

Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»
Українська Академія наук національного прогресу

Проблеми екології та медицини

Том 17 N5-6 2013

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Заснований в 1997 році

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

ФАТАЛЬНІ ПНЕВМОНІЇ В ГЕМАТОЛОГІЇ: ОСНОВНІ ЕТІОЛОГІЧНІ ЗБУДНИКИ

Борисова І.С......3

ENGLISH VERSION: FATAL PNEUMONIAS IN HEMATOLOGY: MAIN ETIOLOGIC CAUSATIVE AGENTS

Borysova I.S......6

УДОСКОНАЛЕННЯ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНИХ ФОРМ ІНФЕКЦІЇ, ЗУМОВЛЕНОЇ ВІРУСОМ ЕПШТЕЙНА-БАРР

Боднар В.А......9

ENGLISH VERSION: THE IMPROVEMENT OF DIAGNOSIS OF CHRONIC EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION

Bodnar V.A......12

РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ ГАПЛОТИПІВ ПОЛІМОРФНИХ ГЕНІВ TLR 2, TLR 4, CLC-10 ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З ОКРЕМИМИ ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ У ХВОРИХ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ

Сакевич В. Д......16

ENGLISH VERSION: PREVALENCE OF HAPLOTYPES OF POLYMORPHIC GENES TLR 2, TLR 4, CLC-10 AND THEIR ASSOCIATION WITH SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS

Sakevych V. D......20

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

ХРОНОЛОГІЯ ДЕСТРУКТИВНО-ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ТА ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНСУЛЬТІ У ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР

Колесник В.В......24

ENGLISH VERSION: CHRONOLOGY OF DESTRUCTIVE AND DEGENERATIVE INFLAMATION PROCESSES IN WISTAR RATS WITH EXPERIMENTAL BRAIN STROKE

Kolesnyk V. V......28

ДИНАМІКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ІОННОГО ОБМЕНА В ОРГАНІЗМІ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ОЛИГОЭФИРОВ В ПОДОСТРОМ ОПЫТЕ

Багмут И. Ю.*, Жуков В. И., Зайцева О. В., Книгавко В. Г......32

ENGLISH VERSION: DYNAMICS OF THE IONIC METABOLISM INDICES IN RATS UNDER OLIGOETHERS INFLUENCE AT SUBACUTE EXPERIMENT

Bagmut I.Yu*, Zhukov V.I., Zaitseva O.V., Knigavko V.G......35

ТРИВАЛИЙ ВПЛИВ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ НА ВМІСТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ТА ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

Маракушин Д.І......38

ENGLISH VERSION: LONG-DURATION ACTION OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES ON CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS AND CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF RATS

Marakushin D.I.42

СТОМАТОЛОГІЯ

КОНЦЕНТРАЦІЯ АЛАНІН- ТА АСПАРТАТ- АМІНОТРАНСФЕРАЗ У ПАРОДОНТАЛЬНИХ КИШЕННЯХ ЯК МАРКЕР АКТИВНОСТІ ЗАПАЛЕННЯ ПРИ КОНСЕРВАТИВНОМУ ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОГО ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ПАРОДОНТИТУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АЗИТРОМІЦИНУ

Скрипников П.М., Непокупна-Слободянюк Т.С., Шинкевич В.І.46

ENGLISH VERSION: LEVELS OF ALANINE- AND ASPARTATE AMINOTRANSFERASES IN PERIODONTAL POCKETS IN OUTCOMES OF CHRONIC PERIODONTITIS THERAPY WITH AZITHROMYCIN

Skrypnikov P., Nepokupna-Slobodyanyuk T. *, Shynkevich V.51

ЦИТОКІНОВИЙ СТАТУС ПАЦІЄНТІВ МОЛОДОГО ВІКУ З ПЕРЕЛОМАМИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПРИ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОМУ ЗАСТОСУВАННІ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ

Ружін Г. П., Чирік О. І., Калініченко С. В.*56

ENGLISH VERSION: CYTOKINE PROFILE IN YOUNG PATIENTS WITH MANDIBULAR FRACTURES NOT TREATED WITH ANTIBIOTIC THERAPY

Ruzin G., Chyryk O., Kalinichenko S.60

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

ОБГРУНТУВАННЯ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМИХ РІВНІВ ФЛУОПІКОЛІДУ В ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУРАХ, ВИРОЩЕНИХ З ЗАСТОСУВАННЯМ ФУНГІЦИДУ ІНФІНІТО SC 61,9, К.С.

Пельо І.М., Благая А.В......63

ENGLISH VERSION: SUBSTANTIATION OF FLUOPICOLIDE MAXIMUM RESIDUE LEVELS IN VEGETABLES GROWN WITH INFINITO SC 61,9 FUNGICIDE APPLICATIONS

Pelo I.M., Blagaia A.V.67

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2,4 ТА БІЛКА КЛІТИН КЛАРА В РОЗВИТКУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДОРΟΣЛИХ

Ляховська Н.В., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашеев І.П......71

ENGLISH VERSION: THE ROLE OF GENES POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2,4 AND CLARA CELL PROTEIN IN THE DEVELOPMENT OF ASTHMA IN ADULTS

Lyahovskaya N.V., Izmailova O.V., Shlykova O.A., Kaydashev I.P.76

ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ

INFORMATION FOR AUTHORS

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Борисова І.С.

УДК 616.24-002-02:612.017.2

ФАТАЛЬНІ ПНЕВМОНІЇ В ГЕМАТОЛОГІЇ: ОСНОВНІ ЕТІОЛОГІЧНІ ЗБУДНИКИ*

Борисова І.С.

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

В роботі опеделена частота возникновения и спектр основных инфекционных возбудителей фатальных пневмоний у больных с тяжелыми нарушениями иммунитета на фоне онкогематологических заболеваний, которые проходили лечение в гематологическом центре КЗ «Днепропетровская городская многопрофильная клиническая больница № 4 ДОР» на протяжении 2005-2011 гг. Удельная часть возникновения пневмоний в группе исследуемых составила 19,94%. В структуре смертности больных на фоне онкогематологических заболеваний удельная часть больных с пневмонией составила почти 50%. По результатам микробиологических, серологических и патологоанатомических исследований 151 больного с пневмонией на фоне онкогематологических заболеваний возбудители пневмонии были выявлены в 44,37% исследований. Грампозитивные микроорганизмы определены в 25,38% исследований, грамотрицательные - в 56,14% исследований; в 8,95% исследований доказана грибковая этиология пневмонии и поражение цитомегаловирусом. Признаки вирусного поражения легких определено 20,8%.

Ключевые слова: пневмония, инфекционные возбудители, онкогематологические заболевания

Розповсюдженість пневмоній, не дивлячись на досягнення сучасної медицини (стандартизовані підходи до діагностики захворювання, сучасні протоколи лікування, засновані на принципах доказової медицини), постійно підвищується. За даними ВООЗ, в 40% випадків тривалість життя людей у світі зменшується за рахунок інфекційних захворювань, при цьому пневмонія займає четверте місце серед причин смертності в загальній популяції [8, 10]. Хворі з онкогематологічними захворюваннями мають більш високий ризик розвитку пневмонії, чим в середньому в популяції, згідно з рівнем доказовості I, у зв'язку із наявністю багатьох факторів ризику [10]. Від 20 до 50% хворих з онкогематологічними захворюваннями на тлі цитостатичного лікування хворіють на пневмонії. При цьому, летальність є досить високою і становить 28% [4, 10].

Серйозність даної проблеми в онкогематології пояснюється значною частотою виникнення, мізерністю клінічних проявів, тяжким перебігом, частими ускладненнями, та стрімкістю розвитку фатальних ісходів пневмонії, що може розглядатися як прояв цитостатичної хвороби [1]. Проблемні питання етіологічного діагнозу та лікування позагоспітальної і нозокоміальної пневмонії активно вивчаються і широко висвітлені у вітчизняній науковій літературі [2, 3, 7]. В той же час, відсутні роботи, що присвячені проблемі визначення спектру збудників фатальних пневмоній хворих з онкогематологічними захворюваннями. Всі рекомендації та клінічні дослідження, що доступні і використовуються в гематології що до супровідної терапії, в тому числі і антибіотикотерапія (АБТ),

засновані на міжнародному досвіді та проведені в зарубіжних країнах [9, 10]. Саме тому, увагу дослідників привертає питання етіологічної діагностики та лікування пневмонії у хворих на фоні онкогематологічної патології, що пов'язано в першу чергу з високою частотою летальних ісходів.

Мета роботи: визначити частоту виникнення та спектр основних інфекційних збудників фатальних пневмоній на фоні онкогематологічних захворювань.

Матеріали та методи дослідження

Всього досліджено етіологію фатальних пневмоній 151 хворого з тяжкими порушеннями імунітету на фоні онкогематологічних захворювань крові, що проходили лікування на базі гематологічного центру КЗ «Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4 ДОР» на протязі 2005-2011 рр. Вік хворих становив від 32 до 73 років. Серед досліджуваних - 53 жінки і 98 чоловіків. Діагноз онкогематологічних захворювань був верифікований згідно загальноприйнятим клінічним та морфологічним критеріям [1, 6, 10]. Діагноз пневмонії було верифіковано згідно сучасним науковим критеріям та відповідно до Наказу МОЗ України №128 від 19.03.2007р. [5, 8]. Дослідження включало: аналіз архівного і клінічного матеріалу для оцінки частоти виникнення пневмоній на різних етапах програмного лікування та протоколи патологоанатомічного дослідження. Для визначення етіологічних збудників пневмоній проводилися бактеріологічні та серологічні методи ідентифікації мікроорганізмів, аналізувалися ма-

* Цитування при атестації кадрів: Борисова І.С. Фатальні пневмонії в гематології: основні етіологічні збудники // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 3 –6.

кроанатомічні дані патологоанатомічних досліджень [5, 8]. Матеріалом для ідентифікації збудників пневмонії були: мокротиння, що отримане методом індукції мокротиння, рідина трахеобронхіального лаважа, венозна кров [5, 8, 10]. Мікробіологічне дослідження проводилося шляхом вивчення нативних мазків із визначенням основних морфологічних типів. Проведення якісного мікробіологічного дослідження проводили поетапно на щільних диференціально-поживних середовищах: Блаурока, ЖСА, ЕНДО, Сабуро, кров'яний та шоколадний агарі. Виділення анаеробів проводили на збагаченому кров'яному агарі +0,5 твін-80, в умовах анаеробного культивування в анаеростаті. Ступінь обсіменіння вихідного матеріалу визначався підрахунком кількості колоній (КУО), які виростили з урахуванням ступеню розведення та обсягу засівної дози. Показники 104 - 105 оцінювали як середній ступінь мікробного обсіменіння, понад 105 - як високий. Статистична обробка отриманих результатів виконана за допомогою стандартного пакету функцій "MS Excel".

Результати та їх обговорення

За період 2005-2011 рр. в гематологічному центрі КЗ «Дніпропетровська міська багатoproфільна клінічна лікарня № 4 ДОР» було госпіталізовано та проліковано більше ніж 10 тисяч хворих із онкогематологічними захворюваннями. Розподіл за роками госпіталі-

зованих хворих та хворих на пневмонію, в тому числі фатальну, наведено в таблиці 1.

В 2005 р. із 1337 госпіталізованих 294 (21,9%) хворих перенесли пневмонію. Померло 20 хворих на пневмонію, що становило 35,7% від всіх померлих та 6,8% від всіх хворих на пневмонію. В 2006 р. із 1330 госпіталізованих 318 (23,9%) хворих перенесли пневмонію. Померло 23 хворих на пневмонію, що становило 40,0% від всіх померлих та 7,2% від всіх хворих на пневмонію. В 2007 р. із 1383 госпіталізованих 271 (19,6%) хворих перенесли пневмонію. Померло 19 хворих на пневмонію, що становило 34,5% від всіх померлих та 7,0% від всіх хворих на пневмонію. В 2008 р. із 1441 госпіталізованих 268 (18,6%) хворих перенесли пневмонію. Померло 17 хворих на пневмонію, що становило 13,0% від всіх померлих та 2,6% від всіх хворих на пневмонію. В 2009 р. з 1457 госпіталізованих 298 (20,5%) хворих перенесли пневмонію. Померло 22 хворих на пневмонію, що становило 40,7% від всіх померлих та 7,4% від всіх хворих на пневмонію. В 2010 та 2011 рр. госпіталізовано 1650 і 1620 хворих, хворіли на пневмонію 301 (18,2%) і 267 (16,5%) хворих відповідно. Померло 24 та 26 хворих на пневмонію, що становило 44,4% та 63,4% від всіх померлих та 8,0% і 9,7% від хворих на пневмонію, відповідно.

Таблиця 1.

