах развития патологических состояний. Уровень одного из конечных продуктов об-

мена Л-триптофана – животного индикана был значительно повышен под влиянием 1/10 и 1/100 ЛД₅₀ олигоэфирциклокарбоната, что подтверждает увеличение образования конечного токсичного продукта распада Л-триптофана – индола. Эти данные свидетельствуют о нарушении процессов, которые связаны с пищеварением белков на фоне возможного изменения микробиологического профиля кишечника, сопряженных с развитием гнилостных процессов и дисбактериозом [2]. Вместе с тем, исследования показывают на активацию детоксикационной функции печени, что подтверждалось увеличением в сыворотке крови индола, связанного в виде эфирсерной кислоты с калием или натрием (индикан). Известно, что одним из метаболитов обмена Л-триптофана является 3-гидроксиантраниловая кислота, обладающая антиоксидантными свойствами. Она отличается способностью восстанавливать α-токоферол, ассоциированный с липопротеидами низкой плотности (ЛПНП). Анализ полученных результатов обмена Л-триптофана и усиление активности ТДО при токсификации олигоэфирциклокарбонатом, способно вносить определенный вклад в условия формирования кооперативного взаимодействия оксидантно-антиоксидантного гомеостаза, который может быть сопряжен с усилением свободно-радикальных процессов, активацией перекисного окисления липидов, окислительной модификацией белков и развитием мембранной патологии.

Выводы

Изучение обмена Л-триптофана у экспериментальных животных свидетельствует, что олигоэфирциклокарбонат в 1/10 и 1/100 ЛД₅₀ приводит к глубокому нарушению белкового, нейромедиаторного, гормонального, кофакторного обмена, сопровождающихся эндотоксемией, которая подтверждалась увеличением в сыворотке крови содержания аммиака и производного индола – индикана, что является неблагоприятным показателем оценки состояния гомеостатической функции организма. Исследования показывают, что действие ксенобиотика может сопровождаться политропными нарушениями со стороны различных органов, систем и функций, в основе которых лежит свободнорадикальная патология и оксидативный стресс.

Литература

1. Аржевицкая И.А. Основы физиологии обмена веществ и эндокринной системы. – Высшая школа, М.: - 1983, - 271 с.
2. Воронина Л.Н., Десенко В.Ф., Кравченко В.Н. и соавт. Руководство к лабораторным и семинарским занятиям по биологической химии. – Харьков. - «Основа», – 1996. – 430 с.
3. Жуков В.И., Мясоедов В.В., Стеценко С.А. Экологическая характеристика азотсодержащих поверхностно-активных веществ как загрязнителей водоемов. – Харьков: «Торнадо», 2000. – 180 с.

4. Жуков В.И., Попова Л.Д., Зайцева О.В., Кратенко Р.И. и др. Простые и макроциклические эфиры: научные основы водных объектов. – Харьков, «Торнадо» 2000. – 438 с.
5. Науменко Е.В., Попова Н.К. Сератонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. – Новосибирск, «Наука» 1975. – 213 с.
6. Строев Е.А. Биологическая химия. – М.: Высшая школа. 1986. – 470 с.
7. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Щербань Н.Г., Евдокимов В.И., и др. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов. – Белгород, 2001. – 442 с.
8. Цыганенко А.Я., Шаповал Л.Г., Зовский В.Н., Щербань Н.Г., и др. Эколого-гигиеническая характеристика детергентов на основе алкилфенолов, изозонилфенолов и вторичных спиртовых фракций С10-20 как загрязнителей водоемов – Белгород. – «Белвитамины», 2000. – 170 с.
9. Щербань Н.Г., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Капустник В.А. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ. – Харьков, – «Раритеты Украины», 2012. – 120 с.
10. Attack C. Procedure for the isolation of noradrenaline, adrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same tissue sample using a single column of strongly acidic cation exchange resin / C. Attack, T.A Magnusson. // «Acta pharmacol et toxicol».-1978.-V.42.-P.35-57.
11. Badawe A. The effect of chemical porphyrins and drugs on activity of rat liver tryptophan pyrrolase / A. Badawe, M. Evans // Biochem J. – 1973. – Vol.136 – P.885-892.

ENGLISH VERSION: STATE OF EXCHANGE OF L-TRYPTOPHAN IN THE SUBACUTE EXPERIMENT UNDER INFLUENCE OF OLIGOETHERCYCLOCARBONAT IN THE SUBTOXIC DOSES*

Bagmut I.Yu.

Kharkov Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine

The effects of small doses of sub-toxic xenobiotic - oligoethercyclocarbonat type P-803 at the rate of 1/10; to 1/100 and 1/1000 of the body LD₅₀ investigated were in 40 adult Wistar rats in the subacute experiment. In the blood serum of experimental and control animals the content of L-tryptophan and its metabolites - serotonin, melatonin, 5 - oxindolacides acid (5-OIAA), animal indican in liver enzyme activity tryptophan-2,3-dioxygenase (TAR) were determined. The serum is also one of the end products of oxidation deamination of amino acids, biogenic amines, purine nitrogenous bases, etc. - ammonia (NH₃). It was established that xenobiotic 1/10 and 1/100 of reduced content of LD₅₀ in plasma of melatonin and tryptophan against increase of serotonin, 5-OIAA, indican, ammonia and enzyme activity in liver TAR. The results indicate that oligoethercyclocarbonat 1/10 and 1/100 LD₅₀ leads to profound disruption of protein, neurotransmitter, hormone, cofactor metabolism in rats.

Keywords: xenobiotics, L-tryptophan, serotonin, melatonin, 5 - oxindolacides acid (5-OIAA), animal indican, liver, blood serum of rats.

Introduction

Over the past decade synthesized dozens or even hundreds of thousands of new chemicals are often chemically resistant, high-level, with pronounced biotropicality to which a man is not evolutionarily adapted [7, 3]. A significant gap between high ability of modern civilization to create a new chemical potential and limited capacity to neutralize its harmful effects on the flora and fauna originated. This situation provides the real conditions for the formation of various environment-related diseases and conditions. However, the mechanisms of action of many chemical compounds and combinations thereof, in most cases remain unexplored. [4] The need for extensive study pathochemical mechanisms of pathological states, is closely connected with the development of prevention and correction of structural and metabolic abnormalities that occur in long-term effects on the sub-toxic chemicals [8]. Particularly relevant for the task is new and completely unstudied chemical compounds capable of not only the direct toxic effect on the body, but also of shaping the development of possible long-term effects of mutagenesis, carcinogenesis, atherogenesis, immune deficiency, teratogenesis, etc. In this regard, study of pathophysiological mechanisms of action on the organism of small subtoxic doses of xenobiotics is the first priority in making a forecast of the potential dangers of new chemical compounds, which are at the stage of pilot production and implementation of the national economy. This fully applies to the new chemical compound industry polyoxy-

propylene - oligoethercyclocarbonat, which is widely used in various industries for epoxy resins, lacquers, enamels, plastics, foams, thermoplastics, etc. [4, 8, 9]. Given the above, the purpose of the work was to study the effect of sub-toxic doses oligoethercyclocarbonat, in long-term uptake, the exchange of essential amino acid L-tryptophan in subacute experience.

Materials and methods

The research program included a subacute toxicology experiment on mature white Wistar rats weighing 180-200 g in accordance with the conditions of the experiment the animals daily for 45 days in the morning before feeding with a metal probe exposed to aqueous solutions of oral priming oligoethercyclocarbonat type P-803 based 1/10; To 1/100 and 1/1000 of LD₅₀. The control group received the appropriate volume of drinking water. On the basis of acute toxicity parameters P-803 refers to a low-toxic compounds (Hazard Class 4), non-cumulative properties and species sensitivity. Of the mean dose (LD₅₀) to albino rats was set at 18,75 g/kg of animal weight and cumulation coefficient (CC) at the level of 7,82. Selecting this xenobiotic for research was justified lack of prognostic characteristics of the potential hazard to warm-blooded animals and humans, large volumes of production, wide track undelivered xenobiotic population and the need to justify the hygienic standards as maximum allowable concentrations in the environment. Conducting subacute experience accompanied by the observance of

* To cite this English version: Bagmut I.Yu.. State exchange L-tryptophan of the subacute experiment under influence oligoethercyclocarbonat in the subtoxic doses // Problemy ekologii ta medytyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 53 -55.

the principles of bioethics and the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for research and other purposes" - Strasbourg, 1985 Total was used in the experimental part of 40 white rats, 10 in each experimental and control group.

Investigation included the determination of tryptophan metabolism in the serum of control and experimental animals L-tryptophan content and its metabolites - serotonin, melatonin, 5 - oxindolacetic acid (5-OIAA), animal indican in liver enzyme activity tryptophan-2,3-dioxygenase (TAR). The serum is also one of the end products of oxidative deamination of amino acids, biogenic amines, purine nitrogenous bases, etc. - ammonia (NH_3). Determination of ammonia in the serum was carried out by ion exchange chromatography on ionity exchangers. After separation of the substrate on ion-exchangers registration NH_3 concentration was carried out on an automatic amino acid analyzer T-339 (Czech Republic). Tryptophan and its metabolites exchange - serotonin, 5 - HIAA were determined by Attack C., Magnusson T. [10]. Melatonin was investigated by ELISA using monoclonal antibodies. Used for these purposes reagent kit Melatonin ELISA (Hamburg), Kat-N₂RE 54021. On the functional state of transformation processes of amino acids in the colon under the influence of microflora and the detoxifying function of the liver judged by the amount of the final product of tryptophan metabolism - indican animal serum conventional method [2]. It is known that L-tryptophan is an enzyme stabilizer TAR. Promoting the formation of stable conformational state, TAR liver has absolute substrate specificity for L-tryptophan and irreversibly catalyzes the key reaction for the catabolism of the amino acid exchange kynurenin its path to form N-formylkynurenine and later end of one of the key metabolites - NAD^+ . This enzyme accelerates the insertion of molecular oxygen directly into the molecule of L-tryptophan, and their reaction is catalyzed conversion step speedlimit substrate. TAR activity determined by A.A. Badawe - V., Evans M. [11]. Statistical processing of the results of the study were performed using Student's test, Fisher.

Results and discussion

Studying the influence of P-803 oligoethercyclocarbonat exchange rate limiting amino acid L-tryptophan found that xenobiotic 1/10 and 1/100 of reduced content of LD₅₀ in plasma melatonin and tryptophan against increase serotonin 5OIAUK, indican, ammonia, and the activity of the liver enzyme TAR (Table). Thus, L-tryptophan was reduced by 39.04% and 21.64%, 73.79% by melatonin and 53.23% with serotonin increased by 721.42%, and 560.71%, 5-OIAA at 454.76 % and 326.19%, 269.56% by indican and 179.13%, 128.34% ammonia and 92.3%, respectively, under the influence of 1/10 and 1/100 of LD₅₀. It is known that tryptophan is a source of nicotinamide coenzyme forms (NAD^+ and NADP^+) of vitamin E - niacin synthesis of biogenic monoamines - serotonin, a hormone - melatonin inducer of cell differentiation and proliferation - 5 - oxindolacetic acid that can have a significant effect

on the metabolism of various organs and tissues of the body [5]. Convincingly shows the effect of serotonin on the mediator processes in the nervous system, it acts as a local regulator function of peripheral organs and tissues, is a potent vasoconstrictor and stimulator of smooth muscle tissue.

Approximately 95% of serotonin is produced in the adult intestinal enterochromaffin cells. The rest of it is in the mast cells of the connective tissue of the skin, spleen, liver, kidney, lung, pineal gland, brain cortex, hypothalamus, blood platelets, etc. [5]. L-tryptophan and the immediate precursor of serotonin, are substrates for the synthesis of the hormone of the pineal gland, which provides circadian rhythms of metabolic processes in the body - melatonin, which is produced by N-acetylation and the next methylation 5-HT. [6] This hormone regulates puberty, heat, wind, water-salt metabolism, wakefulness, circadian dynamics of metabolic processes in different organs and tissues of the body, depending on the time of day, seasons of the year, an immunomodulator and active substrate having antiradical and antiperoxidant properties, etc. However, L-tryptophan can be converted into gastrointestinal tract under the influence of colonic microflora to indole, skatole, indole etc. cresol and derivatives. The final product of these transformations, is excreted in the urine mainly 5-oxindolacetic acid that acts potent mitogenic factor in differentiation and proliferation of rapidly renewing tissues [5, 6]. These disorders are characterized, and a significant increase of oxidative deamination of amino acids, biogenic monoamines - ammonia (NH_3), as well as animal indican (Table). It is known that the main, if not the only mechanism through which TAR activity interferes with the synthesis of serotonin in the body is the change in the level of free L-tryptophan [5,6]. Studies have found increased activity and reduced tar content of L-tryptophan in the blood serum. In these metabolic conditions opens the way of the increased synthesis of coenzyme forms of NAD^+ and NADP^+ needed to enhance the redox processes, differentiation and proliferation, as a result of protective and adaptive reactions of the organism, which are aimed at reducing the activation of synthesis conditions subtoxicity toxications.

TAR regulation is carried out by the feedback end products kynurenine pathway of L-tryptophan- NAD^+ and NADP^+ . Activation of the enzyme is associated with increased levels of substrate oxidation - L-tryptophan. TAR enzyme activators positive ions are Cu^{2+} , hematin, and ferric 6-aminolevulinic acid (6-ALA). Hemin, thus, is a coenzyme TAR. A significant increase in the activity of the TAR to judge cut proteinsynthesizing function of hemoglobin synthesis, resulting in heme is oxidized by oxygen in hemin being coenzyme activator of the enzyme, on the other hand - the oxidized form of heme (hemin) inhibits the activity of the mitochondrial enzyme 6-aminolevulinic acid synthetase catalyzes the first reaction heme synthesis of succinyl CoA from glycine ~ - 6-aminolevulinic acid.

Table

Influence of oligoethercyclocarbonat P-803 on the state exchange of L-tryptophan under subtoxic long intake of

Indicators	Observation group, LD ₅₀ , M ± m			
	Control	1/10	1/100	1/1000
L-tryptophan (mkm/l)	68,4±3,2	41,7±2,8*	53,6±3,5*	49,6±4,3
Serotonin (mkm/l)	0,56±0,04	4,6±0,52*	3,7±0,46*	0,53±0,05
5-OIAA (mkm/l)	0,42±0,02	2,33±0,18*	1,79±0,14*	0,38±0,04
Melatonin (pkg/l)	178,5±7,3	46,8±4,10*	83,5±6,2*	184,7±8,5
Indican (mkm/l)	2,3±0,26	8,5±0,76*	6,42±0,57*	2,17±0,24
Ammonia (nmol/L)	24,7±1,54	56,4±4,3*	47,5±3,3*	26,4±2,5
TAR(nmolkynurenina /mg protein • 1 hour)	36,5±2,7	71,6±5,8*	63,7±4,9*	35,6±3,2

Note: * difference reliable, $p < 0,05$

The observed changes in the exchange of L-tryptophan and activity of TAR may indicate inappropriate conjugate metabolic processes associated with anabolic and catabolic transformations of proteins, neurotransmitters, hormones, inducers of differentiation and proliferation, end metabolites exchange, etc. Much of the metabolite of L-tryptophan, a biogenic amine - serotonin is oxidation deamination with the formation of ammonia, H₂O₂, aldehyde, 5-OIAA, wherein the conversion of tryptophan may be associated with the synthesis of melatonin levels were significantly lower than that under the influence of 1/10 and 1/100 of oligoethercyclocarbonat LD₅₀. Serotonin is intermediate between hormones and neurotransmitters. This narrows the mediator arterioles and increases blood pressure, increases peristalsis, exerts an antidiuretic effect. In the central nervous system, serotonin functions as a neurotransmitter and a source of synthesis in the pineal gland hormone melatonin. Literary sources indicate that melatonin neonatal development affects the differentiation centers of the brain that controls the function of the gonads and adrenal glands in the "critical" period of development [5, 6]. It inhibits the secretion of gonadotropins in the hypothalamus and causes the antagonistic relationship between this body and the gonads, as a physiological inhibitor of precocious puberty. It played an important role in the mechanism of "biological clock", the frequency of activation and inhibition functions of the body at different times of day, seasons of the year [1, 5, 6].

The results of the dynamics of serotonin and melatonin indicate a serious dysfunction of the neuroendocrine system in the regulation of structural and metabolic processes and mechanisms of pathological conditions. The level of one of the end products of metabolism of L-tryptophan - animal indican was significantly increased under the influence of 1/10 and 1/100 of oligoethercyclocarbonat LD₅₀, which confirms the increase of formation of the final product toxic decay L-tryptophan - indole. These data suggest inappropriate processes that are associated with digestion of proteins on the background of a possible change in intestinal microbial profile associated with the development and putrefaction dysbiosis [2]. However, studies indicate activation detoxifying liver function was confirmed by the increase in serum indole associated as ethersulfur acid with potassium or sodium (indican). It is known that one of the metabolites of the exchange of L-tryptophan is 3-hydroxyanthranilic acid, which has antioxidant properties. It is characterized by the ability to recover α -tocopherol, associated with low density lipoproteins (LDL). Analysis of the results of exchange of L-tryptophan and increased activity in the TAR oligoethercyclocarbonat toxification is able to make some contribution to the conditions of formation of cooperative interaction between oxidant-antioxidant homeostasis,

which may be associated with increasing free-radical processes, activation of lipid peroxidation, oxidative modification of proteins and development of membrane pathology.

Conclusions

The study of the exchange of L-tryptophan in experimental animals suggests that oligoethercyclocarbonat in 1/10 and 1/100 LD₅₀ leads to profound disruption of protein, neurotransmitter, hormone, cofactor metabolism, accompanied by endotoxemia, which was confirmed by an increase in serum ammonia and indole derivative - indican, which is a measure of the adverse assessment of the homeostatic functions of the body. Studies show that the effect may be accompanied by xenobiotic polytropic disorders various organs, systems and functions, which are based on free radical pathology and oxidative stress.

References:

1. Arzhevitskaya I.A. Basic physiology of metabolism and the endocrine system. - Higher School, Moscow - 1983, - 271 p.
2. Voronin L.N. Desenko V.F. Kravchenko, V.N. et al. Guide to laboratory and seminars on biological chemistry. - Kharkiv. - "Base" - 1996. - 430 p.
3. Zhukov V.I., Myasoedov V.V., Stetsenko S.A. Ecological and hygienic characteristics of nitrogen-containing surfactants as pollutants reservoirs. - Kharkov: "Tornado", 2000. - 180 p.
4. Zhukov V.I., Popova L.D., Zaitseva O.V., Kratenko R.I. etc. Simple and macrocyclic esters: scientific basis of water bodies. - Kharkov, "Tornado" in 2000. - 438 p.
5. Naumenko E.V., Popova N.K. Serotonin and melatonin in the regulation of the endocrine system. - Novosibirsk, "Science" in 1975. - 213 p.
6. Stroyev E.A. Biological Chemistry. - Moscow: Higher School. 1986. - 470 p.
7. Tsiganenko A.Y., Zhukov V.I., Scherban N.G., Evdokimov V.I., et al. Scientific fundamentals justify forecast potential danger detergents in connection with regulation of water in reservoirs. - Belgrade, 2001. - 442 p.
8. Tsiganenko A.Y., Shapoval L.G., Zovsky V.N. Scherban N.G., and other Environmental and hygienic characteristics detergents based on alkylphenols izozonifenols and secondary alcoholic fractions C10-20 as a pollutant reservoirs - Belgorod. - "Belvitamins", 2000. - 170 p.
9. Scherban N.G., Zhukov V.I., Myasoedov V.V., Capustnic V.A. Biochemical mechanisms radiomimetic effects of surfactants. - Kharkiv - "Rarities of Ukraine", 2012. - 120 p.
10. Atack C., Magnusson T.A. Procedure for the isolation of noradrenaline, adrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same tissue sample using a single column of strongly acidic cation exchange resin // «Acta pharmacol et toxicol». -1978.-V.42.-P. 35-57.
11. Badawe A., A. - B., Evans M. The effect of chemical porphrogens and drugs on activity of rat liver tryptophan pyrrolase // Biochem J. - 1973. - Vol.136 - P.885-892.

Матеріал надійшов до редакції 30.05.2014 р.

МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

© Харченко О.В.
УДК 616.33 – 006 : 616 – 07

КОМПЛЕКСНА ДІАГНОСТИКА ВИРАЗКОВО-ІНФІЛЬТРАТИВНОГО РАКУ ШЛУНКА*

Харченко О.В.

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г.Короленка, м. Полтава

Комплексная диагностика, проведенная при помощи гистологического метода с определением митотического режима, иммуногистохимического маркера Ki-67 (клон MIB-1) и маркера генотипирования ISSR-PCR показала изменения эпителия слизистой оболочки желудка характерные для неоплазии слизистой оболочки желудка у пациентов с язвенно-инфильтративным раком желудка. Экспансия маркера генотипирования ISSR-PCR свидетельствует о его высокой чувствительности и информативности. Существует корреляционная связь между показателями гистологического, иммуногистохимического и показателями генотипирования при помощи реакции ISSR-PCR. Коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} между показателями митотического режима, пролиферативной активности эпителия слизистой оболочки желудка маркера Ki-67 и показателями генотипирования эпителия слизистой оболочки желудка составляет соответственно 0,197, 0,607 и 0,881, что свидетельствует о существовании соответственно умеренной и значительной по тесноте связи между показателями. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.

Ключевые слова: митотический режим, маркер Ki-67, генотипирование.

Вступ

Основною причиною смерті в розвинутих країнах поряд із смертністю від серцево-судинних процесів і їх ускладнень є смертність від злоякісних пухлин. Рак шлунка щороку вражає 750 – 870 тис. чоловік в світі, на його частку припадає 10% від летальних випадків, обумовлених пухлинною патологією. В Україні в 2009р. рак шлунка займав 3-є (9,0%) місце в структурі онкопатології чоловіків і 6-е (5,6%) місце у жінок; в структурі онкосмертності він посідає 2-ге (11,8 і 9,3%) місце в обох групах [5, 10].

Передумовами розвитку раку шлунка з хронічної виразки шлунка прийнято вважати досліджувані в науколишній її слизовій оболонці змінення типу хронічного гастриту, що супроводжується дисрегенераторними процесами з утворенням дисплазій епітелію [1, 3, 6]. Останні, особливо тяжкого ступеня, часто бувають маркером існування поблизу ракової пухлини [11].

Складними для діагностики є виразково-інфільтративні раки шлунка. Вказана форма раку на ранніх стадіях може симулювати звичайну виразку, це утруднює її диференційну діагностику з останньою [4, 6]. Виразкова ракова пухлина шлунка може, як і звичайна виразка загоюватись. Але загоювання знову змінюється на виразкування і такі цикли можуть повторюватись неодноразово. Через те, що рак шлунка розвивається порівняно повільно такі цикли можуть повторюватись неодноразово [6, 12].

Метою даного дослідження є комплексна діагностика передпухлинних змін в слизовій оболонці шлунка та виявлення раку шлунка за допомогою гістологічного, імуногістохімічного та молекулярно-біологічного методів.

Матеріал та методи досліджень

В роботу покладено результати дослідження 50 спостережень виразково-інфільтративного раку шлунка. Оперативно видалені шлунки досліджені з метою виявлення морфологічних особливостей стану слизової оболонки шлунка.

Отримані зразки слизової оболонки шлунка досліджували загальногістологічним методом за стандартними схемами, що включає фіксацію тканини в нейтральному формаліні. Матеріал обробляли у парафіновій заливці. Зрізи забарвлювали гематоксиліном-еозином і пікрофуксином за ван-Гізеном.

Імуногістохімічне виявлення проліферації епітелію слизової оболонки шлунка проводили за допомогою маркеру Ki-67 на депарафінованих зрізах товщиною 4-5 мм., із попередньою демаскіруванням антигену в цитратному буфері (pH 6,0) у мікрохвильовій печі протягом 10 хв. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла до Ki-67 (клон MIB-1). Інкубацію з первинними антитілами проводили протягом 18 годин. Ідентифікація реакції проводилась за допомогою хромогену 3,3'-діамінобензидин тетрагідроду (DAB, Dako Cytomation). Зрізи контрастували за допомогою гематоксиліна-еозина.

* Цитування при атестації кадрів: Харченко О.В.. Комплексна діагностика виразково-інфільтративного раку шлунка // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 56 – 58

Паралельно проводили дослідження слизової оболонки шлунка за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Застосовували ISSR-PCR метод з використанням ISSR – праймеру S2, який має структуру: (AGC)₆G [7, 8, 9, 13].

Ампліфікацію проводили в 25 мкл реакційної суміші. ДНК додавали в кількості 10 – 20 нг на реакцію. Температура відпалу праймера становила 57°C, синтез фрагментів ДНК проходила в 30 циклах ампліфікації [8].

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 2%-му горизонтальному агарозному гелі (Вагофор, Латвія).

Візуалізацію електрофореграм проводили на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі довжиною хвилі 365 нм з наступним фотографуванням.

Визначення розмірів ампліконів виконували за допомогою маркера молекулярної маси 1000bp DNA-Ladder, pUC 19 DNA/ Msp I («Fermentas», Літва)[8, 13].

Для оцінки вираження порушень мітозу використовували визначення мітотичного режиму за прийнятою методикою. Підрахунок мітозів проводили під іммерсійним збільшенням мікроскопу в 100 полях зору. Визначали мітотичний індекс (MI) – кількість мітозів на 1000 клітин, визначених у промілях(‰), кількість мітозів які знаходяться в метафазі в процентах(%), кількість патологічних мітозів в процентах(%) [2].

Результати імуногістохімічних реакцій оцінювали шляхом підрахунку відсотка позитивних клітин із різною інтенсивністю, яку оцінювали візуально. Аналізували 800–1000 епітеліальних клітин в кожному випадку. Проліферативний потенціал (індекс проліферації) визначали при підрахунку кількості клітин, що експресують Ki-67. При IM (індекс мітки) Ki-67<10,0% – низька, IM Ki-67≥30,0% – висока проліферативна активність.

Достовірність різниці середніх порівнюваних показників оцінювали за критеріями (t) Стюдента. Різниця між порівнюваними величинами вважалась значимою, як що допустима помилка (p) була менша за 0,05.

Кількісна оцінка кореляційного зв'язку оцінювалась за значеннями коефіцієнтів кореляції у межах від -1 до +1. Від'ємні значення коефіцієнтів указують на зворотний зв'язок, додатні – на прямий. Нульове значення може свідчити про відсутність зв'язку. Інтенсивність зв'язку (слабкий зв'язок – помірний – суттєвий – сильний) оцінювали за абсолютним значенням коефіцієнтів кореляції.

Результати та їх обговорення

У пацієнтів, хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, що розвинувся на фоні виражених форм хронічного атрофічного і атрофічно-гіперпластичного гастриту в слизовій оболонці шлунка навколо пухлини, пілоричного відділу і малої кривизни достовірної різниці показника мітотичного індексу (MI) не знайдено (рис. 1).

Показник мітотичного індексу в тілі (Т) шлунка (15,5±4,2‰) був достовірно нижче (p<0,05) ніж на ділянці навколо пухлини(НП)(33,1±11,8‰), пілоричному(П) відділі (27,5±5,8‰) і на малій кривизні(МК)(25,5±3,9‰) (рис. 1).