Розподіл хворих з онкогематологічними захворюваннями та пневмоніями гематологічного центру КЗ «Дніпропетровська міська багатoproфільна клінічна лікарня № 4» ДОР» за роками

Рік	Госпіталізовано	Померли		Хворих на пневмонію		Хворих на пневмонію, що померли		
	Кількість	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	% від померлих	% від хворих на пневмонію
2005	1337	56	4,19	294	21,9	20	35,7	6,8
2006	1330	57	4,28	318	23,9	23	40,3	7,2
2007	1383	55	3,98	271	19,6	19	34,5	7,0
2008	1441	54	3,75	268	18,6	17	13,0	2,6
2009	1457	54	3,70	298	20,5	22	40,7	7,4
2010	1650	54	3,27	301	18,2	24	44,4	8,0
2011	1620	41	2,53	267	16,5	26	63,4	9,7
Всього	10218	371	3,34	2017	19,94	151	40,7	7,49

Отже, за період 2005-2011 рр. питома вага виникнення пневмонії у хворих на фоні онкогематологічної патології становила 19,94%. Показник смертності від пневмонії склав 7,49%. При цьому, в структурі смертності хворих на фоні онкогематологічної патології хворі з пневмонією становили 40,7%.

Розподіл хворих групи дослідження за нозологічними формами онкогематологічної патології був наступний: у 54 (36%) хворих фатальні пневмонії виникали на фоні гострого мієлобласного лейкозу; у 23 (16%) хворих – на фоні гострого лімфобласного лейкозу; у 38 (25%) хворих – на фоні хронічного лімфолейкозу; у 12 (5%) хворих – на фоні хронічного мієлолейкозу; інші захворювання (множинна мієлома, цитопенічний синдром, агранулоцитоз, мієлодиспластичний синдром) складали 18%.

В групі дослідження, у 77 хворих на фоні гострих лейкозів фатальні пневмонії виникали в I-й стадії захворювання за умов виникнення нейтропенії. Серед хворих на хронічні онкогематологічні захворювання фатальні пневмонії виникали: у 25 хворих - в термінальних стадіях захворювання, у 14 хворих - при неможливості досягти ремісії на фоні нейтропенії. Виникненню пневмонії в групі дослідження у 114 хворих передували інфекційні ускладнення: фебрильна нейтропенія - 77 хворих, прояви гострої вірусної інфекції - 8

хворих, клінічні ознаки важких кандидозних стоматитів та/або гінгівітів мали 19 хворих, 6 хворих мали ЛОР-патології (тонзиліти або синусити), у 4 хворих пневмонії передували бронхіт.

Отже, фатальні пневмонії у хворих на фоні онкогематологічних захворювань в 75,5% виникали на фоні інфекційних ускладнень, частіше на фоні фебрильної нейтропенії. Таким чином, фебрильна нейтропенія та інші інфекційні ускладнення можуть вважатися факторами ризику виникнення фатальних пневмоній на фоні онкогематологічних захворювань.

Всі померлі хворі на пневмонію групи дослідження відповідно до критеріїв тяжкості пневмонії мали важкий перебіг захворювання [5, 10]. Так, за даними аналізу перебігу пневмоній групи дослідження у 119 (78,8%) хворих виявлено двобічну локалізацію пневмонії; плеврит - у 97 (64,2%) хворих, з них - у 73 (48,5%) хворих - двохсторонній плеврит; абсцес - у 15 (9,9%) хворих; кровохаркання - у 9 (5,9%) хворих; ДН - у всіх хворих досліджуваної групи.

Хворі групи дослідження також мали інші фактори, що впливали на тяжкість перебігу пневмонії - вік старше за 60 років та наявність супутньої патології. В групі дослідження частка хворих старше 60 років становила 64,9% (98 хворих), молодше за 60 років - 35,1% (53 хворих). Кількість досліджуваних, що хворі-

ли на пневмонію без супутніх захворювань складало 9 (5,9%) хворих; 29 (19,2%) хворих мали 1 супутнє захворювання; 54 (35,8%) хворих - 2 супутніх захворювання; 55 (36,4%) хворих - 3 супутніх захворювання і більше. Перебіг пневмонії хворих групи дослідження найчастіше обтяжували: гепатит і анемія; у хворих віком старших за 60 років – ішемічна хвороба серця з порушеннями серцевого ритму та/або хронічною серцевою недостатністю. У хворих з 2 та 3 супутніми за-

хворюваннями зустрічались хронічні захворювання шлунково-кишкового тракту і нирок.

Результати ідентифікації етіологічних збудників фатальних пневмоній хворих на фоні онкогематологічних захворювань що проходили лікування на базі гематологічного центру КЗ «Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4 ДОР» за період 2005-2011 рр. представлені в таблиці 2.

Таблиця 2.

Результати бактеріологічних та серологічних досліджень хворих на пневмонію на фоні онкогематологічних захворювань

Показники	Кількість	
	n	%
Хворих на пневмонії на фоні онкогематологічних захворювань	151	100
Ідентифікований етіологічний збудник пневмонії за життя	67	44,37
Гр - бактеріальні патогени	38	56,72
Гр + бактеріальні патогени	17	25,38
Ідентифіковано грибові патогени	6	8,95
Ідентифіковано ураження ЦМВ	6	8,95

За результатами бактеріологічних та серологічних досліджень етіологічних збудників фатальних пневмоній на фоні онкогематологічних захворювань 151 хворого групи дослідження, етіологічні збудники пневмонії були визначені у 67 хворих, що склало 44,37% досліджених. Грампозитивні мікроорганізми в групі дослідження були визначені у 17 хворих, що становило 25,38%, грамнегативні - у 38 хворих, що становило 56,72%; у 6 хворих доведено грибкову етіологію пневмонії, що становило 8,95%, у 6 хворих доведено ураження цитомегаловірусом, що становило 8,95%. При цьому, асоціації збудників були визначені у 43 хворих, що склало в 64,18%. Серед грамнегативних мікроорганізмів частіше визначали неферментуючі бактерії - *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* та невизначені Гр – НФБ. Серед грампозитивних мікроорганізмів частіше визначали *Streptococcus pneumoniae*. Серед асоціацій збудників частіше зустрічались грамнегативні мікроорганізми з грибами роду *Candida spp.* Етіологічним чинником фатальних пневмоній мікозної етіології були гриби роду *Aspergillus spp.* Не визначено етіологічний збудник пневмонії у 15 хворих, що становило 20,8%, але за даними протоколів патологоанатомічного розтину у них були визначені макроанатомічні ознаки вірусного ураження легень.

Висновки:

1. За період 2005-2011 рр. питома вага виникнення пневмонії у хворих в гематологічному центрі КЗ «Дніпропетровська міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4 ДОР» становила 19,94%. В структурі смертності хворих на фоні онкогематологічних захворювань хворі з пневмонією становили майже 50%.

2. Перебіг фатальних пневмоній у хворих на фоні онкогематологічних захворювань характеризувався тяжким перебігом. Факторами, що обтяжували перебіг пневмонії були: задишка, двобічне ураження легень, плеврит одно- або двохсторонній, абсцес, швидке прогресування захворювання на фоні АБТ, вік хворих за 60 років та наявність супутніх захворювань. Тяжкий перебіг захворювання, фебрильна нейтропенія та інші інфекції верхніх дихальних шляхів можуть вважатися факторами ризику розвитку фатальних пневмоній.

3. За результатами мікробіологічних, серологічних та патологоанатомічних досліджень 151 хворого з пневмонією на фоні онкогематологічних захворювань

за період 2005-2011 рр. етіологічні збудники захворювання було визначено в 44,37% досліджень. Грампозитивні мікроорганізми визначені в 25,38% досліджень, грамнегативні - в 56,14% досліджень; в 8,95% досліджень доведено грибкову етіологію пневмонії та ураження цитомегаловірусом. Ознаки вірусного ураження легень за даними протоколів патологоанатомічного розтину визначені в 20,8%.

4. За даними позитивних результатів мікробіологічних досліджень мокротиння та рідини бронхоальвеолярного лаважа визначено, що найчастішими етіологічними збудниками фатальних пневмоній у хворих на фоні онкогематологічних захворювань були представники нозокоміальних інфекцій: *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* та невизначені Гр– НФБ. Асоціації збудників визначено в 64,18% випадків.

Література

1. Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева. – М: Ньюдиамед. - Том 3, 2005. – 361 с.
2. Дзюблик, О.Я. Спектр вірусних збудників у хворих на негоспітальну пневмонію / О.Я. Дзюблик, І.В. Дзюблик, Р.Є. Сухін та ін. // Український пульмонологічний журнал. - 2010.-№ 1. – С. 27-30.
3. Дзюблик, О.Я. Клінічні аспекти антибіотикорезистентності збудників негоспітальних інфекцій дихальних шляхів / О.Я. Дзюблик // Український пульмонологічний журнал. – 2010 - №3. – С.53-56.
4. Клясова, Г.А. Фунгемія у больных с гемобластомами и ее исходы. / Г.А. Клясова, Н.А. Петрова, Л.К. Алехина и соав.// Проблемы гематологии - 2002. - № 1. – С. 39-45.
5. Наказ «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія». – К.: Велес, 2007. – С. 105-146.
6. Наказ МОЗ України № 647 від 30.07.2010 р.
7. Перцева, Т.А. Особенности этиологической диагностики и лечения нозокомиальной пневмонии /Мистецтво лікування // Т.А. Перцева, Р.А. Бонцевич – 2003. – № 4. – С. 31-34.
8. Фещенко, Ю.І. Негоспітальна пневмонія у дорослих осіб: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, антибіотикотерапія (Проект клінічних настанов) / Ю.І. Фещенко, О.А. Голубовська, К.А. Гончаров, О.Я. Дзюблик // Український пульмонологічний журнал. - 2012. - №4. – С. 5-17.
9. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European society of pneumology task group on BAL // Eur. Resp. J.- 1990.- Vol.3- 937-934.
10. Heizmann, W. R. Infektionen bei schwerkranken Patienten / W.R. Heizmann, S. Kljucar, P. Heizmann. – Berlin: Vademecum Infektiologie 2003/2004. – 179 S.

English version: FATAL PNEUMONIAS IN HEMATOLOGY: MAIN ETIOLOGIC CAUSATIVE AGENTS*

Borysova I.S.

SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»,

In the work incidence of pneumonia development and spectrum of the main infectious causative agents of fatal pneumonias were defined in patients with severe disorders of immunity against a background of oncologic-hematologic blood diseases, who have undergone treatment in hematology center of CE «Dnipropetrovsk city multi-type clinical hospital № 4» over the period from 2005 to 2011. Bulky weight of pneumonia development in the patients under study was 19,94%. In the structure of mortality of patients against oncologic-hematologic blood diseases patients with pneumonia amounted almost 50%. By the results of microbiologic, serologic and post-mortem investigations of 151 patients with pneumonia against the background of oncologic-hematologic diseases, etiologic causative agents of the disease were defined in 44,37% of investigations. Gram-positive microorganisms are defined in 25,38% of investigations, gram-negative - in 56,14% of investigations; in 8,95% of investigations mycotic etiology of pneumonia and affection with cytomegalovirus was proved. Signs of viral affection of the lungs were defined in 20,8%.

Key words: Pneumonia, Infectious causative agents, Oncologic-hematologic diseases

Despite the achievements of modern medicine (standardized approaches to diagnostics of the disease, modern treatment protocols, based on the principles of evidence-based medicine) prevalence of pneumonias constantly increases. By the WHO data, in 40% of cases life span of people in the world decreases at the expense of infectious diseases, therewith pneumonia occupies the fourth place among the causes of mortality in general population [8, 10]. Patients with oncologic-hematologic diseases are at a higher risk of pneumonia development, than on average in population according to the level of evidential agreement I, due to a lot of risk factors [10]. From 20 to 50% of patients with oncologic-hematologic diseases against a background of cytostatic treatment are ill with pneumonia. Herein lethality is high enough and makes up 28% [4, 10].

Gravity of this problem in oncologic hematology is explained by a significant prevalence of development, scanty number of clinical manifestations, severe course, frequent complications and impetuosity of development of fatal outcomes of pneumonias; this may be considered as manifestation of cytostatic disease [1]. Problem questions of diagnosis and treatment of extra-hospital and nosocomial pneumonia are being studied actively and being elucidated in domestic science literature [2, 3, 7]. At the same time the works, devoted to the problem of defining spectrum of causative agents of fatal pneumonias in patients with oncologic-hematologic diseases are absent. All recommendations and clinical investigations, which are available and are being used in hematology as for accompanying therapy, ABT including, are based on international experience and have been carried out in foreign countries [9, 10]. That is precisely why investigators pay attention to the problems of etiologic diagnostics and treatment of pneumonia against background of oncologic-hematologic pathology; this is primarily linked with a high incidence of lethal outcomes in patients.

Aim of the work: to define incidence of development and spectrum of the main infectious causative agents of fatal pneumonias against the background of oncologic-hematologic diseases.

Materials and methods

Altogether etiology of fatal pneumonias was investigated in 151 patients with severe disorders of immunity against a background of oncologic-hematologic blood diseases who have undergone treatment in hematology center of CE «Dnipropetrovsk city multi-type clinical hospital № 4» over the period from 2005 to 2011. Patients' age ranged from 32 to 73 years. There were 53 female and 98 male patients. Diagnosis of oncologic-hematologic diseases was verified in accordance with generally accepted clinical and morphologic criteria [1, 6, 10]. Diagnosis of pneumonia was verified in accordance with up-to-date scientific criteria and in accordance with the Order of HM of Ukraine №128 from 19.03.2007. [5, 8]. The investigation included: analysis of archive and clinical material for the assessment of incidence of pneumonia development at different stages of scheduled treatment and protocols of post-mortem study. For defining etiologic causative agents of pneumonia, bacteriologic and serologic methods of microorganisms identification were used, macro-anatomy and post-mortem data were analyzed [5, 8]. Material for identification of etiologic causative agents of pneumonia was: sputum, obtained by method of sputum induction, fluid from trachea-bronchial lavage, venous blood [5, 8, 10]. Microbiologic investigation was performed by means of studying native smears with defining basic morphologic types. Carrying out of qualitative microbiologic investigation was done stage-by-stage on the thick differential-nutritional mediums. Isolation of anaerobes was carried out on the enriched blood agar +0,5 twin-80, under conditions of anaerobic cultivating in the anaerostat. Stage of dissemination of outgoing material was defined by calculating the number of colonies, which had grown, taking into account potency and amount of the dose inoculated. Indices 10^4 - 10^5 were assessed as a mean stage of microbial contamination, that of over 10^5 – as high. Statistic processing of the results obtained was made by means of the standard package of "MS Excel" functions.

* To cite this English version: Borysova I.S. Fatal pneumonias in hematology: main etiologic causative agents // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 6-8.

Results

Over the period from 2005 to 2011 more than 10 thousand patients with oncologic-hematologic diseases were hospitalized and treated in hematologic center of CE «Dnipropetrovsk city multi-type clinical hospital № 4». Distribution by the years of the hospitalized patients with pneumonia, including fatal is presented in the Table 1. In 2005 year of 1337 hospitalized patients 294 (21,9%) suffered pneumonia. 20 patients with pneumonia have died, this made up 35,7% of all died patients and 6,8% of all patients with pneumonia. In 2006 of 1330 hospitalized patients 318 (23,9%) suffered pneumonia. 23 patients with pneumonia have died, this made up 40,0% of all died and 7,2% of all patients with pneumonia. In 2007 year of 1383 patients 271 (19,6%) suf-

fered pneumonia. 19 patients with pneumonia have died, this made up 34,5% of all died and 7,0% of all patients with pneumonia. In 2008 of 1441 hospitalized patients 268 (18,6%) suffered pneumonia. 17 patients with pneumonia have died, this made up 13,0% of all died and 2,6% of all patients with pneumonia. In 2009 of 1457 hospitalized patients 298 (20,5%) suffered pneumonia. 22 patients with pneumonia have died, this made up 40,7% of all died and 7,4% of all patients with pneumonia. In 2010 and 2011 there were hospitalized 1650 and 1620 patients, 301 (18,2%) and 267 (16,5%) correspondingly had pneumonia. 24 and 26 patients with pneumonia have died, this made up 44,4% and 63,4% of all died and 8,0% and 9,7% of all patients with pneumonia, correspondingly.

Table 1.
Distribution of patients of hematologic center MI «Dnipropetrovsk multi-profile clinical hospital № 4» DRC» with oncologic-hematologic diseases and pneumonias by the years

Year	Hospitalized	Died		Pneumonia patients		Pneumonia patients, died		
	Number	Number	%	Number	%	Number	% of died	% of pneumonia patients
2005	1337	56	4,19	294	21,9	20	35,7	6,8
2006	1330	57	4,28	318	23,9	23	40,3	7,2
2007	1383	55	3,98	271	19,6	19	34,5	7,0
2008	1441	54	3,75	268	18,6	17	13,0	2,6
2009	1457	54	3,70	298	20,5	22	40,7	7,4
2010	1650	54	3,27	301	18,2	24	44,4	8,0
2011	1620	41	2,53	267	16,5	26	63,4	9,7
Total	10218	371	3,34	2017	19,94	151	40,7	7,49

Thus, over the period from 2005 to 2011 a bulky weight of development of pneumonia against a background of oncologic-hematologic pathology was 19,94%. Pneumonia mortality rate was 7,49%. Therewith, in the structure of mortality against oncologic-hematologic pathology, patients with pneumonia amounted 40,7%.

Distribution of patients of the group under study according to nosologic forms of oncologic-hematologic pathology was as follows: in 54 (36%) of patients fatal pneumonias developed against acute myeloblast leucosis; in 23 (16%) of patients – against acute lymphoblast leucosis; in 38 (25%) of patients – against chronic lympho-leucosis; in 12 (5%) of patients – against chronic myeloleucosis; other diseases (multiple myeloma, cytopenia syndrome, agranulocytosis, myelodysplasia syndrome) made up 18%.

In the group under study in 77 patients fatal pneumonia developed at I-st stage of the disease against acute leucosis under conditions of neutropenia development. Among the patients with chronic oncologic-hematologic diseases fatal pneumonias developed as follows: in 25 patients – at terminal stages of the disease, in 14 patients – where impossible to achieve remission against neutropenia. Development of pneumonia in the group under study was preceded by infectious complications in 114 patients: febrile neutropenia - 77 patients, manifestations of acute viral infection - 8 patients, clinical signs of severe candidiasis stomatitis and/or gingivitis - 19 patients, 6 patients had ENT-pathology (tonsillitis or sinusitis), in 4 patients pneumonia was preceded by bronchitis.

Thus, fatal pneumonias against oncologic-hematologic in 75,5% of patients developed against infectious complications, more often against febrile neutro-

penia. Like this, febrile neutropenia and other infectious complications may be considered as risk factors of development of fatal pneumonias against oncologic-hematologic diseases.

All died patients with pneumonia of the group under study had severe course of disease according to the criteria of pneumonia severity [5, 10]. So, by the data of analysis of pneumonia course in the group under study, 119 (78,8%) of patients had bilateral localization of pneumonia; 97 (64,2%) of patients had pleurisy, in 73 (48,5%) of patients – bilateral pleurisy; abscess - in 15 (9,9%) of patients; hemoptysis - in 9 (5,9%) of patients; respiratory insufficiency – in all patients of the group under study. Patients of the group under study had other factors, which influenced severity of pneumonia course: age over 60 years and presence of co-morbidity. In this group percentage of patients aged over 60 years was 64,9% (98 patients), under 60 years – 35,1% (53 patients). Number of patients with pneumonia without co-morbidity was 9 (5,9%) patients; 29 (19,2%) patients had 1 co-morbidity; 54 (35,8%) patients - 2 co-morbidities; 55 (36,4%) patients - 3 co-morbidities and more. Pneumonia course in this group the most often was aggravated by hepatitis and anemia; in patients aged over 60 years – ischemic heart disease with disorders of heart rhythm and/or chronic heart failure. In patients with 2 and 3 co-morbidities chronic diseases of alimentary tract and kidneys occurred.

Results of identification of etiologic causative agents of fatal pneumonias against oncologic-hematologic diseases, treated at hematologic center of CE «Dnipropetrovsk city multi-type clinical hospital № 4» over the period from 2005 to 2011 are presented in the Table 2.

Table 2

Results of bacteriologic and serologic investigations of patients with pneumonia against oncologic-hematologic diseases

Findings	Number	
	n	%
Patients with pneumonia against oncologic-hematologic diseases	151	100
Identified etiologic causative agent of pneumonia at life	67	44,37
Гр – bacterial pathogens	38	56,72
Гр + bacterial pathogens	17	25,38
Identified fungal pathogens	6	8,95
Identified lesion of CMV	6	8,95

By the results of bacteriologic and serologic investigations of etiologic causative agents of fatal pneumonias against oncologic-hematologic diseases in 151 patients, etiologic causative agents of pneumonia were defined in 67 patients, this made up 44,37% of patients under study. Gram-positive microorganisms in these patients were defined in 17 persons, this made up 25,38%, gram-negative - in 38 persons, this made up 56,72%; in 6 patients mycotic etiology of pneumonia was proved, this made up 8,95%, in 6 patients cytomegaloviral lesion was proved, this made up 8,95%. Herewith, associations of causative agents were defined in 43 patients, this made up 64,18%. Non-fermenting bacteria (NFB) - *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. and undetermined Gr - NFB were revealed the most often among gram-negative microorganisms. *Streptococcus pneumoniae* was revealed the most often among gram-positive microorganisms. Among associations of causative agents the most often gram-negative microorganisms with fungi of *Candida* spp. occurred. Fungi of *Aspergillus* spp species were etiologic causative agents of fatal pneumonias of mycotic etiology. In 15 patients (20,8%) etiologic causative agents of pneumonia were not defined, but by the data of postmortem dissection protocols macro-anatomic signs of viral damage of the lungs were defined.

Conclusions:

1. Over the period from 2005 to 2011 a bulky weight of development of pneumonia in patients of hematologic center of CE «Dnipropetrovsk city multi-type clinical hospital № 4» amounted 19,94%. In the structure of mortality rate against oncologic-hematologic diseases patients with pneumonia amounted almost 50%.

2. Course of fatal pneumonias in patients against oncologic-hematologic diseases is characterized by a severe course. Factors, aggravating pneumonia were: breathlessness, bilateral lesion of the lungs, pleurisy, both unilateral and bilateral, abscess, rapid progressing of the disease against ABT, patients' age over 60 and presence of co-morbidities. Severe course of the disease, febrile neutropenia and other infections of the upper respiratory airways may be considered as risk factors of fatal pneumonias development.

3. By the results of microbiologic, serologic and post-mortem studies of 151 pneumonia patients against the background oncologic-hematologic diseases over the period from 2005 to 2011, etiologic causative agents of the

disease were defined in 44,37% of studies. Gram-positive microorganisms were defined in 25,38% of studies, gram-negative - in 56,14% ones; in 8,95% of studies mycotic etiology of pneumonia and affection with cytomegalovirus was proved. Signs of viral affection of the lungs by the data of post-mortem protocols dissection were defined in 20,8%.

4. By the data of the positive results of microbiologic investigation of sputum and that of fluid from bronchial-alveolar lavage, it was defined that representatives of such nosocomial infections as: *Pseudomonas aeruginosa*, *E. Coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. and undefined Gr- NFB are the most frequent etiologic causative agents of fatal pneumonias against oncologic-hematologic diseases. Associations of causative agents were defined in 64,18% of cases.

References

1. Rukovodstvo po gematologii / pod red. A.I. Vorob'eva. – M: N'yudimed. - Tom 3, 2005. – 361 s.
2. Dzyublik, O.Ya. Spektr virusnich zbudnikiv u chvorich na negospita'nu pnevmoniyu / O.Ya Dzyublik., I.V. Dzyublik, R.E. Suchin ta in. // Ukraïns'kiy pul'monologichnyi zhurnal. - 2010.-№ 1. – S. 27-30.
3. Dzyublik, O.Ya. Klinichni aspekti antibiotiko-rezistentnosti zbudnikiv negospita'lnich infekziy dychal'nich shlyachiv / O.Ya. Dzyublik // Ukraïns'kiy pul'monologichnyi zhurnal. – 2010 - №3. – S.53-56.
4. Klyasova, G.A. Fungemiya u bol'nyh s gemoblastozami i ee ischody. / G.A. Klyasova, N.A. Petrova, L.K. Alechina i so-av. // Problemy gematologii - 2002. - № 1. – S. 39-45.
5. Nakaz «Pro zatverdzhennya klinichnich protokoliv nadannya medichnoi dopomogi za spezial'nisty «Pul'monologiya». – K.: Veles, 2007. – S. 105-146.
6. Nakaz MOZ Ukraïni № 647 vid 30.07.2010 r.
7. Perzeva, T.A. Osobennosti etiologicheskoy diagnostiki i lecheniya nozokomial'noy pnevmonii / Mistetstvo likuvannya // T.A. Perzeva, R.A. Bonzevich – 2003. – № 4. – S. 31-34.
8. Feschenko, Yu.I. Negospita'na pnevmoniya u doroslich osib: etiologiya, patogenez, klasifikaziya, diagnostika, antibiotikabakterial'na terapiya (Proekt klinichnich nastanov) / Yu.I. Feschenko, O.A. Golubov's'ka, K.A. Goncharov, O.Ya. Dzyublik // Ukraïns'kiy pul'monologichnyi zhurnal. - 2012. - №4. – S. 5-17.
9. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European society of pneumology task group on BAL // Eur. Resp. J.- 1990.- Vol.3- 937-934.
10. Heizmann, W. R. Infektionen bei schwerkranken Patienten [Text] / W.R. Heizmann, S. Kljucar, P. Heizmann. – Berlin: Vademecum Infektiologie 2003/2004. – 179 S.