Між показниками кількості мітозів метафазі в пілоричному відділі (51,5±3,3%), на малій кривиз-

ні(51,9±2,2%) та навколо пухлини(56,9±5,8%) достовірної різниці не знайдено (p>0,05).

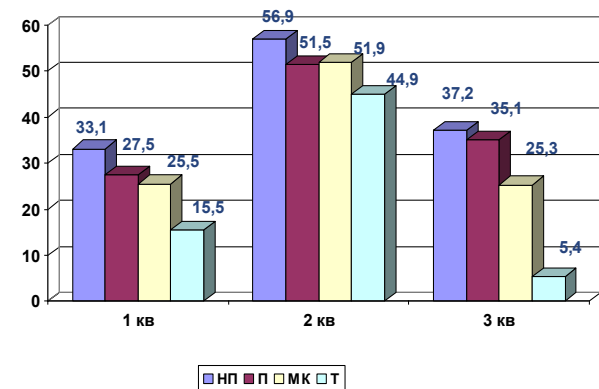


Рис. 1. Мітотичний режим епітелію слизової оболонки шлунка хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка. 1 кв – мітотичний індекс(‰). 2 кв – кількість мітозів у метафазі(%). 3 кв – кількість патологічних мітозів(%).

В тілі шлунка кількість мітозів в метафазі(44,9±2,8%) була достовірно нижчою(p<0,01) ніж на ділянці навколо пухлини(56,9±5,8%) та в інших регіонах слизової оболонки шлунка.

Досліджені патологічні мітози (рис. 1), відзначались достовірним зниженням (p<0,001) в тілі шлунка (5,4±1,1%) відносно ділянки навколо пухлини (37,2±3,5%), пілоричного відділу (35,1±2,7%) та малої кривизни (25,3±3,3%), а також відмічена достовірна різниця між пілоричним відділом (35,1±2,7%) і малою кривизною(25,3±3,3%) (p<0,05).

За допомогою маркера Ki-67(клон MIB-1) виявлена висока проліферативна активність епітелію слизової оболонки шлунка з індексом мітки >30,0% (рис.2).

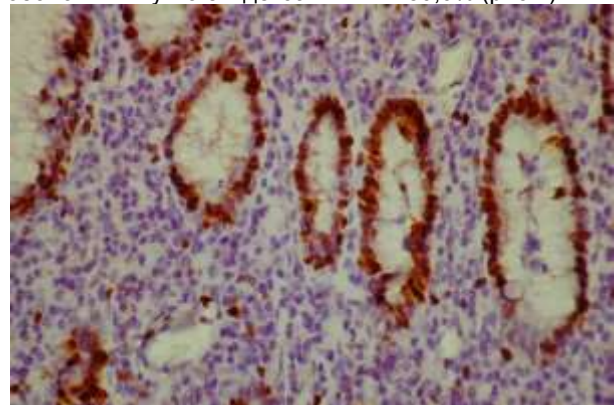


Рис.2. Висока проліферативна активність в епітелії ямок із дисплазією на фоні хронічного гастриту. Маркер Ki-67(клон MIB-1).

Спостерігається залежність між показниками кількості патологічних мітозів, мітозів на стадії метафазі, мітотичного індексу з вираженням проліферативної активності епітелію слизової оболонки в різних топографо-анатомічних відділах шлунка.

В тілі шлунка де, в порівнянні з іншими регіонами, показники мітотичного режиму нижчі, достовірно рідше виявляється виражена проліферативна активність епітелію з дисплазією слизової оболонки шлунка (p<0,001).

Зростання кількості патологічних мітозів, мітотичного індексу, та мітозів на стадії метафазі в пілоричному відділі, на малій кривизні і навколо пухлини корелює із збільшенням проліферативної активності

епітелію слизової оболонки шлунка з індексом мітки $\geq 30,0\%$.

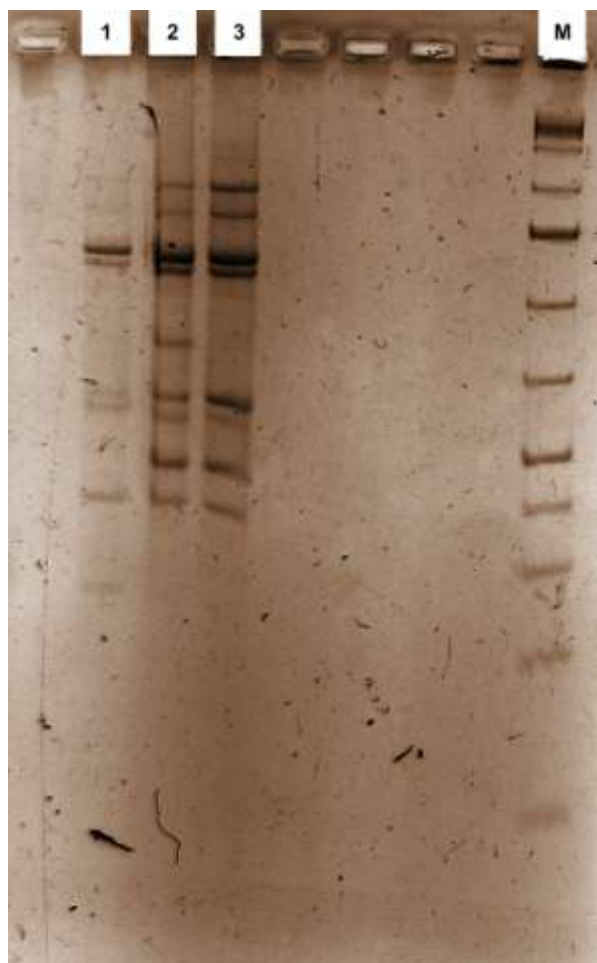


Рис. 3. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка: 1,2,3 – ДНК-профілі відповідають маркеру пухлини; М – маркер розміру фрагментів ДНК.

Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка виявило досить стабільні ДНК-профілі представлені експансією фрагментів розміром 520 та 620 п.н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях (рис. 3) і мали повну відмінність від профілю маркеру норми.

Із збільшенням показників мітотичного режиму збільшується проліферативна активність покривно-ямкового епітелію і епітелію залоз. В тілі шлунка, де показники мітотичного режиму найменші в порівнянні з іншими регіонами шлунка, достовірно рідше ($p < 0,001$) виявляється проліферативна активність епітелію і зазначена індексом мітки $< 10,0\%$.

Зважаючи на те, що у всіх спостереженнях, за результатами генотипування, були одержані ДНК-профілі де була явна експансія фрагментів розміром від 520 до 620 п.н. їх можна вважати за маркер наявності в пацієнта пухлини.

Між показниками мітотичного режиму слизової оболонки шлунка, вираженням проліферативної активності дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за маркером Ki-67 хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка та показниками генотипування епітелію слизової оболонки коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,197, 0,607 та 0,881, що свідчить

про існування відповідно слабкого, значного та сильного за тіснотою зв'язку. Коефіцієнт детермінації $D = r_{xy}^2$ дорівнював відповідно 0,039, 0,369 та 0,776. Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,95 дорівнює 0,2732. Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,99 дорівнює 0,3511. Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з критичним значенням r_{cr} для значущості 0,95 відповідало відповідно $r_{xy} < r_{cr}$ та $r_{xy} > r_{cr}$. Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з критичним значенням r_{cr} для значущості 0,99 відповідало відповідно $r_{xy} < r_{cr}$ та $r_{xy} > r_{cr}$. Коефіцієнт коваріації склав відповідно 0,389, 3,442 та 0,859. Між показниками мітотичного режиму, проліферативної активності дисплазії епітелію та показниками генотипування слизової оболонки шлунка виявлена статистично достовірна залежність з ймовірністю 0,99.

Висновки

За допомогою гістологічного методу встановлено, що при виразково-інфільтративному раку шлунка виявлені високі показники мітотичного режиму епітелію слизової оболонки.

Тенденція зростання показників мітотичного режиму у відділах шлунка відбувається в напрямку $T \rightarrow MK \rightarrow P \rightarrow NP$.

При виразково-інфільтративному раку шлунка генотипування слизової оболонки шлунка виявило стабільні ДНК-профілі представлені експансією ампліконів розміром 520 та 620 п.н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях. Це свідчить про їх генетичну однотипність, злоякісність і можливість використовувати як маркер малігнізації.

Застосування методу ISSR-PCR дає можливість ранньої діагностики раку шлунка з матеріалу слизової оболонки.

Показники імуногістохімічного методу корелюють із гістологічним методом і показниками генотипування за реакцією ISSR-PCR. Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} між показниками мітотичного режиму, проліферативної активності епітелію слизової оболонки шлунка за маркером Ki-67 і показниками генотипування епітелію слизової оболонки шлунка дорівнює відповідно 0,197, 0,607 та 0,881, що вказує на існування відповідно помірного та значного за тіснотою зв'язку між показниками з ймовірністю 0,99.

Морфологічна діагностика раку шлунка повинна базуватись на комплексній оцінці ознак, відрізняючих його дисплазії епітелію та інших змін що симулюють пухлину, співставляючи результати патогістологічних, імуногістохімічних досліджень і генотипування.

Перспективи подальших досліджень

В подальшому комплексні дослідження планується провести на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка у хворих з хронічними захворюваннями шлунка.

Література

1. Аруин Л.И. Международная классификация хронического гастрита: что следует принять и что вызывает сомнения / Л.И.Аруин, А.В.Кононов, С.И.Мозговой // Арх. пат. – 2009. – Вып.4. – С. 11 – 18.
2. Казанцева И.А. Патология митоза в опухолях человека / И.А. Казанцева – Новосибирск.: Наука, 1981. – 144 с.
3. Кононов А.В. Морфогенез атрофии слизистой оболочки желудка как основа фенотипа хронического гастрита / А.В.Кононов, С.И.Мозговой, М.В. Маркелова, А.Г.Шиманская // Арх. пат. – 2011. – Вып.3. – С. 26 – 31.

4. Марковський В.Д. Комплексна патоморфологічна диференційна діагностика передпухлинних процесів і раку шлунка / В.Д.Марковський, О.В. Харченко// Патологія. – 2012. №3. – С.15 – 18.
5. Рак в Україні, 2009 – 2010. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюл. нац. канцерреєстру України. – 2011. – Т.12., № 1. – С. 22, 37 – 38.
6. Садчиков В.Д. Хроническая язва и рак желудка / В.Д.Садчиков, А.С.Дудниченко, М.В.Садчикова // Проблемы медицинской науки та освіти. – 2000. - №3. – С. 17 – 20.
7. Харченко О.В. Перспективи методу ISSR-PCR та морфологічних методів при вивченні функціонального онкогену та фенотипу злоякісних пухлин / О.В.Харченко, В.М.Балацкий, О.В.Москаленко// Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2007. – Т.13, №1. – С. 204 – 206.
8. Харченко О.В. ISSR-PCR в дослідженні злоякісної перестройки ДНК слизової оболонки шлунка / О.В.Харченко // Сучасні проблеми патологічної анатомії: Матеріали VIII міжнародного конгресу патологів України, 21 – 23 травня 2008 р. – Полтава, 2008. – С.19.
9. Харченко О.В. Динаміка проявів фенотипу дисплазій епітелію слизової оболонки шлунка у відповідності з їх генотипом на матеріалі вивчення світлової мікроскопії та ДНК-типуювання за методом ISSR-PCR / О.В.Харченко // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2009. –Т. 15, №2. – С. 396 – 402.
10. Янкин А.В. Скрининг рака желудка / А.В.Янкин // Прак. Онкология. – 2010. – №11(2). – С.96 – 101.
11. Farinati F. Early and advanced gastric cancer during Follow-up of apparently benign gastric ulcer: Significance of the presence of epithelial dysplasia / F. Farinati, F. Cardin, F. Di Mario //J.Surg.Oncol. – 1987. – Vol.36, №4. – P. 263 – 267.
12. Nagayo T. Histogenesis and precursors of human gastric cancer. Research and practice./ NagayoT. – Berlin: Springer-Verlag. – 1988. – 190p.
13. Пат.76768 UA, МПК А61В 10/00. Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка: Пат.76768 UA, МПК А61В 10/00 / О.В.Харченко (UA); В.Д.Марковський (UA); В.М.Балацкий(UA). №u201209011; Заявл.23.07.2012; Опубл. 10.01.2013; Бюл.№1. -3 с.

ENGLISH VERSION: COMPLEX DIAGNOSTICS OF ULCEROINFILTRATIVE GASTRIC CANCER*

Kharchenko O.V.

Poltava National Pedagogical University named after V.G.Korolenko, Poltava

Complex diagnostics, made by the histological method, specifying the mitotic regimen, immunohistochemical Ki-67 marker (MIB-1clone) and ISSR-PCR marker of genetic typing showed lesions in gastric mucosa epithelium, specific to gastric mucosa epithelium neoplasia in patients with ulceroinfiltrative gastric cancer. Expansion of ISSR-PCR marker of genetic typing indicates its high sensitivity and informativeness. There is a strong correlation between the indices of histological, immunohistochemical and indices of genetic typing, detected by the ISSR-PCR method. Between the indices of mitotic regimen, proliferative activity of gastric mucosa epithelium of Ki-67 marker and indices of genetic typing of gastric mucosa epithelium, the Pearson's correlation coefficient, r_{xy} , constitutes 0,197, 0,607 and 0,881, respectively, corresponding to the existence of moderate and considerable relationship between indices. The overall result shows statistically significant dependence with probability of 0,99.

Key words: mitotic regimen, Ki-67 marker, genetic typing.