Матеріал надійшов до редакції 22.11.2013

© Боднар В.А.
УДК 616.98-036.12-071

УДОСКОНАЛЕННЯ ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНИХ ФОРМ ІНФЕКЦІЇ, ЗУМОВЛЕНОЇ ВІРУСОМ ЕПШТЕЙНА-БАРР*

Боднар В.А.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

В статье проанализированы отдаленные последствия инфекционного мононуклеоза (ИМ) у взрослых и усовершенствована диагностика хронических форм Эпштейна-Барр вирусной (ЭБВ) инфекции. С этой целью обследовано 111 человек с различными формами ЭБВ-инфекции и 20 здоровых. Последствия ИМ оценивали по результатам динамического наблюдения за 48 реконвалесцентами. Показано, что ИМ у взрослых иммунокомпетентных пациентов, как правило, заканчивался выздоровлением – 83,3%, у 16,7% формировались хронические формы ЭБВ-инфекции. Хроническая ЭБВ-инфекция у взрослых характеризовалась при стертой форме типичными признаками ИМ без признаков генерализации процесса, напряженностью иммунных реакций (повышение содержания CD8+, ЦИК, IgM, ЛКБ и НСТ-теста на фоне снижения CD3+, CD16+, CD20+, ИРИ, IgA и IgG), при активной – манифестным течением, полиморфизмом проявлений с признаками генерализации процесса: субфебрилитет (94,3%), тонзиллофарингит (74,3%), генерализованная лимфаденопатия (88,6%), гепато- (88,6%) и спленомегалия (45,7%), выраженные астеновегетативный (100,0%), абдоминально-болевой, диспептический (57,1%) и артралгический (28,6%) синдромы, изменением лабораторных показателей (анемия – 25,7%, лейкопения – 48,5%, тромбоцитопения – 37,1%, лимфоцитоз – 68,5%, гипергаммаглобулинемия – 68,5%), органными поражениями (арахноэнцефалит – 42,8%, гепатит – 28,6%), выраженным иммунным дисбалансом с признаками угнетения клеточного и гуморального иммунитета (снижением субпопуляций лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, IgG и IgA, угнетением функциональной активности фагоцитоза, повышением содержания ЦИК). По результатам проведенного исследования с помощью дискриминантного анализа разработан двухэтапный скрининг для усовершенствования дифференциальной диагностики хронических форм ЭБВ-инфекции на догоспитальном и госпитальном этапах.

Ключевые слова: Эпштейна-Барр вирусная инфекция, инфекционный мононуклеоз, диагностические подходы.

Однією з найпоширеніших інфекцій у світі є інфекція, спричинена вірусом Епштейна-Барр (ЕБВ) [1, 5, 8, 10]. Відомо, що наслідки інфекційного мононуклеозу (ІМ), як найбільш вивченого варіанта перебігу гострої ЕБВ-інфекції, залежать від наявності і ступеня вираженості імунної дисфункції, генетичної схильності до тих чи інших ЕБВ-асоційованих захворювань, а також від впливу зовнішніх факторів, які негативно впливають на імунну систему [2, 10, 11]. Показано, що через 3-5 років після перенесеного ІМ можливі гематологічні та інші клінічні порушення різного ступеня вираженості [3, 7, 12].

В останні роки відзначається зростання захворюваності ІМ серед дорослих, що пояснюється погіршенням стану здоров'я населення в цілому [1, 2, 9]. Враховуючи поліморфізм клінічної картини як гострих, так і хронічних форм ЕБВ-інфекції, складність інтерпретації специфічних лабораторних тестів, на сьогодні існують деякі розбіжності в поглядах на пріоритетність різних методів діагностики для визначення стадії інфекційного процесу [1, 3, 4, 5, 7]. Таким чином, у зв'язку зі значним збільшенням кількості випадків ІМ серед дорослого населення і доведеним внеском хронічних форм у розвиток патології імунної системи, а, отже, і хронічних соматичних захворювань, удосконалення діагностики хронічних форм ЕБВ-інфекції є актуальним і необхідним, що й зумовило напрямок нашого дослідження.

Мета роботи – проаналізувати віддалені наслідки ІМ та вдосконалити діагностику хронічних форм ЕБВ-інфекції у дорослих.

Матеріал і методи дослідження

Всього обстежено 111 осіб з різними формами ЕБВ-інфекції та 20 здорових. Результати ІМ оцінювали за результатами динамічного спостереження за 48 реконвалесцентами у віці від 15 до 39 років (чоловіків – 26, жінок – 22). Всіх спостерігали протягом гострого періоду і обстежили через 3-5 років після виписки. ІМ діагностували згідно МКХ-10 (ВООЗ, 1998р.), в основу якої покладено етіологічний принцип, і підтверджували виявленням у сироватці крові антитіл класу IgM до VCA, IgM до EA при відсутності антитіл класу IgG EBNA ЕБВ методом імуноферментного аналізу (ІФА) і визначенням ДНК ЕБВ в крові в полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Хронічну ЕБВ-інфекцію діагностували згідно з класифікацією С.А.Крамарева і співавт. (2007), за якою виділяють латентну, субклінічної реактивації, хронічну стерту і хронічну активну форми [3]. Діагноз верифікували визначенням у сироватці крові серологічних профілів IgM VCA/IgG EA/IgG EBNA та виявленням ДНК ЕБВ в крові методом ПЛР. Латентну форму визначали за відсутності клініко-лабораторних ознак хронізації інфекції, ДНК ЕБВ у крові та наявності серологічного профілю (- / - / - / +); серологічну реактивацію – при відсутності клініко-лабораторних ознак хронізації процесу, ДНК ЕБВ у крові та наявності сероло-

* Цитування при атестації кадрів: Боднар В.А.. Удосконалення діагностики хронічних форм інфекції, зумовленої вірусом Епштейна-Барр // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 9 – 5.

гічних профілів реактивації (+ / + / +; + / - / +; - / + / +); хронічну стерту – за наявності періодичного субфебрилітету, астеновегетативного, лімфопроліферативного синдромів, міалгії, артралгії, клінічних ознак вторинного імунodefіціту з нашаруванням вторинних інфекцій, хронічну активну – при комбінації вищезазначених синдромів з ознаками органних уражень нервової системи та внутрішніх органів тривалістю більше 6 місяців з серологічними профілями (+ / + / +; + / - / +; - / + / +) і ДНК ЕБВ в крові. З хронічними формами ЕБВ-інфекції обстежено 63 пацієнта, з них 16 – зі стертою хронічною (чоловіків – 10, жінок – 6, у віці від 19 до 44 років), 27 – активною хронічною (чоловіків – 14, жінок – 13, у віці від 20 до 47 років), 20 – латентною (чоловіків – 9, жінок – 11, від 18 до 34 років). Обов'язковою умовою було виключення вірусних гепатитів, ВІЛ-інфекції та реплікативних форм інших герпесвірусних інфекцій: ВПГ 1/2, ВВЗ, ЦМВ, ВПГ 6 в динаміці.

Всім проведено комплексне загальноклінічне та лабораторне (в тому числі імунологічне) обстеження після отримання інформованої письмової згоди.

Статистична обробка отриманих результатів проводилася за стандартними методиками варіаційної статистики з урахуванням відмінностей за t-критерієм Стьюдента, непараметричних методів: критерію Манна-Уїтні, Уїлксона і дискримінантного аналізу. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Комплексне обстеження реконвалесцентів ІМ з урахуванням серологічних профілів і визначення ДНК ЕБВ в крові в динаміці показало, що переважна більшість обстежених ($n=40$; 83,3%) видужала, а у 8 (16,7%) за сукупністю клініко-лабораторних ознак і специфічних маркерів неможливо було виключити хронічну форму ЕБВ-інфекції: у 5 (10,41%) – стерту, у 3 (6,25%) – активну.

З метою пошуку діагностично значущих ознак хронічної ЕБВ-інфекції, враховуючи імуносупресивну дію вірусу, представилося доцільним комплексно охарактеризувати клініко-лабораторні показники хворих з різними формами ЕБВ-інфекції.

Проведені дослідження показали, що при латентній формі ЕБВ-інфекції, мали місце зміни соматичного статусу, що вимагають обстеження для виключення можливої хронічної форми ЕБВ-інфекції: у 18,2% – синдром вегетативної дисфункції, у 27,6% – лімфаденопатія за рахунок збільшення підщелепних лімфовузлів, яка поєднувалася з ознаками тонзиліту, з них у 13,6% – фарингіту. При аналізі показників крові, як загальноклінічних так і біохімічних, істотних змін не виявлялося. За показниками імунного статусу у більшості обстежених з латентною формою ЕБВ-інфекції імунні параметри також реєструвалися на рівні показників здорових, однак при індивідуальному аналізі у частини з них виявлялися зміни, що свідчили про напругу в системі протівірусного захисту. Так, різноспрямовані зміни показників CD4+ і CD8+ лімфоцитів зумовили підвищення імунорегуляторного індексу (IPI) CD4/CD8 у 60,0%, у 40,0% – його зниження в порівнянні з показниками контрольної групи, коефіцієнт співвідношення CD3/CD20 знаходився в межах величин контрольної групи здорових тільки у 20,0% обстежених, у решти – визначався вище (40,0%) або нижче (40,0%). Достовірних відмінностей за середніми показниками фагоцитарної активності нейтрофілів не ви-

являлося, однак при зіставленні індивідуальних показників активності НСТ-тесту реєструвалася зниженою у 70% обстежених, підвищеною – у 20%. Показники гуморального імунітету, як правило, визначалися на рівні контрольної групи, і лише в поодиноких випадках змінювалися різноспрямовано: вміст IgA, IgG і IgM в сироватці крові визначалися вище – у 30,0%, 20,0% і 20,0%, нижче – у 10,0%, 20,0% і 40,0% відповідно. Таким чином, дослідження імунного статусу осіб з латентною формою ЕБВ-інфекції продемонстрували зміни, які могли бути обумовлені наявністю супутньої патології. Можна також припустити, що при посиленні імунної супресії у цих пацієнтів є ризик реактивації ЕБВ.

Хронічна ЕБВ-інфекція в обстежених хворих перебігала у вигляді стертої або активної форми.

Хронічна стерта форма характеризувалася типовими синдромами ІМ без ознак генералізації процесу: субфебрилітет (25,9%), тонзилофарингіт (92,9%), лімфаденопатія (92,6%), гепато- та спленомегалія (37,0%), помірно виражений астеновегетативний синдром (40,7%); зміною лабораторних показників (лімфоцитоз – 51,8%, гіпергамаглобулінемія – 77,8%). За показниками імунного статусу хворі з хронічною стертою формою ЕБВ-інфекції відрізнялися від здорових і обстежених з латентною. Зміни імунологічних показників характеризувалися зниженням загальної кількості лейкоцитів, абсолютного числа лімфоцитів, CD3+, CD4+, CD16+, IPI, IgA і IgG, підвищенням – абсолютної та відносної кількості CD8+, IgM, ЦІК, показників НСТ-тесту і ЛКБ. Загалом зміни імунологічного статусу при стерті формі хронічної ЕБВ-інфекції свідчили про послаблення клітинної ланки імунітету і напругу в системі протівірусного захисту.

Хронічна активна форма характеризувалася маніфестним перебігом, поліморфізмом проявів з ознаками генералізації процесу: субфебрилітет (94,3%), тонзилофарингіт (74,3%), генералізована лімфаденопатія (51,6%), гепато- (88,6%) та спленомегалія (45,7%), виражені астеновегетативний (100,0%), абдомінально-больовий, диспептичний (57,1%) і артралгічний (28,6%) синдроми, зміною лабораторних показників (анемія – 25,7%, лейкопенія – 48,5%, тромбоцитопенія – 37,1%, лімфоцитоз – 68,5%, гіпергамаглобулінемія – 68,5%), органними ураженнями (арахноенцефаліт – 42,8%, гепатит – 28,6%). При аналізі імунних показників при активній формі хронічної ЕБВ-інфекції виявлені найбільш істотні зміни в порівнянні з групою контролю та пацієнтами з латентною і стертою формами: зниження абсолютного і відносного вмісту всіх субпопуляцій лімфоцитів, IPI, IgA, IgG, пригнічення фагоцитарної активності за показниками ЛКБ- і НСТ-тестів, зниження вмісту ЦІК в порівнянні зі стертою і підвищення – в порівнянні з латентною формою і контрольною групою, що свідчило про імуносупресію як клітинного так і гуморального ланок імунітету. В цілому проведені дослідження показали, що вивчення імунного статусу може використовуватися як додатковий диференційно-діагностичний критерій у діагностиці різних форм ЕБВ-інфекції.

Враховуючи неспецифічність і поліморфізм клінічних проявів, значну вартість специфічних серологічних, молекулярно-біологічних маркерів та імунологічних тестів, діагностика хронічних форм ЕБВ-інфекції представляє велику складність для лікаря практичної охорони здоров'я. Тому, важливим і економічно обґрунтованим є пошук сукупності клініко-лабораторних ознак, за якими можна діагностувати хронічні форми

ЕБВ-інфекції на догоспітальному та госпітальному етапах. З метою пошуку найбільш значущих діагностичних критеріїв нами був застосований дискримінантний аналіз, за даними якого розроблений двоетапний скринінг для удосконалення диференційної діагностики хронічних форм ЕБВ-інфекції. На догоспітальному етапі були зіставлені частоти загальноклінічних і біохімічних ознак, на госпітальному – враховували також специфічні маркери та імунні показники.

При зіставленні показників, що визначаються на догоспітальному етапі в групах хворих з активною формою в порівнянні зі стертою, найвищі дискримінантні відмінності мали: лихоманка ($F=52,37$; $p<0,000002$), астеничний синдром ($F=43,53$; $p<0,000001$), арахноенцефаліт ($F=18,82$; $p<0,000004$), гепатит ($F=10,66$; $p<0,000032$), моноцитоз ($F=9,05$; $p<0,000056$), синдром вегетативної дисфункції ($F=5,72$; $p<0,000056$), тромбоцитопенія ($F=4,28$; $p<0,001389$), генералізована лімфаденопатія ($F=4,1$; $p<0,000322$), міокардит ($F=4,12$; $p<0,008791$), тонзиллофарингіт ($F=4,12$; $p<0,005511$), лімфоцитоз ($F=4,12$; $p<0,008791$), лейкопенія ($F=4,11$; $p<0,000142$).

Тобто, за даними дискримінантного аналізу ці показники можуть бути критеріями диференційної діагностики між активною та стертою формами хронічної ЕБВ-інфекції на догоспітальному етапі.

На основі отриманих даних за допомогою множинного дискримінантного аналізу отримано систему рівнянь, яка за сукупністю ознак дозволяє діагностувати стерту та активну форму хронічної ЕБВ-інфекції:

$$C1 = 3,393 * A - 0,387 * B + 1,417 * C + 1,024 * D + 1,861 * E - 2,726 * G - 1,254 * I + 3,285 * K + 1,232 * L + 1,417 * M - 1,255 * N - 1,313 * O - 3,148;$$

$$C2 = 7,201 * A - 0,673 * B + 6,215 * C + 5,137 * D + 3,719 * E - 3,396 * G - 0,919 * I + 6,779 * K + 4,005 * L - 0,464 * M - 1,611 * N + 3,193 * O - 11,492;$$

де: А – астеничний синдром, В – синдром вегетативної дисфункції, С – арахноенцефаліт, D – лихоманка, Е – генералізована лімфаденопатія, G – міокардит, I – гепатит, K – фарингіт, L – лейкопенія, M – лімфоцитоз, N – моноцитоз, O – тромбоцитопенія.

У випадку наявності ознаки, до рівняння вноситься коефіцієнт 1, при відсутності – 0. При перевищенні C2 над C1 підтверджують наявність у пацієнта активної форми хронічної ЕБВ-інфекції, C1 над C2 – стертої.

На госпітальному етапі скринінг виконувався з урахуванням спеціальних методів обстеження: ІФА, ПЛР та імунологічного статусу. Проведені дослідження показали, що активна форма достовірно відрізнялася від стертою за такими специфічними показниками: ПЛР ($F=6,02$; $p<0,0001$), CD8,% ($F=10,45$; $p<0,003$), НСТ, СЦК ($F=6,77$; $p<0,016$), CD3,% ($F=5,66$; $p<0,025$), титру EBNA більше 100 у.о. ($F=5,43$; $p<0,029$).

За цими ознаками методом множинного дискримінантного аналізу отримано систему рівнянь, яка дозволяє віддиференціювати стерту та активну форму хронічної ЕБВ-інфекції:

$$K1 = -9,632 * A - 14,261 * B + 0,593 * C + 1,504 * D + 23,683 * E - 66,796;$$

$$K2 = -6,578 * A + 17,578 * B + 0,429 * C + 0,962 * D + 20,313 * E - 41,898;$$

де: А – підвищення титру EBNA більше 100 ум.од., В – наявність ДНК ЕБВ у крові методом ПЛР, С – CD3, %, D – CD8, %, E – НСТ, СЦК.

При перевищенні K2 над K1 констатують наявність у пацієнта активної форми хронічної ЕБВ-інфекції, K1 над K2 – стертої.

Використання системи двохетапного скринінгу, заснованого на комплексній оцінці клінічних, лабораторних та спеціальних методів, дозволяє поліпшити діагностику хронічних форм ЕБВ-інфекції диференційовано на догоспітальному та госпітальному етапах.

Висновки

1. За даними Полтавської обласної клінічної інфекційної лікарні наслідком ІМ у дорослих імунокомпетентних пацієнтів, як правило, було одужання – 83,3%, а у 16,7% формувалися хронічні форми ЕБВ-інфекції.

2. Хронічна ЕБВ-інфекція у дорослих характеризувалася при стертій формі типовими ознаками ІМ без ознак генералізації процесу: субфебрилітет (25,9%), тонзиллофарингіт (92,6%), лімфаденопатія (92,6%), гепато- і спленомегалія (37,0%), помірно виражений астеновегетативний синдром (40,7%) і зміною лабораторних показників (лімфоцитоз – 51,8%, гіпергамаглобулінемія – 77,8%), при активній – маніфестним перебігом, поліморфізмом проявів з ознаками генералізації процесу: субфебрилітет (94,3%), тонзиллофарингіт (74,3%), генералізована лімфаденопатія (88,6%), гепато- (88,6%) і спленомегалія (45,7%), виражені астеновегетативний (100,0%), абдомінально-больовий, диспептичний (57,1%) і артралгічний (28,6%) синдроми, зміною лабораторних показників (анемія – 25,7%, лейкопенія – 48,5%, тромбоцитопенія – 37,1%, лімфоцитоз – 68,5%, гіпергамаглобулінемія – 68,5%) і органами ураженнями (арахноенцефаліт – 42,8%, гепатит – 28,6%).

3. У хворих з хронічною ЕБВ-інфекцією мали місце зміни імунних показників, які характеризувалися: при стертій формі – напруженістю імунних реакцій (підвищення вмісту CD8+, ЦІК, ІgM, ЛКБ і НСТ-тесту на тлі зниження CD3+, CD16+, CD20+, ІPI, ІgA і ІgG), при активній – вираженим імунним дисбалансом з ознаками пригнічення клітинного та гуморального імунітету (зниженням субпопуляцій лімфоцитів CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, ІgG і ІgA, пригніченням функціональної активності фагоцитозу, підвищенням вмісту ЦІК).

4. Клініко-анамнестичні дані (наявність рецидивуючих запальних захворювань дихальних шляхів, астеновегетативний синдром, лихоманка, лімфаденопатія, гепато- і спленомегалія, органи ураження (насамперед арахноенцефаліт і гепатит неуточненої етіології), лабораторні ознаки (лейкопенія, тромбоцитопенія, атипові мононуклеари, лімфоцитоз, моноцитоз, гіпергамаглобулінемія) у сукупності або окремо є підставою для виключення хронічної форми ЕБВ-інфекції з застосуванням алгоритму верифікації діагнозу за системою дискримінантних рівнянь.

Література

1. Волоха А.П. Епштейна-Барр-вірусна інфекція у дітей / А.П.Волоха, Л.І.Чернишова // Сучасні інфекції. – 2003. – № 4. – С. 79-93.
2. Клінічний перебіг інфекційного мононуклеозу у дітей в сучасних умовах / А.М.Михайлова, Ю.П.Харченко, І.В.Юрченко [та ін.] // Тези XIV з'їзду мікробіологів, епідеміологів та паразитологів. – Полтава, 2005. – С. 14-15.
3. Крамарев С.О. Клінічні варіанти інфекції, спричиненої вірусом Епштейна-Барр, у дітей / С.О.Крамарев, О.В.Виговська // Медична газета «Здоров'я України» – 2007. – № 2. – С. 44-46.

4. Крамарев С.О. Эпштейна-Барр вирусная инфекция у детей / С.О.Крамарев, Н.Г.Литвиненко, Л.О.Палатная // Современная педиатрия. – 2004. – Т. 5, № 4. – С. 105-109.
5. Марков И.С. Диагностика и лечение герпетических инфекций и токсоплазмоза: сборник статей/ И.С.Марков. – К.: Издательство «АртЭк», 2002. – 192 с.
6. Пролонгированная иммуносупрессия и возможная хронизация инфекции у детей с инфекционным мононуклеозом / В.И.Иванова, О.В.Родионова, Г.Ф.Железникова [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2003. – № 4. – С. 50-54.
7. Хроническая активная инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр (обзор литературы и описание собственного наблюдения) / А.Е.Руднева, Е.В.Самочатова, Д.В.Литвинов [и др.] // Вопросы гематологии, онкологии и иммунологии в педиатрии. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 39-46.
8. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection/ J.I.Cohen //N. Engl. J. Med. – 2000; 343. – P. 481-492.
9. Godstall S.E. Infectious mononucleosis. Complexities of a common syndrome / S.E.Godstall, J.T.Kirchner // Postgrad. Med. – 2000. – Vol. 107, № 7. – P. 175-186.
10. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans/ K.Kawa // Inf. J. Hematol. – 2000. – № 71. – P. 108-117.
11. Maia D.M. Chronic, active Epstein-Barr virus infection / D.M.Maia, A.L.Peace-Brewer // Current opinion in hematology. – 2000. – № 7. – C. 59-63.
12. Prognostic Factors for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection / Hiroshi Kimura, Tsuneo Morishima, Hirokazu Kanegane [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 187. – P. 527-533.

English version: THE IMPROVEMENT OF DIAGNOSIS OF CHRONIC EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION*

Bodnar V.A.

HSEE "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Ukraine

The long-term outcomes of infectious mononucleosis (IM) in adults is analyzed and diagnostic approaches to chronic Epstein-Barr virus (EBV) infection is improved in the article. For this purpose, 111 persons were examined with various forms of EBV-infection and 20 healthy for control. Outcomes of IM were assessed by dynamic observation of 48 convalescents. 83.3% adult immunocompetent patients of IM had recovery, and chronic forms of EBV-infection was formed in 16,7% patients. Chronic subclinical EBV-infection in adults are characterized by subclinical forms with typical signs of IM without signs of generalization process, the intensity of immune responses (increased content of CD3+, CIC, IgM, LKB and NBT test against decrease in CD3+, CD16+, CD20+, IRI, IgA and IgG), in active EBV-infection – manifest course, polymorphism with evidence of generalization of process: subfebrility (94,3%), tonsillopharyngitis (74,3%), generalized lymphadenopathy (88,6%), hepato- (88,6%) and splenomegaly (45,7%) expressed asthenovegetative (100,0%), dyspeptic (57,1%) and arthropathic (28,6%) syndromes, changes in laboratory parameters (anemia – 25,7%, leukopenia – 48,5%, thrombocytopenia – 37,1%, lymphocytosis – 68,5%, hypergammaglobulinemia – 68,5%) and organ damage (encephalitis – 42,8%, hepatitis – 28,6%), pronounced imbalance of immune suppression characteristics of cellular and humoral immunity (lymphocyte subpopulations decrease in CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, IgG and IgA, inhibition of the functional activity of phagocytosis, increased CIC). According to the results of the study and discriminant analysis, a two-stage screening to improve the differential diagnosis of chronic forms of EBV-infection in the prehospital and hospital stages is developed.

Keywords: Epstein-Barr virus infection, infectious mononucleosis, diagnostic approaches.

Introduction

One of the most common infections in the world is an infection caused by the Epstein-Barr virus (EBV) [1, 5, 8, 10]. It is known that the outcomes of infectious mononucleosis (IM) (the most studied variants of acute EBV infection) depend on the presence and severity of immune dysfunction, genetic predisposition to certain EBV-associated diseases, as well as external factors that affect the immune system [2, 10, 11]. It is shown that in 3-5 years after IM hematological and other clinical dysfunction of varying degrees of severity can occur [3, 7, 12].

In recent years, the increase in the incidence of IM among adults, because of the deteriorating health of the general population [1, 2, 9]. Due to polymorphism of the clinical signs both acute and chronic forms of EBV-infection, difficulty interpreting specific laboratory tests, at present there are some differences of opinion on the priority of different diagnostic methods to determine the stage of infection [1, 3, 4, 5, 7]. Thus, due to the significant increase in the incidence of IM among adults

and proven contribution to the development of chronic pathology of the immune system, and, consequently, chronic somatic diseases, improving diagnosis of chronic EBV-infection is relevant and necessary as determined the direction of our research.

The research purpose is to analyze of long-term outcomes of IM and improve the diagnosis of chronic EBV-infection in adults.

Material and methods

Total 111 patients with various forms of EBV-infection and 20 healthy were examined. Outcomes of IM were assessed by dynamic observation of 48 convalescents, aged 15 to 39 years (men – 26, women – 22). All patients were observed during the acute period and examined 3-5 years after discharge. IM was diagnosed according to ICD-10 (WHO, 1998) and confirmed the detection of serum IgM to VCA, IgM to EA in the absence of IgG antibodies EBNA EBV by enzyme immunoassay (EIA) and the definition EBV DNA levels in the polymerase chain reaction (PCR).

* To cite this English version: Bodnar V.A. The improvement of diagnosis of chronic epstein-barr virus infection // Problemy ekologiya medytyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 12 -15.