Introduction

The main cause of death in developed countries, along with mortality from cardiovascular processes and their complications, is mortality from malignant tumors. Every year gastric cancer affects 750 – 870 thousand people in the world; it accounts for 10% from fatal outcomes, caused by neoplastic pathology. In 2009 gastric cancer in Ukraine took the 3rd (9.0%) place in the structure of male oncopathology and the 6th (5.6%) place in the female one; in the structure of oncomortality it takes the 2nd (11.8 and 9.3%) place in both groups [5, 10].

Lesions in mucosa, surrounding gastric ulcer, e.g., chronic gastritis, which are followed by dysregenerative processes with the development of epithelial dysplasia [1, 3, 6] are strongly believed to be predictors of gastric cancer development. The latter, especially the severe ones, are often identified as the marker of cancer, growing nearby [11].

Ulceroinfiltrative gastric cancers are complicated for diagnostics. At early stages this form of cancer may stimulate typical ulcer, making it difficult to make differentiated diagnostic with the latter [4, 6]. Ulcerated gastric cancer, as well as typical ulcer, may be healed. But, again, the process of healing is replaced by ulceration

and such cycles may occur repeatedly. Due to the fact that gastric ulcer develops comparatively slowly, such cycles may occur repeatedly [6, 12].

The purpose of the research is complex diagnostics of pretumor changes in gastric mucosa and diagnosis of gastric cancer by histological, immunohistochemical and molecular- biological methods.

Materials and Methods

The paper considers findings of 50 examinations of ulceroinfiltrative gastric cancer. Surgically extracted stomachs have been examined with the purpose to detect morphological features of gastric mucosa condition.

The obtained samples of gastric mucosa have been studied by conventional histological method according to standard regimen, including fixation of tissue in neutral formalin. The material was processed in paraffin coating. Sections were colored in hematoxylin-eosin and picrorosein according to Van-Gison.

Immunohistochemical detection of proliferation of gastric mucosa epithelium has been performed by Ki-67 marker on deparaffined sections of 4-5 mm thick with prior antigen damasking in citrate buffer (pH 6,0) in microwave oven during 10 min. Monoclonal antibodies have been applied to Ki-67 (MIB-1clone) as primary ones. In-

* To cite this English version: Kharchenko O.V. Complex diagnostics of ulceroinfiltrative gastric cancer // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 59 -62.

cubation with primary antibodies has been performed during 18 hours. Identification of reaction has been performed by the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Dako Cytomation). Sections were contrasted by hematoxylin-eosin.

At the same time the analysis of gastric mucosa has been carried out by the polymerase chain reaction. The ISSR-PCR method has been applied, using the S2 ISSR-primer with the following structure: (AGC)₆G[7, 8, 9, 13].

Amplification has been made in 25 mcl of reaction mixture. DNAs were added, numbered in 10 – 20 ng per reaction. The temperature of primer's shooting was 57°C, synthesis of the DNA fragments ran in 30 cycles of amplification [8].

Electrophoretic amplification-products separation has been made in 2%-horizontal agarose gel (Vagofor, Latvia).

Visualization of electrophoregrams have been done on transilluminator by ultraviolet light with wave length of 365 nm with further photographing.

Amplicones were measured by the marker of molecular weight of 1000 bp DNA-Ladder, pUC 19 DNA/ Msp I («Fermentas», Lithuania)[8, 13].

Mitotic regimen has been conventionally defined to estimate the manifestation of mitosis disorders. Mitoses have been calculated under immersion microscope magnification of 100 visual fields. Mitotic index (MI), i.e., number of mitoses per 1000 cells measured in per mille (‰), number of mitoses in metaphase, measured in percent (%) and number of pathological mitoses, measured in percent, has been defined [2].

Findings of immunohistochemical reactions have been evaluated by calculation of ratio of positive cells with various intensity, estimated visually. 800–1000 epithelial cells have been analyzed on a case-by-case basis. Proliferative potential (index of proliferation) has been defined while calculating the number of cells, expressing the Ki-67 marker. In MI (marker index), where Ki-67<10,0%, proliferative activity is low, and in IM, where Ki-67≥30,0%, proliferative activity is high.

Reliability of difference of mean comparison indices has been estimated by the Student's t-criteria. The difference between comparison values was considered to be significant, if allowable error (p) was less than 0,05.

Quantitative assessment of correlation has been estimated by the value of correlation coefficients within the limits from -1 to +1. Coefficients' negative values indicate the back relation, and positive values indicate the direct relation. Zero value may indicate the absence of relation. Intensity of relation (weak – moderate – considerable – strong relation) has been estimated by the absolute value of correlation coefficients.

Results of the research

No significant difference of mitotic index (MI) has been found in patients with ulceroinfiltrative gastric cancer, developed in gastric mucosa around tumor against the background of manifested forms of chronic atrophic and atrophic- hyperplastic gastritis, in the pyloric part and lesser curvature of stomach (Fig. 1).

The rate of mitotic index in the body(B) of stomach (15,5±4,2‰) was significantly lower (p<0,05) than in the area around the tumor(AT) (33,1±11,8‰), pyloric(P) part (27,5±5,8‰) and lesser curvature (LC)(25,5±3,9‰) (Fig. 1).

No significant difference (p>0,05) has been found between the rates of number of mitoses at metaphase in

pyloric part (51,5±3,3%), lesser curvature (51,9±2,2%) and around the tumor (56,9±5,8%).

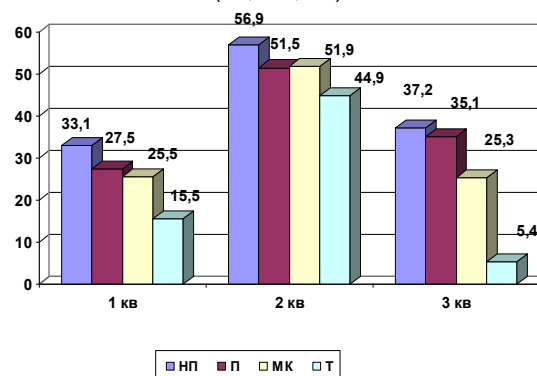


Fig. 1. Mitotic regimen of gastric mucosa epithelium of patients with ulceroinfiltrative gastric cancer. 1кв – mitotic index (‰). 2кв – number of mitoses at metaphase (%). 3кв – number of pathological mitoses кількість (%).

Number of mitoses at metaphase in the body of stomach (44,9±2,8%) was significantly lower (p<0,01) than in the area around the tumor (56,9±5,8%) and other areas of gastric mucosa.

Examined pathological mitoses (Fig.1) were characterized by significant lowering (p<0,001) in the body of stomach (5,4±1,1%) relative to the area around the tumor (37,2±3,5%), pyloric part (35,1±2,7%) and lesser curvature (25,3±3,3%); significant difference between the pyloric part (35,1±2,7%) and lesser curvature of stomach (25,3±3,3%) (p<0,05) has been detected.

High proliferative activity of gastric mucosa epithelium with marker index of >30,0% has been found by the Ki-67 marker (MIB-1clone) (Fig.2).

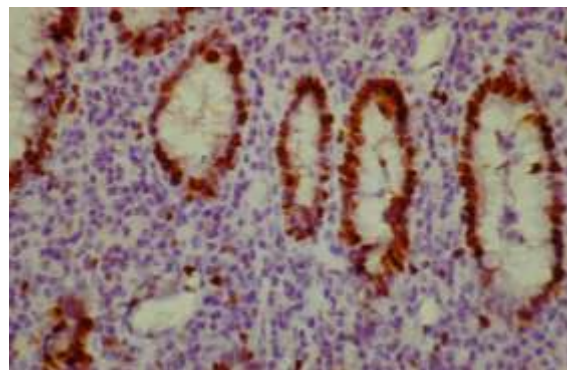


Fig.2. High proliferative activity in recesses epithelium with dysplasia against the background of chronic gastritis. Ki-67marker (MIB-1clone).

Dependence between the rates of number of pathological mitoses, mitoses at metaphase, mitotic index with manifested proliferative activity of mucosa epithelium has been identified in various topographic-anatomical parts of stomach.

In the body of stomach, where indices of mitotic regimen are lower than in other parts of stomach, manifested proliferative activity of epithelium with gastric mucosa dysplasia is significantly rarely identified (p<0,001).

Increase in number of pathological mitoses, mitotic index and mitoses at metaphase in pyloric part, lesser curvature and around the tumor correlates with the increase of proliferative activity of gastric mucosa epithelium with marker index of ≥30,0%.

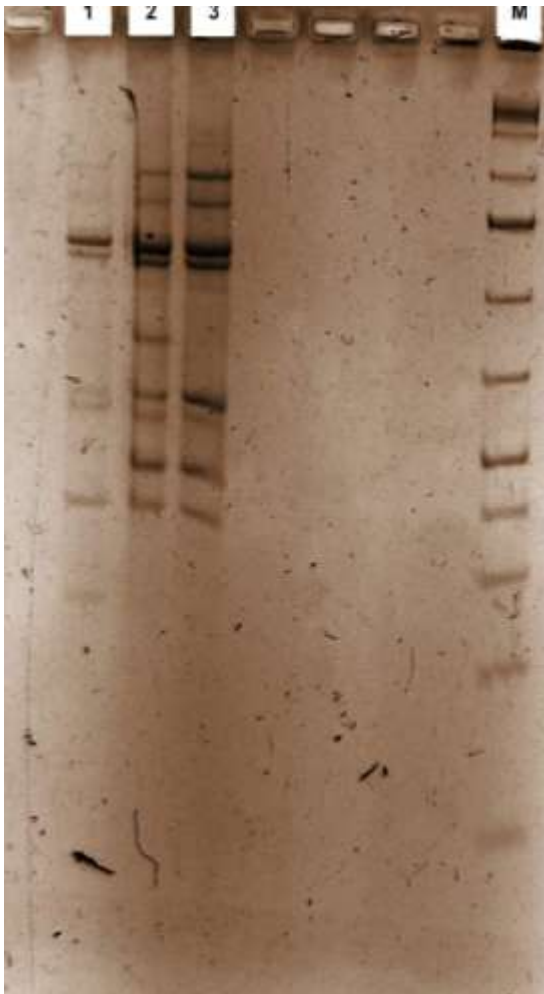


Fig. 3. Electrophoregrams of amplificate products of DNA of gastric mucosa of patients with ulceroinfiltrative gastric cancer: 1,2,3 – DNA-profiles correspond to tumor marker; M – marker of DNA fragments size.

Genetic typing of gastric mucosa epithelium of patients with ulceroinfiltrative gastric cancer detected rather stable DNA-profiles, presented by the expansion of fragments measured 520 and 620 p.n. (pairs of nucleotides) long, in all observations (Fig.3) and were totally different from the profile of normal marker.

The more rates of mitotic regimen are, the greater proliferative activity of integumentary-recessed epithelium and glands epithelium is.

In the body of stomach, where indices of mitotic regimen are the lowest in comparison with other parts of stomach, proliferative activity of epithelium is significantly rarely identified ($p < 0,001$) and is defined by the marker index of $< 10,0\%$.

The results of genetic typing concluded that, since the DNA-profiles were obtained with evident expansion of fragments measured from 520 to 620 p.n. in all examinations, they are to be considered as the marker of tumor existence.

Between the indices of mitotic regimen of gastric mucosa, manifestation of proliferative activity of dysplasia of gastric mucosa epithelium according to Ki-67 marker of patients with ulceroinfiltrative gastric cancer and indices of genetic typing of mucosa epithelium, the Pearson's correlation coefficient, r_{xy} , constituted 0,197, 0,607 and 0,881, respectively, corresponding to weak, There is considerable and strong relationship. Coefficient of de-

termination, $D = r_{xy}^2$, was equal to 0,039, 0,369 and 0,776, respectively. Critical value of correlation coefficient with probability of 0,95 is equal to 0,2732. Critical value of correlation coefficient with probability of 0,99 is equal to 0,3511. The comparison of correlation coefficient, r_{xy} , with critical value, r_{cr} , worth of 0,95, corresponded to $r_{xy} < r_{cr}$ and $r_{xy} > r_{cr}$, respectively. The comparison of correlation coefficient, r_{xy} , with critical value, r_{cr} , worth of 0,99, corresponded to $r_{xy} < r_{cr}$ and $r_{xy} > r_{cr}$, respectively. Covariation coefficient constituted 0,389, 3,442 and 0,859, respectively. Statistically significant dependence with probability of 0,99 has been detected between the indices of mitotic regimen, proliferative activity of epithelium dysplasia and indices of genetic typing of gastric mucosa.

Conclusions

Histological method has established that high indices of mitotic regimen of mucosa epithelium have been found in ulceroinfiltrative gastric cancer.

Indices of mitotic regimen in stomach parts tend to be increased in the following direction: B \rightarrow LC \rightarrow P \rightarrow AT.

In ulceroinfiltrative gastric cancer genetic typing of gastric mucosa stable DNA-profiles are found, presented by the expansion of amplicones measured 520 and 620 p.n. (pairs of nucleotides) in all examinations. It indicates about their genetic uniformity, malignancy and possibility to use them as malignancy marker.

Application of the ISSR-PCR method provides with the possibility of early diagnostics of gastric mucosa while examining the mucosa material.

Indices of immunohistochemical method correlate with histological method and indices of genetic typing according to ISSR-PCR reaction. The Pearson's correlation coefficient, r_{xy} , between the indices of mitotic regimen, proliferative activity of gastric mucosa epithelium according to Ki-67 marker and indices of genetic typing of gastric mucosa epithelium, is equal to 0,197, 0,607 and 0,881, respectively, corresponding to the existence of moderate and considerable relationship between the indices.