Chronic EBV-infection was diagnosed according to the classification by S.A.Kramarev et al. (2007): latent, subclinical reactivation, chronic subclinical and chronic active forms [3]. The diagnosis is verified defined serum IgM serologic profiles VCA / IgG EA / IgG EBNA and EBV DNA detection in blood by PCR. Latent form was determined in the absence of clinical and laboratory signs of chronic infection, EBV DNA in the blood and the presence of serological profile (- / - / +) serological reactivation – in the absence of clinical and laboratory signs of chronic process, EBV DNA in the blood and the presence of serological reactivation profiles (+ / + / +, + / - / + - / + / +); chronic subclinical – if periodic subfebrility, asthenovegetative, lymphoproliferative syndromes, myalgia, arthralgia, clinical signs of secondary immunodeficiency stratification of infections, chronic active – with a combination of the above syndromes with signs of organ lesions of the nervous system and internal organs are longer than 6 months, the serological profiles (+ / + / +, + / - / + - / + / +) and EBV DNA in blood. 63 patients with chronic forms of EBV-infection were examined, 16 of them – with subclinical chronic (men – 10, women – 6, aged 19 to 44 years), 27 – chronic active (men – 14, women – 13, at the age of 20 to 47 years), 20 – latent (men – 9 women – 11, from 18 to 34 years). Patients did not have viral hepatitis, HIV and other forms of replicative herpesvirus infections: HSV 1/2, VVZ, CMV, HSV 6.

All patients received a complete comprehensive general clinical and laboratory (including immunological) examination after obtaining informed written consent.

Statistical analysis of the results was carried out by standard methods of variation statistics: the t-Student's test, nonparametric methods: Mann-Whitney's Wilkson's and discriminant analysis. The difference was considered reliable at $p < 0.05$.

Results and discussion

A comprehensive survey of convalescents of IM based on serological profiles and EBV DNA detection in blood showed that the vast majority of the patients ($n=40$, 83,3%) had recovery, and in 8 (16,7%) for the totality of the clinical and laboratory features and specific markers could not exclude chronic EBV-infection: in 5 (10,41%) – subclinical in 3 (6,25%) – active.

In order to find important diagnostic signs of chronic EBV-infection, given the immunosuppressive effect virus, it is appropriate to characterize the complex clinical and laboratory parameters of patients with different forms of EBV-infection.

Studies have shown that a latent form of EBV-infection has changes in physical status requiring examination to exclude the possible forms of chronic EBV-infection: in 18,2% – a syndrome of autonomic dysfunction, in 27,6% – lymphadenopathy due to increased submandibular lymph nodes, which was combined with signs of tonsillitis, of which 13,6% – pharyngitis. In the analysis of blood parameters as general clinical and biochemical, significant changes were detected. In the immune status of the majority of the patients with latent form of EBV-infection immune parameters were recorded as level indicators of healthy, but the individual analysis of some of them turned out to change that showed the system voltage antiviral defense. Thus, multidirectional changes in CD4+ and CD8+ lymphocytes resulted in increasing the immunoregulatory index (IRI) SD4/CD8 in 60,0%, in 40,0% it decline as compared with the control group, the ratio of CD3/CD20

was within reference values healthy group only 20,0 % of the patients, in the others – determined above (40,0%) or below (40,0%). No significant differences in the average performance of the phagocytic activity of neutrophils is not found, however, when comparing the performance of individual activity, NBT-test was reduced in 70% of the patients, higher – 20%. Humoral immunity is usually determined at the level of the control group, and only in rare cases varied in different directions: the content of IgA, IgG and IgM in serum were above – in 30,0%, 20,0% and 20,0%, below – in 10,0%, 20,0% and 40,0%, respectively. Thus, the study of the immune status of persons with latent form of EBV-infection showed changes that could be due to the presence of comorbidities. We can also assume that in these patients is the risk of EBV reactivation in the amplification of immune suppression.

Chronic EBV-infection in patients had subclinical or active form.

Chronic subclinical form characterized of typical syndromes of IM without evidence of generalization process: subfebrility (25,9%), tonsillopharyngitis (92,9%), lymphadenopathy (92,6%), hepato-, splenomegaly and (37,0%), moderate asthenovegetative syndrome (40,7%), the change in laboratory parameters (lymphocytosis – 51,8% hypergammaglobulinemia – 77,8%). The immune status of patients with chronic subclinical forms of EBV-infection differed from the healthy and the patients with latent. Changes of immunological parameters were characterized by a decrease in the total number of white blood cells, the absolute number of lymphocytes, CD3+, CD4+, SD16+, IRI, IgA and IgG, increase – the absolute and relative number of CD8+, IgM, CIC, indicators NBT-test and LKB. In general, changes in immune status in patients with subclinical form of chronic EBV-infection showed a weakening of cellular immunity and system voltage antiviral defense.

Chronic active form characterized of manifest course, polymorphism with evidence of generalization of process: subfebrility (94,3%), tonsillopharyngitis (74,3%), generalized lymphadenopathy (51,6%), hepato- (88,6%) and splenomegaly (45,7%), expressed asthenovegetative (100,0%), dyspeptic (57,1%) and arthropathic (28,6%) syndromes, changes in laboratory parameters (anemia – 25,7%, leukopenia – 48,5%, thrombocytopenia – 37,1%, lymphocytosis – 68,5%, hypergammaglobulinemia – 68,5%), organ damage (encephalitis – 42,8%, hepatitis – 28,6%). In the analysis of immune parameters in the active form of chronic EBV-infection there were the most significant changes in comparison with the control group and patients with latent and subclinical forms: lower absolute and relative content of all subpopulations of lymphocytes, IRI, IgA, IgG, inhibition of phagocytic activity on indicators LKB- and NBT-tests, reduction of CIC compared to subclinical forms and increase – compared to the latent form and the control group, indicating immunosuppression of both cellular and humoral immunity. In general, studies have shown that the immune status can be used as an additional diagnostic criterion for differential diagnosis of various forms of EBV-infection.

Given nonspecific and polymorphism of clinical manifestations, a significant value of specific serological, molecular markers and immunological tests, diagnosis of chronic EBV-infection is a big challenge for physician practice health care. Therefore, an important and feasible is finding a set of clinical and laboratory signs, which can

diagnose chronic forms of EBV- infection in the prehospital and hospital phases. In order to find the most important diagnostic criteria for us was used discriminant analysis, according to which the two-stage screening is designed to improve the differential diagnosis of chronic EBV-infection. In the prehospital phase the frequency of general clinical and biochemical signs were compared, in the hospital – specific markers and immune parameters.

When comparing the indicators defined in the prehospital phase in patients with active compared to the subclinical form, the highest discriminant features were: fever ($F=52,37$; $p<0.000002$), asthenic syndrome ($F=43,53$; $p<0.000001$) encephalitis ($F=18,82$; $p<0.000004$), hepatitis ($F=10,66$; $p<0.000032$), monocytosis ($F=9,05$; $p<0.000056$), vegetative dysfunction syndrome ($F=5,72$; $p<0.000056$), thrombocytopenia ($F=4,28$; $p<0.001389$), generalized lymphadenopathy ($F=4,1$; $p<0.000322$), myocarditis ($F=4,12$; $p<0.008791$) tonsillopharyngitis ($F=4,12$; $p<0.005511$), lymphocytosis ($F=4,12$; $p<0.008791$), leukopenia ($F=4,11$; $p<0.000142$).

Thus, according to discriminant analysis, these signs may be the basis for the differential diagnosis between active and subclinical forms of chronic EBV-infection in the hospital phase.

Based on the data using multiple discriminant analysis we have a system of equations that can diagnose subclinical and the active form of chronic EBV-infection:

$$C1 = 3,393 * A - 0,387 * B + 1,417 * C + 1,024 * D + 1,861 * E - 2,726 * G - 1,254 * I + 3,285 * K + 1,232 * L + 1,417 * M - 1,255 * N - 1,313 * O - 3,148;$$

$$C2 = 7,201 * A - 0,673 * B + 6,215 * C + 5,137 * D + 3,719 * E - 3,396 * G - 0,919 * I + 6,779 * K + 4,005 * L - 0,464 * M - 1,611 * N + 3,193 * O - 11,492;$$

where: A – asthenic syndrome, B – vegetative dysfunction syndrome, C – encephalitis, D – fever, E – generalized lymphadenopathy, G – myocarditis, I – hepatitis, K – pharyngitis, L – leukopenia, M – lymphocytosis, N – monocytosis, O – thrombocytopenia.

If this feature is available, a factor "1" is entered into the equation, in the absence – "0". In excess of C1 over C2 confirms that patient has active form of EBV-infection, C1 over C2 – subclinical.

At the hospital stage screening was performed on the basis of special examination methods: ELISA, PCR and immunological status. Studies have shown that the active form was significantly different from subclinical by the following specific criteria: PCR ($F=6,02$; $p<0.0001$), CD8,% ($F=10,45$; $p<0.003$), NBT ($F=6,77$; $p<0,016$), CD3,% ($F=5,66$; $p<0.025$), EBNA titer over 100 ($F=5,43$; $p<0.029$).

On these grounds by method of multiple discriminant analysis of the system of equations we can differentiate subclinical and the active form of chronic EBV-infection:

$$K1 = -9,632 * A - 14,261 * B + 0,593 * C + 1,504 * D + 23,683 * E - 66,796;$$

$$K2 = -6,578 * A + 17,578 * B + 0,429 * C + 0,962 * D + 20,313 * E - 41,898;$$

where: A – titre EBNA over 100, B – the presence of EBV DNA in blood by PCR, C – CD3,%, D – CD8,%, E – NBT.

In excess of K2 over K1 patient has the active form of chronic EBV-infection, K1 over K2 – subclinical.

Using a two-stage screening system based on a combined assessment of clinical, laboratory, and special techniques we can improve the diagnosis of chronic

EBV-infection differentially in the prehospital and hospital phases.

Conclusions

1. According to the Poltava Regional Clinical Infectious Hospital 83.3% adult immunocompetent patients of IM had recovery, and chronic forms of EBV-infection were formed in 16,7 % patients.

2. Chronic subclinical EBV-infection in adults characterized by subclinical forms with typical signs of IM without signs of generalization process: subfebrility (25,9%), tonsillopharyngitis (92,6%), lymphadenopathy (92,6%), hepato- and splenomegaly (37,0%), moderate asthenovegetative syndrome (40,7%) and changes in laboratory parameters (lymphocytosis – 51,8%, hypergammaglobulinemia – 77,8%), active EBV-infection – manifest course, polymorphism with evidence of generalization of process: subfebrility (94,3%), tonsillopharyngitis (74,3%), generalized lymphadenopathy (88,6%), hepato- (88,6%) and splenomegaly (45,7%) expressed asthenovegetative (100,0%), abdominal pain, dyspeptic (57,1%) and arthropathic (28,6%) syndromes, changes in laboratory parameters (anemia – 25,7 %, leukopenia – 48,5%, thrombocytopenia – 37,1%, lymphocytosis – 68,5% hypergammaglobulinemia – 68,5%) and organ damage (encephalitis – 42,8%, hepatitis – 28,6 %).

3. Patients with chronic EBV-infection have changes of immune parameters, which were characterized: in subclinical forms – the intensity of immune responses (increased content of CD8+, CIC, IgM, LKB- and NBT-test against decrease in CD3+, CD16+, CD20+, IRI, IgA and IgG), in active forms – pronounced imbalance of immune suppression characteristics of cellular and humoral immunity (lymphocyte subpopulations decrease in CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, IgG and IgA, inhibition of the functional activity of phagocytosis, increased CIC).

4. Clinical and medical history (presence of recurrent inflammatory diseases of the airways, asthenovegetative syndrome, fever, lymphadenopathy, hepato- and splenomegaly, organ damage (primarily encephalitis, hepatitis unspecified etiology), laboratory findings (leukopenia, thrombocytopenia, atypical mononuclear cells, lymphocytosis, monocytosis, hypergammaglobulinemia) in combination or alone constitute grounds for exception chronic form of EBV-infection using an algorithm for diagnosis verification by the system of discriminant equations.

References

1. Volocha A.P. Epshteyna-Barr-virusna infekziya u ditey /A.P.Volocha, L.I.Chernishova // Suchasni infekzii. – 2003. – № 4. – S. 79-93.
2. Klinichniy perebig infekziynogo mononukleozu u ditey v suchasnich umovach / A.M.Michaylova, Yu.P.Charchenko, I.V.Yurchenko [ta in.] // Tezi ChIV z'izdu mikrobiologiv, epidemiologiv ta parazitologiv. – Poltava, 2005. – S. 14-15.
3. Kramarev S.O. Klinichni varianti infekzii, sprichinenoї virusom Epshteyna-Barr, u ditey / C.O.Kramarev, O.V.Vigovs'ka // Medichna gazeta «Zdorov'ya Ukraїni» – 2007. – № 2. – S. 44-46.
4. Kramarev S.O. Epshteyna-Barr virusnaya infekziya u detey / C.O.Kramarev, N.G.Litvinenko, L.O.Palatnaya // Sovremennaya pediatriya. – 2004. – T. 5, № 4. – S. 105-109.
5. Markov I.S. Diagnostika i lechenie gerpeticheskikh infekziy i toksoplazmoza: sbornik statey/ I.S.Markov. – K.: Izdatel'stvo «ArtEk», 2002. – 192 s.