Morphological diagnostics of cancer should be based on complex estimation of symptoms, differentiating its epithelium dysplasia and other lesions, which stimulate tumor, comparing the findings of pathohistological immunohistochemical studies and genetic typing.

Perspectives of further research

It is planned to carry out practical complex studies to diagnose neoplastic lesions of gastric mucosa epithelium in patients with chronic stomach diseases.

References

1. Aruin L.I. Mezhdunarodnaya klassifikaziya chronicheskogo gastrita: chto sleduet prinyat' i chto vyzvaet somneniya / L.I.Aruin, A.V.Kononov, S.I.Mozgovoy // Arch. pat. – 2009. – Vyp.4. – S. 11 – 18.
2. Kazanzeva I.A. Patologiya mitoza v opucholyach cheloveka / I.A. Kazanzeva – Novosibirsk.: Nauka, 1981. – 144 s.
3. Kononov A.V. Morfogenez atrofii slizistoy obolochki zheludka kak osnova fenotipa chronicheskogo gastrita / A.V.Kononov, S.I.Mozgovoy, M.V. Markelova, A.G.Shimanskaya // Arch. pat. – 2011. – Vyp.3. – S. 26 – 31.
4. Markovskiy V.D. Kompleksna patomorfologichna diferenziyana diagnostika peredpuchlinnich prozesiv i raku shlunka / V.D.Markovskiy, O.V. Charchenko // Patologiya. – 2012. №3. – S.15 – 18.

5. Rak v Ukraïni, 2009 – 2010. Zachvoryuvanist', smertnist', pokazniki diyal'nosti onkologichnoï sluzhbi // Byul. naz. kanzerreestru Ukraïni. – 2011. – T.12., № 1. – S. 22, 37 – 38.
6. Sadchikov V.D. Chronicheskaya yazva i rak zheludka / V.D.Sadchikov, A.S.Dudnichenko, M.V.Sadchikova // Problemi medichnoï nauki ta osviti. – 2000. - №3. – S. 17 – 20.
7. Charchenko O.V. Perspektivi metodu ISSR-PCR ta morfologichnich metodiv pri vivchenni funktsional'nogo onkogenomu ta fenotipu zloyakisnich puchlin / O.V.Charchenko, V.M.Balazkiy, O.V.Moskalenko// Visnik morfologii (Reports of Morphology). – 2007. – T.13, №1. – S. 204 – 206.
8. Charchenko O.V. ISSR-PCR v doslidzhenni zloyakisnoï pe-rebudovi DNK slizovoï obolonki shlunka / O.V.Charchenko // Suchasni problemi patologichnoï anatomiï: Materiali VIII mizhnarodnogo kongresu patologiv Ukraïni, 21 – 23 travnya 2008 r. – Poltava, 2008. – S.19.
9. Charchenko O.V. Dinamika proyaviv fenotipu displaziy epiteliyu slizovoï obolonki shlunka u vidpovidnosti z ìch genotipom na materiali vivchennya svitlovoï mikroskopii ta DNK-tipuvannya za metodom ISSR-PCR / O.V.Charchenko // Visnik morfologii (Reports of Morphology). – 2009. –T. 15, №2. – S. 396 – 402.
10. Yankin A.V. Skrining raka zheludka / A.V.Yankin // Prakt. Onkologiya. – 2010. №11(2). – S.96 – 101.
11. Farinati F. Early and advanced gastric cancer during Follow-up of apparently benign gastric ulcer: Significance of the presence of epithelial dysplasia / F. Farinati, F. Cardin, F. Di Mario //J.Surg.Oncol. – 1987. – Vol.36, №4. – P. 263 – 267.
12. Nagayo T. Histogenesis and precursors of human gastric cancer. Research and practice./ NagayoT. – Berlin: Springer-Verlag. – 1988. – 190p.
13. Пат.76768 UA, МПК А61В 10/00. Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка: Пат.76768 UA, МПК А61В 10/00 / О.В.Харченко (UA); В.Д.Марковський (UA); В.М.Балацький(UA). №u201209011; Заявл.23.07.2012; Опубл. 10.01.2013; Бюл.№1. -3 с.

Матеріал надійшов до редакції 17.0.2014 р.

АСПЕКТИ РЕАБІЛІТАЦІЇ

© Подольський О.В., Стеблюк В.В.
УДК 616-021.2-06

МІСЦЕ ПСИХОФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА СТРЕС-АСОЦІЙОВАНУ АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ*

Подольський О.В., Стеблюк В.В.

ДУ «Український НДІ медичної реабілітації та курортології МОЗ України», м. Одеса

Изучалась эффективность использования магнитолазерной терапии и психофизической коррекции при лечении больных артериальной гипертензией с синдромом психоэмоционального напряжения. Применение предложенного комплекса лечебных мероприятий у пациентов с артериальной гипертензией I стадии позволило через 10 сеансов снизить до минимальной дозу антигипертензивных препаратов при стойком снижении показателей артериального давления. Продолжение занятий антистрессовой пластической гимнастикой позволяло удерживать достигнутый антигипертензивный эффект в течение не менее 3 месяцев. У пациентов с артериальной гипертензией II стадии применение предложенного комплекса позволило снизить наполовину дозу гипотензивных препаратов на период проведения лечебных мероприятий с выраженным положительным клиническим эффектом.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, реабилитация, магнитолазерная терапия, психофизическая коррекция.

Артеріальна гіпертензія (АГ) - найбільш значиме за своєю поширеністю, ускладненнями та можливими тяжкими наслідками захворювання в світі. В Україні 29,6 – 36,3% дорослого населення мають підвищений артеріальний тиск (АТ), а у осіб старших вікових груп АГ виявляють більш ніж в 40% випадків [1]. Відповідно до сучасних уявлень, хронічне психоемоційне перенапруження розглядається як один з етіологічних факторів підвищення АТ, і складні соціально-політичні умови можуть бути однією з причин зростання рівня серцево-судинних захворювань в Україні. Підвищення АТ відбувається за участю центральної та периферичної нервової системи на різних рівнях. Активація симпатoadреналової системи під впливом емоційного стресу призводить до підвищення АТ, і результати багатьох досліджень свідчать про те, що ступінь і тривалість саме стресорної активації нервової системи, які, у свою чергу, залежать від багатьох інших чинників (умов навколишнього середовища, генетичної та конституціональної схильності, індивідуальних особливостей психічної реакції та ін.) впливають на виникнення АГ [2, 3, 4, 8, 9, 11]. Лікування АГ на фоні синдрому психоемоційного напруження (СПЕН), зазвичай, потребує застосування препаратів як кардіологічної групи, так і психотропних лікарських засобів, що створює незручності та обмеження для пацієнтів щодо повсякденної активності, взаємно підсилює гепато- та нефротоксичність, алергізацію і вираженість побічних ефектів [10]. Усе це спонукає до пошуку нових методів лікувального впливу, в тому числі комплексних, з використанням фізичних лікувальних чинників, серед яких одним з найбільш досліджених при лікуванні АГ є магнитолазерна терапія (МЛТ) [5, 6]. Однак при виборі

оптимальних фізичних методів лікування особливого значення набуває необхідність урахування складного комплексу психофізіологічних, патофізіологічних і патобіохімічних змін в організмі хворого на АГ зі СПЕН, адже в даному випадку ефективність медикаментозної та фізіотерапії без психокоригуючих методів недостатньо висока. В той же час на сьогодні для психофізичної корекції СПЕН широко застосовують такі методи, як аудіо-візуальна стимуляція (АВС) та антистрессова пластична гімнастика (АСПГ). Натеper доведена ефективність світло-звукової модуляції біоелектричної активності головного мозку з використанням методу АВС при депресивних розладах, астено-невротичному синдромі та післястрессових розладах, що робить перспективним застосування АВС при АГ, особливо зі СПЕН [12]. АСПГ як метод кінезіотерапії, поєднаної з аутогенним тренуванням, запропонований А.В. Попковим [7], спрямований на розширення адаптаційних можливостей людини та забезпечує його стійкість до впливів навколишнього середовища і змін, що виникають в організмі під впливом стрес-факторів. АСПГ передбачає виконання м'язових вправ у слабкому ізометричному режимі, при якому супутне розслаблення впродовж усього заняття створює оптимальні співвідношення між центральною та периферичною ланками кровообігу і є перспективним для застосування у пацієнтів з АГ зі СПЕН, проте будь-які наукові публікації з цього приводу відсутні.

Отже, актуальність теми, з огляду на значне поширення АГ в популяції дорослого населення України, взаємопов'язаність та взаємообтяжливості кардіоваскулярних та нервово-психічних компонентів патогенезу, недостатня ефективність протоколної гіпо-

* Цитування при атестації кадрів: Подольський О.В., Стеблюк В.В. Місце психофізичної реабілітації у лікуванні хворих на стрес-асоційовану артеріальну гіпертензію // Проблеми екології та медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 63 –66/

тензивної терапії у пацієнтів із СПЕН і перспективність комбінованого використання ефектів МЛТ та психофізичної корекції у формі АВС і АСПГ обумовили доцільність виконання даного дослідження.

Мета роботи: підвищення ефективності відновлювального лікування хворих з артеріальною гіпертензією за допомогою додаткового використання МЛТ та психофізичної корекції на амбулаторному етапі.

Матеріали та методи дослідження

У дослідження були включені пацієнти чоловічої статі з групи диспансерного обстеження відомчих лікувальних закладів Міністерства внутрішніх справ.

До групи А (n=66) включені чоловіки, середній вік яких склав 35,67±8,95 років, що мали артеріальну гіпертензію 1-го ступеня (I стадії) без ускладнень.

Група В (n=75) – чоловіки, середній вік яких склав 48,33±7,12 років, мали встановлений діагноз артеріальна гіпертензія 2–3-го ступеня (II стадії) та стенокардія напруження I функціонального класу (ФК).

Група С (n=35) – чоловіки, середній вік яких склав 47,78±8,54 років, мали встановлений діагноз артеріальна гіпертензія 2–3-го ступеня (II–III стадії), стенокардія напруження II ФК та серцева недостатність (СН) I–II ФК за класифікацією NYHA. Результати порівнювали з даними, отриманими при профілактичному обстеженні 143 здорових чоловіків відповідного віку (контрольна група).

У лікуванні пацієнтів використовували магнітолазерну терапію, яку проводили на апараті «MIT-11» (Україна) з параметрами: довжина хвилі – 0,86 мкм, вихідна потужність лазерного випромінювання – 10 мВт, індукція змінного магнітного поля – 40 мТл, частота повторення імпульсів лазерного випромінювання – 50 Гц на потиличну зону по 5 хв щоденно, на курс – 20 процедур; аудіо-візуальну стимуляцію з використанням аудіо-візуального плеєра NovaPro-100 (Photosonix inc., USA) - програма «Стрес-кіллер» з пакетами частот: 11 Гц – 10 хв, 8 Гц – 15 хв, 3 Гц – 10 хв та 11 Гц – 10 хв. Загальна тривалість – 45 хв щоденно, на курс – 20 процедур. АСПГ складалась з базового комплексу, що включав фізичні вправи без навантаження на м'язи та суглоби у поєднанні із застосуванням основних мислєобразів – картин, що сприяють розслабленню, виникненню відчуття комфорту і внутрішньої рівноваги, усуненню напруження і скутості, моделюють

стан релаксації та спокою. Тривалість процедур – 20 хв у вечірні години (з 18-ї до 21-ї), на курс лікування – 20 процедур. Загальна тривалість періоду дослідного лікування склала 21±1 день. Базову медикаментозну терапію призначали за стандартними протоколами відповідно до стадії АГ і з урахуванням попереднього лікування. Вона включала застосування інгібіторів АПФ, сартанів, бета-адреноблокаторів, діуретиків та ацетилсаліцилової кислоти.

Усім пацієнтам проводили обстеження відповідно до протоколу дослідження – до початку, по завершенні курсу лікування та в період віддаленого спостереження – через 3 міс по закінченні лікування.

Усі отримані цифрові дані оброблено із застосуванням сучасних методів варіаційної статистики за допомогою програми Exell Microsoft Office.

Результати та їх обговорення

Як показали результати дослідження, в основній дослідній групі було отримано виразний позитивний результат щодо добових коливань артеріального тиску (табл. 1). До групи А було включено 66 чоловіків з АГ I стадії без ускладнень. В основній групі A/I лікувальний комплекс включав базову фармтерапію (еналаприл 5 мг/добу + бісопролол 2,5 мг/добу) + МЛТ сегментарно на проекцію довгастого мозку + АВС в альфа-діапазоні + АСПГ. З 10-го сеансу за умови стабільного АТ антигіпертензивну терапію відміняли. У пацієнтів плацебо-групи (A/II) лікувальний комплекс включав базову фармтерапію + АВС в альфа-діапазоні + МЛТ з відключеним контуром. У дослідній групі було виділено підгрупу A/III, яку склали 10 пацієнтів, що отримували призначений комплекс без використання АСПГ. Отримані результати свідчать про виражений ефект МЛТ в комбінації з АВС та кінезіотерапією. Застосування запропонованого лікувального комплексу дозволило через 10 сеансів знизити до мінімальної дозу антигіпертензивних препаратів при стійкому зниженні максимального систолічного АТ до 127,21±8,32 мм рт. ст., максимального діастолічного АТ до 89,67±8,44 мм рт. ст. з відповідним зниженням частоти симптоматики вегетативної дисфункції та коронарної недостатності. Продовження занять антистресовою пластичною гімнастикою дозволяло утримувати досягнутий антигіпертензивний ефект протягом щонайменше 3 місяці.