6. Prolongirovannaya immunosupressiya i vozmozhnaya chronizaziya infekzii u detey s infekzionnym mononukleozom / V.I.Ivanova, O.V.Rodionova, G.F.Zheleznikova [i dr.] // Rossiyskiy vestnik perina-tologii i pediatrii. – 2003. – № 4. – S. 50-54.
7. Chronicheskaya aktivnaya infekziya, vyzvannaya virusom Epshteyna-Barr (obzor literatury i opisanie sobstvennogo nablyudeniya) / A.E.Rudneva, E.V.Samochatova, D.V.Litvinov [i dr.] // Voprosy gematologii, onkologii i immunologii v pediatrii. – 2007. – T. 6, № 4. – S. 39-46.
8. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection/ J.I.Cohen //N. Engl. J. Med. – 2000; 343. – P. 481-492.
9. Godstall S.E. Infectious mononucleosis. Complexities of a common syndrome / S.E.Godstall, J.T.Kirchner // Postgrad. Med. – 2000. – Vol. 107, № 7. – P. 175-186.
1. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans/ K.Kawa // Inf. J. Hematol. – 2000. – № 71. – P. 108-117.
2. Maia D.M. Chronic, active Epstein-Barr virus infection / D.M.Maia, A.L.Peace-Brewer // Current opinion in hematology. – 2000. – № 7. – C. 59-63.
3. Prognostic Factors for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection / Hiroshi Kimura, Tsuneo Morishima, Hirokazu Kanegane [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 187. – P. 527–533.

Матеріал надійшов до редакції 3.12.2013

© Сакевич В. Д.

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/5

РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ ГАПЛОТИПІВ ПОЛІМОРФНИХ ГЕНІВ TLR 2, TLR 4, CLC-10 ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З ОКРЕМИМИ ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ У ХВОРИХ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ*

Сакевич В. Д.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

С целью определения роли полиморфизма отдельных генов, которые контролируют структурные и регуляторные элементы неспецифической резистентности организма, в развитии аллергического ринита определена распространенность полиморфизма 2258G / A гена TLR2 (rs5743708), гена TLR 4 (rs4986790) и гена CLC-10 (rs420297) в группе наблюдения и в группе популяционного контроля, проведен анализ иммунологических показателей и клинических проявлений у больных с полиморфными вариантами исследуемых генов. Для выяснения возможного сочетания различных генотипов всех генов, которые определяются проведен анализ гаплотипов. При сравнении частот гаплотипов определенных полиморфизмов генов TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297) в группах больных АР и популяционного контроля не выявлено достоверной зависимости между наличием в генотипе аллеля Т гена галектину -10, аллеля А гена TLR 2 или аллеля G гена TLR 4 и развитием АР. При изучении распространенности возможного сочетания генотипов генов TLR 4 (Asp299Gly) и CLC10 (rs420297) обнаружено, что чаще встречается гаплотип AACC, как в группе контроля (30%), так и у больных АР (24%), в группах больных АР и популяционного контроля не выявлено достоверной зависимости между наличием в генотипе аллеля Т гена галектину -10 и аллеля G гена TLR 4 с развитием АР. У больных АР носителей гаплотипов TLR4 / CLC 10 содержащие полиморфные аллели G и T выявлен достоверно более высокий уровень экспрессии молекул CD4 CD25 Foxp3 Трег клеток (критерий Манна-Уитни U (n = 4; n = 41) = 25,50; p = 0,024), составивший $6,29 \pm 0,50$ % (тыс / мкл) со снижением содержания IL-10 и повышением IL-4 ($55,9 \pm 11,33$ пг / мл). Полученные результаты позволяют рассматривать ОНП генов TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297), как дополнительный прогностический показатель при патогенетических исследованиях.

Ключові слова: поліморфізм, Toll-подібні рецептори, галектин-10, алергічний риніт.

Вступ

На сьогодні існує тенденція до стрімкого поширення алергічних захворювань у світі, що становить серйозну проблему в зв'язку з широким розповсюдженням, щорічним повсюдним зростанням захворюваності, частими ускладненнями, а також різким зниженням працездатності та якості життя пацієнтів.

Алергічний риніт (АР) розглядають як важливу проблему алергології, оскільки це захворювання в більшості випадків є першим клінічним проявом atopії з подальшою трансформацією в бронхіальну астму (БА) [4].

Вивчення генетичних основ atopії є актуальною проблемою сьогодення, необхідною для встановлення взаємозв'язку між спадковими та середовищними факторами в реалізації досить складного патологічного фенотипу та розумінню механізмів взаємодії полігенних систем в процесі реалізації спадкової інформації на рівні цілісного організму. Знаючи молекулярні та клітинні механізми формування захворювань, можливо намітити гени, білкові продукти яких є найбільш значущими. Згідно досліджень, гени atopії та пов'язаних з нею станів сконцентровано в основному у 10 ділянках геному людини.

За даними досліджень існують відомості щодо асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену TIM-1 [9], CD14 [5], TLR 2-4 [6], RNA se 3 [7].

Специфічність системи вродженого імунітету реалізується через родину Toll-подібних рецепторів (TLRs). Важливими структурно-молекулярними елементами системи патерн - розпізнавальних рецепторів (ППР) є Toll-подібний рецептор 2 (TLR 2) та Toll-подібний рецептор 4 (TLR4). Гени, що кодують TLR2 та TLR4, виявляють високу варіабельність у популяції [1]. Останнім часом з'являються відомості, щодо виявлення функціонального поліморфізму генів TLR, зумовленого заміною одиничних нуклеотидів (від англ. Single nucleotide polymorphism – SNP). В результаті таких замін знижується здатність до розпізнання відповідних лігандів та ефективність проведення сигнальних імпульсів, що призводить до порушення активності клітин імунної системи. Функціональний поліморфізм TLR 2-4 порушує регуляцію вродженої імунної відповіді, що є основним чинником дисбалансу T1/T2-хелперів. Подібний механізм може відігравати вирішальну роль у формуванні хронічного запального процесу та привертає увагу, як потенційний чинник ризику розвитку atopічної патології, зокрема АР [6].

В дослідженнях закордонних учених вивчається асоціація алергічного риніту із поліморфізмом гену галектину-10 (CLC-10) [3]. Галектин-10 є представником родини ендогенних лектинів (відомий, як лізофосфоліпаза, білок Шарко - Лейдена), виявлений в еозинофілах та базофілах. Точні дослідження довели

* Цитування при атестації кадрів: Сакевич В. Д. Розповсюдженість гаплотипів поліморфних генів TLR 2, TLR 4, CLC-10 та їх зв'язок з окремими імунологічними показниками у хворих на алергічний риніт // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 16 – 20.

значну внутріклітинну експресію галектину-10 в CD25+ T_{reg} клітинах. В зв'язку з цим, він безпосередньо не приймає участі в пригніченні функції CD25+ T_{reg} клітин, однак специфічна блокада галектину-10 відновлює проліферативну здатність CD25+ T_{reg} клітин та підсилює їх супресивні функції. Отже галектин-10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин [8].

З метою визначення ролі поліморфізму окремих генів, які контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності організму, в розвитку алергічного риніту визначена розповсюдженість поліморфізму 2258G/A гену TLR2 (rs5743708), гену TLR 4 (rs4986790) та гену CLC-10 (rs420297) в групі спостереження і в групі популяційного контролю, проведено аналіз імунологічних показників та клінічних проявів у хворих з поліморфними варіантами досліджуваних генів. Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів.

Матеріали та методи дослідження

Для вирішення висунутих завдань проведено обстеження 45 хворих на АР віком від 19 до 65 років (35,6 ± 1,57) (чоловіки склали 51% (23 хворих), а жінки – 49 % (22 хворих)). На момент обстеження хворі знаходились в стадії клінічної ремісії та припиняли прийом протиалергічних препаратів за 72 години, хворі не мали важкої супутньої патології.

Діагноз АР встановлювали на основі критеріїв діагностики ARIA (2008) за алгоритмом діагностики прийнятим в Україні та затвердженням МОЗ України. Якість життя хворих визначали за допомогою загальноновизнаних опитувальників (Adult Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire).

Сенсибілізацію до алергенів діагностували на підставі комплексу алергологічних методів обстеження: збір алергологічного анамнезу, позитивних шкірних скарифікаційних тестів на алергени з використанням стандартних наборів (ТОВ «Імунолог», Україна).

За стандартною методикою проведено визначення числа лейкоцитів в крові та підрахунок формених елементів крові в мазках. Фенотип лімфоцитів аналізували у венозній крові, використовуючи моноклональні антитіла до CD4, CD25 (виробництво «Сорбент», Росія) та внутрішньоклітинного білку Foxp3 («Biosciences», США) методом проточної цитофлюориметрії за допомогою проточного цитофлюориметра EPIC LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II TM software.

Рівні загального IgE, інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) визначали за допомогою тест-систем ІФА (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна) з використанням імуноферментного аналізатора "Stat - Fax 2100" (США).

Для визначення поліморфізму rs420297 гену CLC-10 проводили виділення геномної ДНК з периферичної крові обстежуваних за допомогою набору «ДНК-експрес-кровь» (ООО НПФ «Литех», Росія). Визначення поліморфізму генів TLR2 (rs5743708) та TLR 4 (rs4986790) проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [1].

Тип алелей (CAT) гену CLC-10 ампліфікували за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції в 35 мкл реакційної суміші, що містила: 2,5 мкл 10 x Buf для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag з

додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів: CLC_{up} 5'-CCC AGC AAC CAT GCT TCT TGT TAC-3'; CLC_{low} 5'-TGA GCA AAC CCA CCT-3' та по 5 пкмоль специфічних зондів мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і BHQ-1, BHQ-2 з 3'-кінця, відповідно:

CLC_{wt} (FAM)CG-CTG-GAG-GAA-CAG-GAA-AA(BHQ-1);

CLC_m (R6G)CG-CTG-GAG-GAA-CAA-GAA-AAA(BHQ-2)

До суміші додавали 20-50 нг геномної ДНК обстежуваних. Ампліфікацію гену галектину-10 проводили на ампліфікаторі детектуючому ДТ-322 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в режимі реального часу, наступним чином:

– перший цикл - 95°C/3 хвилини;

– 40 циклів - 95°C/15 секунд;

63°C/40 секунд

Продукти ампліфікації гену CLC-10 ідентифікували за допомогою флуоресцентної реєстрації накопичення ДНК за каналами флуоресценції: для «дикої» алелі (wt): 1 канал – барвник FAM, для мутантної алелі (m): 2 – канал барвник R6G, безпосередньо в ході реакції.

Групу контролю становили 95 практично здорових осіб з бази генетичних зразків НДІ Генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «УМКА». В групу контролю для вивчення поліморфізму гену CLC-10 відібрано 45 зразків ДНК осіб, що не страждали на алергічну патологію. Дослідження проводили відповідно наданої письмової згоди на проведення обстеження та заключення комісії з етичних питань та біоетики Української медичної стоматологічної академії.

Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2 . Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

При вивченні сімейного алергологічного анамнезу у хворих на АР виявлені різноманітні прояви алергії в сім'ї у 76%. Наявність алергічних захворювань у родичів I-II ступеню спорідненості з боку матері виявлена в 35%, з боку батька – у 30%, з боку обох батьків - у 11% усіх обстежених хворих на АР. Не виявлено даних про обтяжений алергологічний анамнез у 24% хворих на АР. Отримані результати узгоджуються з даними, що свідчать про переважний зв'язок з atopічними захворюваннями з боку матері [2].

Як вище зазначалося, у результаті спостереження за перебігом захворювання в динаміці у хворих на АР було встановлено ступені тяжкості АР: легкий перебіг – у 11 (25%), середньо-важкий – у 32 (71%), важкий – у 2 (4%). Також виявлена наявність спадкової алергічної схильності у родичів I-II ступеня спорідненості з боку матері виявлена в 35%, з боку батька – у 30%, з боку обох батьків - у 11% усіх обстежених хворих на АР. У 44% перебіг АР був пов'язаний з різними нозологічними формами алергічної патології. У 20% обстежених хворих на АР був установлений супутній діагноз БА, у 15% присутня симптоматика АД, повна

тріада atopії виявлена у 11% обстежених нами хворих на АР. При алергологічному обстеженні хворих на АР у 89% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилкові, грибкові, побутові, епідермальні та харчові алергени. При чому, у 7% мала місце сенсibiliзація до однієї групи алергену, у 29% - до двох груп, у 36% - до трьох груп, у 13% - до чотирьох груп, а в 4% - до

всіх п'яти груп алергенів. У 11% хворих шкірні проби були негативними до всіх використаних алергенів.

Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів. Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип GGAACC, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (23%) (табл.1).