Таблиця 1
Динаміка показників АТ у пацієнтів групи А

Показник	До лікування	Через 10 днів	Через 20 днів	Через 3 міс
Підгрупа A/I (n=28)				
АТсмаксимальний	175,53±10,32	141,21±5,35*	127,21±8,32*	132,56±4,43*
АТсмінімальний	135,32±6,21	124,62±4,11	119,83±4,56	124,54±5,33
АТдмаксимальний	121,15±7,21	103,43±7,12*	89,67±8,44	87,67±4,25*
АТдмінімальний	86,34±8,56	76,43±5,21	72,67±7,43	78,57±7,32
Підгрупа A/III (n=10)				
АТсмаксимальний	174,56±9,43	142,56±4,22*	129,67±5,32*	151,65±4,33
АТсмінімальний	137,43±6,32	128,54±4,33	131,45±3,21	133,54±7,87
АТдмаксимальний	120,09±8,21	104,32±4,78	108,78±5,56	107,43±7,21
АТдмінімальний	87,78±5,89	87,89±7,23	86,73±5,33	88,98±5,67
Підгрупа A/II (n=28) – плацебо				
АТсмаксимальний	176,43±8,47	163,53±4,23	159,43±6,33	163,74±4,98
АТсмінімальний	140,09±5,32	131,54±3,21	129,89±4,22	135,67±3,22
АТдмаксимальний	118,67±6,23	108,56±8,23	110,07±5,33	109,78±5,32
АТдмінімальний	88,54±5,32	86,88±5,32	83,56±5,21	86,52±4,62

Примітка: * – різниця достовірна відносно показників до початку лікування (p<0,005).

До групи В було включено 75 чоловіків з діагнозом: ГХ II стадії, СН I–II ФК, стенокардія напруження I–II ФК. Базова фармтерапія включала еналаприл (5 мг), бісопролол (5 мг) та ацетилсаліцилову кислоту (30 мг)

щоденно. Групу було поділено на три підгрупи згідно з програмами лікування відповідно до такого у пацієнтів групи А: В/I — фармтерапія + МЛТ + АВС + АПГ; В/II – фармтерапія + АСВ + МЛТ-плацебо + АПГ; В/III —

фармтерапія + МЛТ + АВС без кінезіотерапії. Оцінку ефективності проведеного лікування проводили за показниками триразового щоденного вимірювання АТ, результатами холтерівського моніторингу та добового моніторингу АТ. Як показали результати дос-

лідження, у пацієнтів групи, в якій проводили повний комплекс лікувальних заходів, було отримано позитивний результат щодо добових коливань АТ за даними як триразового його вимірювання, так і за моніторингом. (табл. 2).

Таблиця 2
Динаміка показників АТ у пацієнтів групи В

Показник	До лікування	Через 10 днів	Через 20 днів	Через 3 міс
Підгрупа В/І (n=30)				
АТсмаксимальний	178,53±9,32	146,54±6,25*	147,21±4,52*	166,56±6,73
АТсмінімальний	129,63±7,35	125,83±6,23	128,63±3,32	139,64±3,53
АТдмаксимальний	115,65±3,61	108,35±3,62	103,37±4,43*	104,62±5,45*
АТдмінімальний	88,34±4,56	87,33±6,42	71,57±5,43*	88,53±6,62
Підгрупа В/ІІІ (n=20)				
АТсмаксимальний	176,53±5,43	154,36±4,22*	139,57±6,61*	171,35±8,63
АТсмінімальний	125,33±7,12	124,64±7,13	126,55±4,18	132,44±5,62
АТдмаксимальний	115,09±4,63	102,34±3,82*	105,54±3,54*	108,43±8,33
АТдмінімальний	87,82±7,33	82,59±3,67	83,35±6,32	87,28±5,78
Підгрупа В/ІІІІ (n=25) – плацебо				
АТсмаксимальний	173,48±5,43	167,42±4,23	158,43±6,33*	173,74±4,98
АТсмінімальний	134,39±7,39	134,87±4,29	123,63±5,67	133,39±5,62
АТдмаксимальний	113,57±6,35	105,67±3,63	113,29±5,63	123,67±6,32
АТдмінімальний	88,98±6,78	83,58±6,74	85,66±7,44	86,92±7,45

Примітка: * – різниця достовірна відносно показників до початку лікування ($p < 0,005$).

У пацієнтів з АГ ІІ стадії та стенокардією напруження гіпотензивний ефект був отриманий при застосуванні МЛТ в комбінації з АВС та кінезіотерапією через 20 сеансів. В І та ІІ підгрупах через 10 днів дозу еналаприлу було знижено до 2,5 мг, а через 20 днів – і бісопрололу (до 2,5 мг). Втім ефект виявився нестійким і через 10 днів дозу було відновлено до початкової. Не відзначено стійкого терапевтичного результату у пацієнтів залежно від виконання комплексу АСПГ. У пацієнтів плацебо-групи не виявлено достовірного зниження АТ через 10 сеансів, що потребувало продовження призначеної фармтерапії. Однак по закінченні лікування відмічено достовірне зниження

САТ, що, вочевидь, пов'язано з ефектами АВС та руховим режимом. Втім, цей ефект виявився нестійким.

Пацієнти групи С були розділені на дві підгрупи, оскільки АСПГ не використовували. У підгрупі С/І проводили базову фармакотерапію + МЛТ. Пацієнтам підгрупи С/ІІ на фоні прийому лікарських препаратів призначали МЛТ-плацебо. АВС не використовували з огляду на небажані ефекти у цієї групи пацієнтів. Результати динамічного обстеження пацієнтів даної групи дозволяють зробити висновки, що клінічну ефективність застосування МЛТ у осіб даної категорії не доведено, різниці між показниками максимального та мінімального систолічного АТ, а також мінімального діастолічного АТ в підгрупах, в яких застосовували МЛТ та плацебо, практично не було (табл. 3).

Таблиця 3
Динаміка показників АТ у пацієнтів групи С

Показник	До лікування	Через 10 днів	Через 20 днів	Через 3 міс
Підгрупа С/І (n=20)				
АТсмаксимальний	165,62±11,52	156,21±6,21	154,21±6,32	161,56±7,43
АТсмінімальний	123,36±2,41	134,32±8,13	129,63±6,66	134,24±8,31
АТдмаксимальний	119,25±6,41	103,43±7,12	89,67±8,44*	105,67±4,25
АТдмінімальний	62,38±6,26	72,73±6,17	72,18±3,13	78,97±5,26
Підгрупа С/ІІ (n=15)				
АТсмаксимальний	164,26±11,43	162,36±4,28	159,67±6,82	161,15±4,63
АТсмінімальний	124,46±6,12	124,54±3,33	125,45±6,27	134,53±6,17
АТдмаксимальний	121,19±5,21	114,62±4,78	118,78±7,16	117,43±7,21
АТдмінімальний	67,18±5,29	67,93±7,23	66,33±9,32	68,84±6,67

Примітка: * – різниця достовірна відносно показників до початку лікування ($p < 0,05$).

У пацієнтів підгрупи СІ виявлено достовірне зниження максимального діастолічного АТ через 20 днів від початку лікування. Вочевидь, такі результати пояснюються тим, що у пацієнтів, які хворіють на АГ досить тривалий проміжок часу, відбувається перебудова регуляторних механізмів зі зменшенням коливань адаптивних реакцій, встановленням певного ритму нейровегетативно-ендокринних реакцій, які закріплюються морфофункціональними змінами серцево-судинної системи та пов'язаних з нею систем. Правильно підібрана медикаментозна терапія забезпечує ефективне підтримання цього стану на рівні компен-

сації-субкомпенсації. Тому агресивне застосування методів фізіотерапії та фізичної реабілітації у даної категорії пацієнтів є недоцільним.

Висновки

У пацієнтів з АГ І стадії зі СПЕН застосування запропонованого лікувального комплексу дозволило через 10 сеансів знизити до мінімальної дозу антигіпертензивних препаратів при стійкому зниженні максимального систолічного АТ до 127,21±8,32 мм рт. ст., максимального діастолічного АТ до 89,67±8,44 мм рт. ст. з відповідним зниженням частоти симптоматики веге-

тативної дисфункції та коронарної недостатності. Продовження занять антистресовою пластичною гімнастикою дозволяє утримувати досягнутий антигіпертензивний ефект протягом щонайменше 3 міс.

У пацієнтів з АГ II стадії зі СПЕН застосування запропонованого комплексу дозволяє знижувати навіп дозу гіпотензивних препаратів на період проведення лікувальних заходів, при цьому досягаючи зниження АТ з вираженим позитивним клінічним ефектом, що відображається у зниженні частоти клінічних та ЕКГ-ознак. Втім гіпотензивний ефект у пацієнтів даної категорії був нестійким та не підтверджувався у віддалений період.

У пацієнтів з АГ III стадії зі СПЕН, що ускладнена серцевою недостатністю, при застосуванні магнітолазерної терапії не відзначено достовірного гіпотензивного ефекту, хоча дещо знизилась частота виявлення ЕКГ-ознак кардіальної патології.

Література

1. Настанова та клінічний протокол надання медичної допомоги «Артеріальна гіпертензія». Наказ МОЗ України № 384 від 24.05.2012. – К., 2012. – 107 с.
2. Коваленко В.М. Роль емоційного стресу у виникненні артеріальної гіпертензії: факти і невирішені питання / В. М. Коваленко, Ю. М. Сіренко, Г. Д. Радченко // Наука і практика. – 2014, №1. – С. 116-129.
3. Кравченко А.М. Робота, стрес і артеріальна гіпертензія / А.М. Кравченко // Рациональная фармакотерапия. – 2012. – № 3. – С. 15–18.
4. Крадинова Е.А. Психоземotionalный фактор в формировании гипертонической болезни и методы коррекции на курорте / Е.А. Крадинова // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2009. – № 2. – С. 68–71.
5. 50 лет лазерной медицины: горизонты лазеропунктуры – современной технологии рефлексотерапии: / Самосюк И.З., Самосюк Н.И., Федоров С.Н., Залесский В.Н. / Под ред. И.З. Самосюка, В. П. Лысенюка. – К.: «Випол», 2012. – 496 с.
6. Пономаренко Г.Н. Метаболические детерминанты магнитолазерной терапии у больных ГБ / Г.Н. Пономаренко, А.Г. Обрезан, Н.А. Костин // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2007. – № 3. – С. 12-17.
7. Попков А.В. Антистрессовая пластическая гимнастика / А.В. Попков. – М.: Советский спорт, 2005. – 164 с.
8. Blood pressure reactions to acute mental stress and future blood pressure status: data from the 12-year follow-up of the West of Scotland study / C. Douglas, A. Phillips, G. Der [et al.] // Psychosomatic Medicine. – 2011. – Vol. 73. – P. 737–742.
9. Pickering T. G. Mental stress as a casual factor in the development of hypertension and cardiovascular disease / T. G. Pickering // Current Hypertension Reports. – 2001. – Vol. 3. – P. 249–254.
10. Position paper on the importance of psychosocial factors in cardiology: Update 2013 / K.H. Ladwig, F. Lederbogen, C. Albus [et al.] // GMS German Medical Science. – 2014. – Vol. 12. – P.1-24.
11. Spruill T. M. Chronic Psychosocial Stress and Hypertension / T. M. Spruill // Curr. Hypertens. Rep. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 10-16.
12. Teplan M. Direct effects of audio-visual stimulation on EEG / M. Teplan, A. Krakovská, S. Stolc // Comput Methods Programs Biomed. – 2011. – V. 102, № 1. – P. 17–24.

ENGLISH VERSION: POINT OF PSYCHOPHYSICAL REHABILITATION IN TREATMENT OF PATIENTS WITH STRESS ASSOCIATED HYPERTENSION*

Podolsky, A.V., Stebliuk V.V.

SI "Ukrainian Research Institute of Medical Rehabilitation and Balneology of the Ministry of Health of Ukraine", Odessa

The efficiency of use of magnetolaser therapy and psychophysical correction in patients with arterial hypertension and syndrome of psychoemotional stress was studied. The application of the proposed complex of therapeutic interventions among patients with hypertension of the 1st stage allowed after 10 sessions to reduce to a minimum the dose of antihypertensive drugs with stable decrease of blood pressure. Continuation of anti-stress plastic gymnastics exercises, made it possible to preserve antihypertensive effect for at least 3 months. In patients with hypertension stage II, the application of the proposed complex allowed to reduce by half the dose of antihypertensive drugs during the treatment measures and showed a positive clinical effect.

Keywords: hypertension, rehabilitation, magnetolaser therapy, psycho-physical correction.

Hypertension (HT) is the most significant in its prevalence, complications and possible severe consequences disease in the world. In Ukraine, 29.6 - 36.3% of adults have high blood pressure (BP), and in older age groups AH is detected more than in 40% of cases [1]. According to modern concepts, chronic psychoemotional strain is considered as one of the etiological factors of increase of blood pressure and complex social and political conditions may be one of the reasons of growth of cardiovascular diseases in Ukraine. Increased blood pressure occurs with the participation of the central and peripheral nervous system at different levels. Activation of the sympathoadrenal system under the influence of emotional stress leads to increase in blood pressure, and the results of many studies suggest

that exactly the degree and duration of stress activated nervous system, which in turn depends on many other factors (environmental conditions, genetic and constitutional predisposition, the individual characteristics of mental reaction, etc.), affecting the occurrence of hypertension [2, 3, 4, 8, 9, 11]. Treatment of hypertension with the background of psychoemotional tension syndrome (PETS) usually requires the use of a group of cardiac as well as psychotropic drugs, creating inconvenience for patients and limitations on activities of daily living, mutually reinforcing hepato-renal toxicity, allergy and severity of side effects [10]. All this leads to the search for new methods of therapeutic effects, including complex use of physical therapeutic factors, and one of the most studied in the treatment of

* To cite this Podolsky, A.V., Stebliuk V.V. Point of psychophysical rehabilitation in treatment of patients with stress associated hypertension // Problemy ekologії ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 66 -69.

hypertension is the magnetolaser therapy (MLT) [5, 6]. However, in the choice of optimal physical methods of treatment, special importance is the need of taking into account a complex set of physiological, pathophysiological and pathobiochemical changes in the hypertensive patients with PETS, because in this case the effectiveness of medication and physical therapy without psychocorrecting methods is not high enough. At the same time today for mind-body correction of PETS such methods as audio-visual stimulation (AVS) and anti-stress plastic gymnastics (ASPH) are widely used. Currently the effectiveness of light and sound modulation of bioelectric activity of brain using the AVS in depressive disorders astenoneurotic syndrome and post-stress disorders, has been proven making a promising application of AVS in hypertension, especially with PETS [12]. ASPH as a kinesitherapy method, combined with autogenic training proposed by A. Popkov [7] is aimed at expanding the adaptive human capabilities and ensuring its resistance to environmental influences and changes that occur in the body under the influence of stress factors. ASPH involves performance of muscle exercises in a weak isometric mode in which concomitant relaxation for the entire sessions creates optimal ratio between the central and peripheral circulation and are promising for use in patients with hypertension with PETS, but any scientific publications on this subject are absent.

Therefore, the relevance of the topic, taking into account the extensive development of hypertension in the adult population of Ukraine, interconnectedness and self-worsening of cardiovascular and neuropsychiatric components of pathogenesis, lack of effectiveness of protocol antihypertensive therapy in patients with PETS and potential effects of combined use of MLT and psychophysical correction as AVS and ASPH form cause the appropriateness of conducting of this study.

Objective: To improve the efficiency of restorative treatment of patients with hypertension using additional use MLT and psychophysical correction at the outpatient stage.

Materials and Methods of Study

The study included male patients from a group of dispensary examination of departmental medical institutions of the Ministry of Internal Affairs.

Group A (n = 66) included males whose average age was $35,67 \pm 8,95$ years, which had hypertension of the 1st degree (stage I) without complications.

Group B (n = 75) - males, average age was $48,33 \pm 7,12$ years, were diagnosed with hypertension of the 2nd-3rd degree (II stage) and angina pectoris functional class I (FC).

Group C (n = 35) - males, average age was $47,78 \pm 8,54$ years, were diagnosed with hypertension 2-3rd grade (II-III stage), FC II angina pectoris and heart failure (HF) I- II FC according to NYHA classification. The results were compared with data obtained by prophylactic examination of 143 healthy men of the corresponding age (control group). In the treatment of patients using

magnetolaser therapy, which was performed on the device "MIT-11" (Ukraine) with the following parameters: wavelength - 0.86 microns, the output power of the laser radiation - 10 MW, induction of alternating magnetic field - 40 mT, repetition rate of the laser pulses radiation - 50 Hz in the occipital area for 5 minutes every day, duration of treatment - 20 procedures; audio-visual stimulation using the audio-visual player NovaPro-100 (Photosonix inc., USA) - program "Stress-killer" with frequency packages: 11 Hz - 10 minutes, 8 Hz - 15 min, 3 Hz - 10 minutes and 11 Hz - 10 minutes. Total duration - 45 minutes daily for the course - 20 procedures. ASPH consisted of a base set that includes physical exercises without stress on the muscles and joints in combination with basic thought images - pictures which promote relaxation, the sense of comfort and inner balance, eliminate tension and stiffness, simulating a state of relaxation and tranquility. Duration of procedures - 20 minutes in the evening (from 18:00 to 21:00), the course of treatment - 20 procedures. The total duration of the experimental treatment was 21 ± 1 day. The basic drug therapy was administered according to standard protocols according to the stage of hypertension and taking into account previous treatment. It included the use of ACE inhibitors, ARB, beta-blockers, diuretics and aspirin. All patients performed examinations in accordance with the study protocol - before, at the end of treatment and follow-up - 3 months after treatment. All received data were processed using modern methods of variation statistics using Microsoft Office Excel.

Results and discussion

As the results of the study, the main experimental group had received a clear positive result on the daily fluctuations in blood pressure (Table 1). Group A included 66 men with hypertension I stage without complications. In the study group A / I complex treatment included basic pharmacological treatment (enalapril 5 mg / day + bisoprolol 2.5 mg / day) + MLT segmentally on the projection of the medulla oblongata + AVS in the alpha range + ASPH. From the 10th session under condition of stable blood pressure antihypertensive treatment was withdrawn. Patients placebo group (A / II) treatment complex included basic pharmacological treatment + AVS in the alpha range + MLT with disabled outline. In the experimental group was selected subgroup A / III, which consisted of 10 patients receiving designed complex without ASPH. Obtained results indicate a pronounced effect of MLT in combination with AVS and kinesitherapy. The application of the proposed medical complex allowed after 10 sessions to reduce to a minimum the dose of antihypertensive drugs with a steady decline in systolic blood pressure to a maximum $127,21 \pm 8,32$ mm Hg., maximum diastolic blood pressure to $89,67 \pm 8,44$ mmHg. with a corresponding reduction in the incidence of symptoms of vegetative dysfunction and coronary insufficiency. Continuation of anti-stress plastic gymnastics exercises made it possible to preserve antihypertensive effect for at least 3 months.

Table 1
Dynamics of indicators of blood pressure in patients of group A

Indicator	Before treatment	After 10 days	After 20 days	After 3 months
Subgroup A/I (n=28)				
BPsys max	175,53±10,32	141,21±5,35*	127,21±8,32*	132,56±4,43*
BPsys min	135,32±6,21	124,62±4,11	119,83±4,56	124,54±5,33
BPdias max	121,15±7,21	103,43±7,12*	89,67±8,44	87,67±4,25*
BPdias min	86,34±8,56	76,43±5,21	72,67±7,43	78,57±7,32

Subgroup A/III (n=10)				
BPsys max	174,56±9,43	142,56±4,22*	129,67±5,32*	151,65±4,33
BPsys min	137,43±6,32	128,54±4,33	131,45±3,21	133,54±7,87
BPdias max	120,09±8,21	104,32±4,78	108,78±5,56	107,43±7,21
BPdias min	87,78±5,89	87,89±7,23	86,73±5,33	88,98±5,67
Subgroup A/II (n=28) – placebo				
BPsys max	176,43±8,47	163,53±4,23	159,43±6,33	163,74±4,98
BPsys min	140,09±5,32	131,54±3,21	129,89±4,22	135,67±3,22
BPdias max	118,67±6,23	108,56±8,23	110,07±5,33	109,78±5,32
BPdias min	88,54±5,32	86,88±5,32	83,56±5,21	86,52±4,62

Note: * - credible difference with respect to parameters before treatment ($p < 0,005$).

The group B included 75 men with a diagnosis of essential hypertension stage II, heart failure I- II functional class, angina pectoris I- II FC. Basic pharmacotherapy included enalapril (5 mg), bisoprolol (5 mg) and acetylsalicylic acid (30 mg) daily. The group was divided into three subgroups according to treatment programs according to a patient in group A: B / I - pharmacotherapy + MLT + AVS + ASPH; B / II - pharmacotherapy + AVS + MLT placebo +APG; B / III - pharmacotherapy +

MLT + AVS without kinesitherapy. Evaluation of the effectiveness of the treatment was carried out by three times daily indicators of measurement of blood pressure, the results of Holter monitoring and daily monitoring of blood pressure. As the results of the study, patients groups, which carried a full range of therapeutic measures had positive results in the daily fluctuations of blood pressure according to three times of a its measurement and monitoring. (Table 2).

Table 2
Dynamics of indicators of blood pressure in patients of group B

Indicator	Before treatment	After 10 days	After 20 days	After 3 months
Subgroup B/I (n=30)				
BPsys max	178,53±9,32	146,54±6,25*	147,21±4,52*	166,56±6,73
BPsys min	129,63±7,35	125,83±6,23	128,63±3,32	139,64±3,53
BPdias max	115,65±3,61	108,35±3,62	103,37±4,43*	104,62±5,45*
BPdias min	88,34±4,56	87,33±6,42	71,57±5,43*	88,53±6,62
Subgroup B/III (n=20)				
BPsys max	176,53±5,43	154,36±4,22*	139,57±6,61*	171,35±8,63
BPsys min	125,33±7,12	124,64±7,13	126,55±4,18	132,44±5,62
BPdias max	115,09±4,63	102,34±3,82*	105,54±3,54*	108,43±8,33
BPdias min	87,82±7,33	82,59±3,67	83,35±6,32	87,28±5,78
Subgroup B/II (n=25) – placebo				
BPsys max	173,48±5,43	167,42±4,23	158,43±6,33*	173,74±4,98
BPsys min	134,39±7,39	134,87±4,29	123,63±5,67	133,39±5,62
BPdias max	113,57±6,35	105,67±3,63	113,29±5,63	123,67±6,73
BPdias min	88,98±6,78	83,58±6,74	85,66±7,44	86,92±7,45

Note: * - credible difference with respect to parameters before treatment ($p < 0,005$).

In patients with stage II hypertension and exertional angina hypotensive effect was obtained with MLT in combination with AVS and kinesitherapy after 20 sessions. In the first and second sub-groups after 10 days dose of enalapril was reduced to 2.5 mg, and in 20 days - bisoprolol (up to 2.5 mg). However, the effect was unstable and after 10 days the dose has been restored to the original. There was no sustained therapeutic outcome in patients depending on the performance of a ASPH complex. In patients of the placebo group significant reduction in blood pressure was not found over 10 sessions which required extension of designed pharmacotherapy. However, after treatment a significant reduction in SBP was shown, which

is likely due to the effects of AVS and movement mode. However, this effect was not stable.

Group C patients were divided into two subgroups as ASPH was not used. In the subgroup of C / I was basic pharmacotherapy + MLT administered. Patients subgroup C / II received medications administered and MLT-placebo. AVS was not used because of the adverse effects in this group of patients. The results of the dynamic evaluation of patients of this group allow us to conclude that the clinical efficacy of MLT in this category of persons is not proven; the difference between the maximum and minimum systolic blood pressure and diastolic blood pressure in minimal subgroups, which used MLT and placebo, was virtually absent (Tab. 3).

Table 3
Dynamics of indicators of blood pressure in patients of group C

Indicator	Before treatment	After 10 days	After 20 days	After 3 months
Subgroup C/I (n=20)				
BPsys max	165,62±11,52	156,21±6,21	154,21±6,32	161,56±7,43
BPsys min	123,36±2,41	134,32±8,13	129,63±6,66	134,24±8,31
BPdias max	119,25±6,41	103,43±7,12	89,67±8,44*	105,67±4,25
BPdias min	62,38±6,26	72,73±6,17	72,18±3,13	78,97±5,26
Subgroup C/II (n=15)				
BPsys max	164,26±11,43	162,36±4,28	159,67±6,82	161,15±4,63
BPsys min	124,46±6,12	124,54±3,33	125,45±6,27	134,53±6,17
BPdias max	121,19±5,21	114,62±4,78	118,78±7,16	117,43±7,21
BPdias min	67,18±5,29	67,93±7,23	66,33±9,32	68,84±6,67

Note: * - credible difference with respect to parameters before treatment ($p < 0,005$).

In the CI subgroup of patients revealed a significant reduction in maximum diastolic blood pressure after 20 days of treatment. Obviously, these results are explained by the fact that patients suffering from hypertension for quite a long period of time, there is a reorganization of regulatory mechanisms to decrease fluctuations of adaptive responses, establishing certain rhythm of neurovegetative-endocrine reactions that are fixed by morphofunctional changes in the cardiovascular system and related with it systems. Choosing the right drug therapy provides effective maintenance of state at level compensation-subcompensation. Therefore, the use of aggressive methods of physical therapy and physical rehabilitation in these patients is unnecessary.

Conclusions

In patients with hypertension stage I with PETS application of proposed medical complex allowed after 10 sessions reduce to a minimum the dose of antihypertensive drugs with a steady decline of maximum systolic blood pressure to $127,21 \pm 8,32$ mm Hg., maximum diastolic blood pressure to $89,67 \pm 8,44$ mmHg. with a corresponding reduction in the incidence of symptoms of vegetative dysfunction and coronary insufficiency. Continuation of anti-stress plastic gymnastics exercises allows to keep the achieved antihypertensive effect for at least 3 months.

In patients with hypertension stage II with PETS application of the proposed complex allows to cut by half the dose of antihypertensive drugs for the duration of therapeutic measures, thus achieving a reduction in blood pressure with marked positive clinical effect that appears in reducing the incidence of clinical and ECG signs. However hypotensive effect in patients of this category was unstable and not confirmed in the remote period.

In patients with hypertension stage III with PETS which is complicated by heart failure, during the application of magnetolaser therapy we observed significant hypotensive effect, although somewhat reduced incidence of ECG signs of cardiac disease.

References

1. Nastanova ta klinichniy protokol nadannya medichnoi dopomogi «Arterial'na gipertenziya». Nakaz MOZ Ukraїni № 384 vid 24.05.2012. – K., 2012. – 107 s.
2. Kovalenko V.M. Rol' emociynogo stresu u viniknenni arterial'noi gipertenzii: fakti i nevirisheni pitannya / V. M. Kovalenko, Yu. M. Sirenko, G. D. Radchenko // Nauka i praktika. – 2014, №1. – S. 116-129.
3. Kravchenko A.M. Robota, stres i arterial'na gipertenziya / A.M. Kravchenko // Razional'naya farmakoterapiya. – 2012. – № 3. – S. 15–18.
4. Kradinova E.A. Psichoemozional'nyy faktor v for-mirovanii gipertonicheskoy bolezni i metody korrek-zii na kurorte / E.A. Kradinova // Vestnik fizioterapii i kurortologii. – 2009. – № 2. – S. 68–71.
5. 50 let lazernoy mediziny: gorizonty, lazeropunktury – sovremennoy technologii refleksoterapii: / Samo-syuk I.Z., Samosyuk N.I., Fedorov S.N., Zalesskiy V.N. / Pod red. I.Z. Samosyuka, V. P. Lysenyuka. – K.: «Vi-pol», 2012. – 496 s.
6. Ponomarenko G.N. Metabolicheskie determinanty magnetolazernoy terapii u bol'nykh GB / G.N. Ponomarenko, A.G. Obreznan, N.A. Kostin // Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury. – 2007. – № 3. – S. 12-17.
7. Popkov A.V. Antistressovaya plasticheskaya gimnastika / A.V. Popkov. – M.: .
8. Sovetskiy sport, 2005. – 164 s. Blood pressure reactions to acute mental stress and future blood pressure status: data from the 12-year follow-up of the West of Scotland study / C. Douglas, A. Phillips, G. Der [et al.] // Psychosomatic Medicine. – 2011. – Vol. 73. – P. 737–742.
9. Pickering T. G. Mental stress as a casual factor in the development of hypertension and cardiovascular disease / T. G. Pickering // Current Hypertension Reports. – 2001. – Vol. 3. – P. 249–254.
10. Position paper on the importance of psychosocial factors in cardiology: Update 2013 / K.H. Ladwig, F. Lederbogen, C. Albus [et al.] // GMS German Medical Science. – 2014. – Vol. 12. – P.1-24.
11. Spruill T. M. Chronic Psychosocial Stress and Hypertension / T. M. Spruill // Curr. Hypertens. Rep. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 10-16.
12. Teplan M. Direct effects of audio-visual stimulation on EEG / M. Teplan, A. Krakovská, S. Stolic // Comput Methods Programs Biomed. – 2011. – V. 102, № 1. – P. 17–24.

Матеріал надійшов до редакції 12.06.2014 р.

Інформація для авторів

З метою дотримання міжнародних правил оформлення, авторам рекомендується ознайомитися з “Єдиними Вимогами до Рукописів для Біомедичних Журналів” на www.icmje.org.

У якості невід’ємної частини процесу публікації, автори, рецензенти і редактори повинні повідомити про будь-які конфлікти інтересів і надати детальну інформацію, підписавши форму Заяви про Службову Етику та надіславши її на адресу редакції журналу. Авторі рукописів зобов’язані поважати право приватності пацієнта. Перед початком дослідження пацієнт повинен заповнити і розписатися у формі Заяви про Інформовану Згоду. До статті додається акт експертної комісії про відсутність конфіденційної інформації та направлення установи. В направленні засвідчується, що жодна частина рукопису не була опублікована і не прийнята до друку іншими виданнями.

Статті публікуються українською, російською або англійською мовами. Авторський оригінал подається у двох примірниках, що складаються із основного тексту (стаття – 15 сторінок, огляд – 20 сторінок, коротке повідомлення – 7 сторінок); списку літератури (статті – до 20, огляди – до 50, короткі повідомлення – до 15 джерел); таблиць; ілюстрацій (не більше 4); назв рисунків; анотацій українською, російською та англійською мовами (орієнтовно 250 слів), що повинні містити обґрунтування мети, матеріалів та методів, результати дослідження.

На першій сторінці зазначаються: шифр УДК; прізвища авторів, ініціали, наукові ступені та звання; назва статті; установи, де працюють автори, місто; ключові слова – від 5 до 10 слів або словосполучень, що розкривають зміст статті. Назва статті російською, українською та англійською мовами повинна бути стислою і не перевищувати 120 символів. Підзаголовок є прийнятним. Текст статті повинен бути структурований наступним чином: вступ, мета, матеріал і методи, результати та висновок. На останній сторінці тексту власноручні підписи всіх авторів: прізвище, ім’я та по-батькові, поштова адреса, номери телефонів (службовий, домашній), за якими редакція буде контактувати із авторами. Подаючи статтю до редакції, автори тим самим підтверджують оригінальність роботи. Це означає, що авторські права або будь-які інші права власності третіх осіб не порушуються. Підписами автори засвідчують, що жодна частина рукопису не була опублікована і не прийнята до друку іншими виданнями. Текст друкується шрифтом не менше 2,8 мм на білому папері через два інтервали, на аркушах формату A4 (210×297 мм), поля з усіх боків по 20 мм. Крім двох роздрукованих копій, матеріал потрібно надати на компакт-диск, текст статті повинен бути у форматі Microsoft Word. Латинські терміни, іншомовні слова повинні бути надруковані курсивом. Тільки загальноновживані скорочення можуть подаватися без пояснення. Скорочення у назві статті не є прийнятними. Всі величини приводяться в одиницях SI, однак допустимими є й інші загальноновживані позначення та одиниці вимірювання (l, min., h, C, Da, cal). Ілюстрації (рисунки, фотографії) повинні бути пронумеровані. Назви рисунків повинні бути надруковані на окремій сторінці. Малюнки повинні бути виконані з використанням інструментів, доступних у текстових редакторах або в Excel. Фотографії повинні бути високоякісними. Таблиці розміщуються на окремих аркушах, нумеруються послідовно, кожна сторінка супроводжується коротким заголовком. Рисунки є доповненням до тексту статті і не повинні повторювати інформації, поданої у рукописі. На звороті рисунків олівцем ставлять їхні порядкові номери, зазначають прізвище першого автора, скорочену назву статті. Список літератури оформлюється на окремих сторінках без скорочень. Авторі подаються за абеткою, спочатку джерела кирилицею, потім латиницею. Посилання у тексті позначаються цифрами у [квадратних] дужках. Порядок оформлення списку літератури: для монографій – Прізвище, ініціали. Назва книги. Місце видання: видавництво, рік видання. Кількість сторінок; для журналів – Прізвище, ініціали. Назва статті. Назва журналу. Том, номер. Рік: сторінки, на яких вміщено статтю.

Одночасно, автори надають повний переклад тексту, підписуноків підписів і табличних матеріалів англійською мовою. У переліку використаної літератури посилання, наведені кирилицею, транслітеруються із застосуванням програми “Trans 1.02” або подібних програм.

Усі рукописи журналу рецензовані незалежними експертами. Процедура рецензування включає перевірку статті протягом двох тижнів двома спеціалістами, призначеними редакційною радою. Рукопис із рецензією надсилається автору для внесення коректив перед остаточним поданням статті до редакції журналу.

Після публікації статті автори передають авторські права редакції журналу. Редакція залишає за собою право змінювати і виправляти рукопис, однак внесені корективи не повинні змінювати загального змісту та наукового значення статті.

Залучаючи до дослідження пацієнтів, автори несуть відповідальність за виконання етичних стандартів Гельсінкської декларації 1975 із поправками 2005 року. Рукопис повинен містити наступний пункт: “Ми заявляємо, що під час дослідження права пацієнтів були враховані у відповідності до вимог Гельсінкської конвенції”. При виникненні сумнівів щодо відповідності рукопису до вимог Гельсінкської декларації, автори будуть зобов’язані відзвітуватися про сумнівні аспекти дослідження і обґрунтувати підстави свого підходу.

Якщо дослідження виконується без залучення лабораторних тварин, рукопис повинен містити наступний пункт: “Ми заявляємо, що ми не проводимо досліджень на тваринах”. Дослідження, які проводяться на тваринах, повинні відбуватися у відповідності із встановленими інституціональними нормами використання лабораторних тварин. Науковці повинні керуватися принципами гуманного ставлення до тварин, що використовуються в дослідках. Необхідно подати наступну інформацію: вид тварин, генетичний статус: лінія (згідно правил стандартного позначення ліній лабораторних тварин); категорія лабораторних тварин або їх мікробіологічний статус; маса та вік тварин на початку експерименту; карантин або тривалість періоду акліматизації під час перевезення тварин на великі відстані; утримання тварин під час експерименту (параметри мікроклімату, температура, вологість, об’єм повітря, світловий режим, тип клітки, тип підстилки). Авторі повинні підтвердити відповідність нормативам утримання та годування тварин (Європейська конвенція по захисту хребтових тварин, що використовуються за експериментальною або іншою метою. – Страсбург, 1986), наявність сертифікату якості, а також повідомити джерело набуття тварин. Необхідно описати всі процедури, які виконуються на тварині, дози препаратів, що вводилися, хірургічні втручання та інші дії, а також відмітити використання при цьому методів анестезії (див. інформацію про Права Людини і Тварини).

Ці правила поширюються на всі види рукописів, у тому числі статті, короткі доповіді, коментарі до клінічних випробувань. Рукописи, які не відповідають цим вимогам, будуть повернені авторам для корекції.

Information for authors

In order to comply with the international regulations, the authors are strongly encouraged to consult the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" at www.icmje.org.

As an integral part of the publication process, the authors, reviewers and editors are required to confirm whether they have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these in the following Conflict of Interest Statement Form. The authors of the articles will respect the patients' right to privacy. Upon the familiarization with the abovementioned details, the patient must complete the Standard Statement of Informed Consent Form. The lack of confidential data must be certified by the act of expert committee attached to the article. The referral from the corresponding establishment with the statement that neither part of the suggested research has been published or accepted for publication in other journals must be sent with it as well.

Articles in Ukrainian, Russian or English are accepted for publication in The Medical and Ecological Problems. The article is submitted to journal in two copies. The article comprises the text of the research (15 pages for articles, 20 pages for reviews, 7 pages for brief reports); the list of cited literature (20 positions at most for articles; 50 positions at most for reviews; 15 positions at most for brief reports); tables, figures (no more than 4); legends and captions; summaries in Ukrainian, Russian and English (approximately 250 words) providing the arguments in support of the aim of the research, explanation of materials and methods, the results and conclusions.

The first page contains UDC code, author's record (name, initials, scholar degrees, title, the title of the article, institution, city) and keywords – from 5 to 10 words or phrases revealing the content of the article. Title of the paper in Russian, Ukrainian and English should be concise, it must not exceed 120 characters. A subtitle is acceptable. The text of original papers must be divided into paragraphs, including introduction, the aim of the research, materials and methods, results and conclusions. The last page must be manually signed by author(s) of the article, featuring first name, last name and patronymic, address, telephone numbers (office, home) for Editorial office to keep contact with. By submitting a paper to the editor, authors thereby confirm the original form of the articles, which means that the copyright or any other property rights of the third parties are not violated. The author(s) sign the article thereby certifying that neither part of the suggested research has been published or accepted for publication in other journals. The text of the manuscript must be in printing type no less than 2,8 mm, double-spaced, on A4-size sheets (210×297 mm); margins from each side – 20 mm. Along with 2 printed copies, the manuscript is provided in Microsoft Word format on electronic media. Latin notions and foreign words must be typed in italics. Only common abbreviations may be left unexplained. No abbreviations are acceptable in the title. All values are set in SI units; however, other generally used abbreviations and units (l, min., h, C, Da, cal) are also accepted. Figures (drawings, photographs) must be numbered. Figure captions are to be printed on a separate page. Drawings should be prepared using tools available in Word processors or in Excel. Photographs must be of high quality. Tables should be on separate sheets, numbered consecutively and headed by a concise title. Figures are adjuncts to the text and should not repeat material presented therein. On the reverse side of the figures it is necessary to write with a pencil their sequence numbers, name of the first author and the short title of the article. The list of cited literature is provided on a separate page without abbreviations. The authors are stated in alphabetical order, at first the sources in Cyrillic alphabet, then in Roman alphabet. The references in the text are indicated in [square] brackets. The cited works are to be compiled in the following way: for monographies – Name, initials. Book name. Place of publication. Publishing house, year. Total number of pages; for journals – Name, initials. Article name. Abbreviated name of journal. Volume, number: pages containing the article.

At the same time the authors provide full translation of the article's text, picture captions and table materials into English. In the list of references, the Cyrillic positions must be transliterated with the use of "Trans 1.02" or similar programs.

The original papers are peer-reviewed. Usually editorial staff chooses two readers who review papers during two weeks. The manuscript with review is sent to authors and after being corrected is delivered to editorial office for final acceptance.

Upon publication of the paper, the authors transfer the copyright to the Editorial office of the journal. The Editorial office reserves the right to alter and correct the manuscript considered for publication in the way that will not change its overall content and value.

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures were performed in accordance with the ethical standards of Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2005. Therefore the manuscript must include the following clause: "We declare that during research the rights of patients were taken into consideration according to Helsinki Convention". If doubts for that matter arise, the authors must account for the doubtful aspects of the study and explain the reasons for their approach.

If the research does not presuppose experiments on laboratory animals, the article must include the following statement: "We declare that we do not perform research on animals". When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the institutional and national guides for care and use of laboratory animals were respected. The authors must follow the principles of humane attitude to animals used in experiments. They must submit the following information: type of animals, genetic status: the line (according to standard rules of defining the lines of laboratory animals); the category of laboratory animals or their microbiological status; weight and age of animals at the beginning of the experiment; quarantine or acclimatization period during transportation over long distances; maintenance conditions during the experiment (microclimate parameters, temperature, humidity, air volume, light conditions, cage type, type of bedding material). The authors must prove the compliance with normative standards on animals maintenance and foddering (European Convention for the Protection of vertebral animals used in experiments or other purposes. – Strasbourg, 1986) and provide the information as to the acquisition source of animals, as well as the quality certificate. It is necessary to describe all procedures performed on animals, introduced doses of medications, surgical interventions and other actions, the use of anesthesia methods (See Statement of Human and Animal Rights).

The abovementioned requirements must apply to all original papers, including original research, brief reports, case reports and also for comments on clinical trials. Manuscripts that do not meet these requirements will be returned to authors for correction.