Таблиця 1.
Розподіл частот гаплотипів поліморфізму TLR 2, TLR 4 та гену галектину-10 серед осіб полтавської популяції та хворих на алергічний риніт, %(n)

CLC10	GA CC	GA CC	GA CC	GA CT	GA CT	GA CT	GA TT	GA TT	GA TT	GA AG CC	GA AG CC	GA AG CC	GA AG CT	GA AG CT	GA AG CT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT
TLR 4	GA CC	GA CC	GA CC	GA CT	GA CT	GA CT	GA TT	GA TT	GA TT	GA AG CC	GA AG CC	GA AG CC	GA AG CT	GA AG CT	GA AG CT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT
TLR 2	GA CC	GA CC	GA CC	GA CT	GA CT	GA CT	GA TT	GA TT	GA TT	GA AG CC	GA AG CC	GA AG CC	GA AG CT	GA AG CT	GA AG CT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT	GA AG TT
Група контролю (n=45)	66,7 (30)	4,4 (2)	0	17,8 (8)	2,2 (1)	0	2,2 (1)	0	0	4,4 (2)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Хворі на АР (n=45)	51,1 (23)	2,2 (1)	0	20,0 (9)	0	0	11,1 (5)	4,4 (2)	0	4,4 (2)	0	0	4,4 (2)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CLC10	$\chi^2 = 2,45$; ВШ = 2,26 (0,92-5,56); p = 0,118																											
TLR 4 896A/G	$\chi^2 = 0,49$; ВШ = 2,15 (0,50-9,21); p = 0,482																											
TLR 2 2258G/A	$\chi^2 = 0,18$; ВШ = 1,00 (0,19-5,24); p = 0,673																											

При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10, алеля А гену TLR 2 або алеля G гену TLR 4 та розвитком АР.

Однак при вивченні сімейного алергологічного анамнезу у даної групи хворих на АР виявлені різноманітні прояви алергії в сім'ї у 100%. У результаті спостереження за перебігом захворювання в динаміці у хворих було встановлено ступені тяжкості АР (середньо-тяжкий – у 89%, легкий перебіг – у 11%) та визначені клінічні форми АР (цілорічний (або персистуючий) – 100%). При алергологічному у 100% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилкові, грибкові, побутові, епідермальні та харчові алергени.

Аналіз клінічного перебігу захворювання у даних хворих показав наявність супутньої патології: часті ГРВІ, що відзначались тривалим перебігом та ускладненнями з боку бронхо-легеневої системи (бронхіти, пневмонії) – у 83%; полипозний риносинусит – 67%; гастродуоденіти – 50%.

При аналізі імунологічних показників серед носіїв гаплотипів виявлена різниця на рівні статистичної тенденції (p ≤ 0,06) за показником CD4⁺/25⁺/Foxp3⁺ у носіїв гаплотипів з мутантним алелем.

Для кращого вивчення та розуміння генетичної схильності до виникнення АР обґрунтованим є вивчення поширеності можливого поєднання генотипів генів TLR 4 та CLC10 (табл.2).

Таблиця 2.
Розподіл частот гаплотипів поліморфізму TLR 4 та гену галектину-10 серед осіб полтавської популяції та хворих на алергічний риніт, %(n)

CLC 10 TLR4	AA CC	AA CT	AA TT	AG CC	AG CT	AG TT	GG CC	GG CT	GG TT
Група контролю (n=45)	66,7 (30)	17,8 (8)	2,2 (1)	4,4 (2)	2,2 (1)	0	0	0	0
Хворі на АР (n=45)	53,3 (24)	20 (9)	13,3 (6)	4,4 (2)	4,4 (2)	4,4 (2)	0	0	0
(CLC10) (TLR 4)	$\chi^2 = 0,26$; ВШ = 3,14 (0,31-31,42); p = 0,609								

Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип AACC, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (24%). При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10 та алеля G гену TLR 4 з розвитком АР.

Для більш детальної оцінки стану клітинного та гуморального імунітету у хворих на АР залежно від гаплотипів поліморфізмів TLR4 та CLC-10 були оцінені показники імунограм хворих на АР з гаплотипом TLR4/CLC 10 (табл.3) в порівнянні з показниками обстежених хворих на АР, що не є носіями зазначених гаплотипів.

Як зазначалося раніше, порушення рівноваги T1/T2-хелперів з переважанням Т-2 імунної відповіді відіграє провідну роль в розвитку АР. У відповідь на вплив алергенів у хворих на АР відбувається вивільнення Т2-цитокінів та індукується активація еозинофілів, опасистих клітин та підвищений синтез Ig Е. Існують відомості, зазначені реакції відбуваються опосередковано через TLR4. Галектин-10 безпосередньо не приймає участі в пригніченні функції CD25⁺ T_{reg} клітин, однак є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин [8]. Були оцінені показники імунограм хворих на АР з гаплотипом TLR4/CLC 10 (табл.3) в порівнянні з показниками обстежених хворих на АР, що не є носіями визначених гаплотипів.

Таблиця 3
Імунологічні показники у хворих на АР залежно від гаплотипів поліморфізмів TLR4 та CLC 10

Показник	Показники практично здорових осіб	Хворі на АР з гаплотипом AG/(CT+TT), (n=4)	Хворі на АР, з гаплотипом AA+AG/CC+TT+CT (n=41)
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	4,0 - 8,8	4,72 ± 0,60	5,69 ± 0,33
Лімфоцити, %	18 – 40	28,75 ± 3,75	28,73 ± 1,19
Еозинофіли, %	0 - 5	6,25 ± 1,03	4,10 ± 0,45
Загальний IgE, МОд/мл	0 – 130	206,78 ± 5,08	197,41 ± 12,53
CD4 ⁺ , %	39 ± 5	41,68 ± 3,14	40,43 ± 1,30
CD4 ⁺ /CD25 ⁺ , %	9,4 ± 2,05	13,83 ± 2,87	17,21 ± 2,10
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , % (тис/мкл)	5-10% від CD4 ⁺	6,29 ± 0,50	4,5 ± 0,40
ІЛ-10, пг/мл	0- 50 пг/мл	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,02
ІЛ-4, пг/мл	0-20 пг/мл	55,9 ± 11,33	49,84 ± 3,80

При дослідженні показників периферичної крові хворих на АР носіїв зазначених гаплотипів виявлено, що рівень лейкоцитів в середньому склав 4,72 ± 0,60*10⁹/л, тобто не виходив за межі показників практично здорових осіб (4,0 - 8,8*10⁹/л). Відносна кількість лімфоцитів у середньому склала 28,75 ± 3,75%, що також не виходить за межі показників практично здорових осіб (18 – 40%); виявлена помірна еозинофілія зі збільшенням відносної кількості еозинофілів, що в середньому склала 6,25 ± 1,03%. За результатами обстеження хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 в імунологічних показниках рівень експресії молекул CD4⁺ у хворих на АР мав тенденцію до збільшення, та в середньому склав 41,68 ± 3,14% при показниках практично здорових людей 39±5%; рівень експресії CD4⁺/CD25⁺ становив 13,83 ± 2,87%, що перевищує показники здорових людей (9,4 ± 2,05%). По-

казник рівню експресії молекул CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ мав тенденцію до збільшення (в середньому склав 6,29 ± 0,50%). При визначенні рівню загального IgE в середньому концентрація в групі хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 становила 206,78 ± 5,08 МО/мл при показниках у практично здорових осіб 0 – 130 МО/мл.

Уміст у сироватці ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,34 ± 0,02 пг/мл, що не перевищує показники практично здорових людей 0- 50 пг/мл; відзначається збільшення вмісту ІЛ-4 у сироватці та становив 55,9 ± 11,33 пг/мл при показниках у практично здорових осіб 0 – 20 пг/мл.

З метою виявлення відмінностей за імунологічними показниками у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 було проведене порівняння відповідних груп з використанням критерію Манна-Уїтні (таб.4).

Таблиця 4
Відмінності за імунологічними показниками у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10

Показник	Хворі на АР з гаплотипом TLR4 CLC 10, (n=4)	Хворі на АР, (n=41)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , % (тис/мкл)	6,29 ± 0,50	4,5 ± 0,40
U, p	U _(n=4;n=41) = 25,50; p=0,024	

U, p - відмінності між групами за критерієм Манна- Уїтні.

При з'ясуванні залежності рівня експресії молекул CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 відмічено, що в зазначеній групі показник був статистично значимо вищий (критерій Манна-Уїтні U_(n=4;n=41) = 25,50; p=0,024) та склав 6,29 ± 0,50% (тис/мкл).

Отримані результати дозволяють розглядати ОНП генів TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297), як додатковий прогностичний показник при патогенетичних дослідженнях.

Висновки

1. При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10, алеля А гену TLR 2 або алеля G гену TLR 4 та розвитком АР.

2. При вивченні поширеності можливого поєднання генотипів генів TLR 4 (rs4986790) та CLC10 (rs420297)) виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип ААСС, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (24%), у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10 та алеля G гену TLR 4 з розвитком АР.

3. У хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4/ CLC 10, які містять поліморфні алелі G та Т виявлено достовірно вищий рівень експресії молекул CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Трег клітин (критерій Манна-Уїтні U_(n=4;n=41) = 25,50; p=0,024), що склав 6,29 ± 0,50% (тис/мкл) із зниженням вмісту ІЛ-10 та підвищенням ІЛ-4 (55,9 ± 11,33 пг/мл).

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 [та ін.]. // Цитология и генетика 2011; № 4: 29-35.
2. Охотникова Е.Н. Аллергический «марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей (лекция) // Современ. педиатрия. - 2008. - №4(21). - С.190-197.
3. Bryborn M., Hallden C., Sall T., Cardell L. O. CLC-a novel susceptibility gene for allergic rhinitis? // Allergy.-2010.- 65(2).-P.220-228
4. Ciprandi G., Cirillo I., Pistorio A. Impact of allergic rhinitis on asthma: effects on spirometric parameters // Allergy.- 2007.- P.18-20.
5. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis // Am J Rhinol Allergy.- 2010. -24(1). – P.1-3
6. Identification of polymorphisms in the Toll-like receptor gene and the association with allergic rhinitis // Eur Arch Otorhinolaryngol.- 2010.-267 (3).-P.385-389
7. Kang I., An X.H., Oh Y.K. et al. Identification of polymorphisms in the RNA se 3 gene and the association with al-

- lergic rhinitis // Eur Arch Otorhinolaryngol.-2010.-267(3).-P.391-5
8. Kubach I., Lutter P., Bopp T., et al. Human CD4 CD25 regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergi and suppressive function // Blood.- 2007.-110(5).-p.1550-1558
9. Mou Z, Shi J, Tan Y. Et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population // J Invest Allergol Clin Immunol.-2010.-20(1).-P.3-8.

English version: PREVALENCE OF HAPLOTYPES OF POLYMORPHIC GENES TLR 2, TLR 4, CLC-10 AND THEIR ASSOCIATION WITH SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS*

Sakevych V. D.

State Higher School of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

To determine the role of specific polymorphisms of genes that control the structural and regulatory elements nonspecific resistance of the organism in the development of allergic rhinitis prevalence determined polymorphism 2258G / A gene TLR2 (rs5743708), TLR 4 gene (rs4986790) and CLC-10 gene (rs420297) in the group surveillance and population control group, the analysis of immunological parameters and clinical manifestations in patients with polymorphic variants studied genes. To clarify a possible combination of different genotypes of all genes that define haplotype analyzes. When comparing the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene, allele A gene TLR 2 or TLR gene allele G 4 and the development of RA. In the study of the prevalence of possible combinations of genotypes TLR 4 gene (Asp299Gly) and CLC10 (rs420297)) found that the most common haplotype AASS as in the control group (30%) and in patients with AR (24%) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene and allele G TLR 4 gene with the development of RA. In patients with AR haplotype carriers TLR4 / CLC 10 containing polymorphic alleles G and T were found significantly higher levels of expression of molecules CD4 CD25 Foxp3 MPER cells (Mann-Whitney U (n = 4; n = 41) = 25,50; p = 0.024), which was 6,29 ± 0,50% (thousands / ml) of reducing the amount of IL -10 and IL -4 increase (55,9 ± 11,33 pg / ml). The results obtained can be considered gene TLR 4 SNPs (rs4986790) and CLC-10 (rs420297), as an additional prognostic indicator in pathogenetic studies.

Keywords: polymorphism, Toll-like receptors, halektyn-10, allergic rhinitis.

Introduction

There is a tendency to a rapid spread of allergic diseases in the world, which become a serious issue because of the widespread, annual growth of widespread disease, frequent complications, as well as a sharp decline in performance and quality of life of patients.

AR is seen as a major problem of allergology, since the disease in most cases is the first clinical manifestation of atopy, followed by transformation of bronchial asthma (BA) [4].

The study of the genetic basis of atopy is a key issue, which is necessary to establish the relationship between hereditary and environmental factors in the implementation of very complex pathological phenotype and understanding the mechanisms of interaction polygenic systems in the implementation of genetic information at the level of the whole organism. Knowing the molecular and cellular mechanisms of disease, we may identify genes, whose protein products are the most significant. According to studies, the genes of atopy and associated states are concentrated mainly in the 10 areas of the human genome.

According to studies, there are data about the association of allergic rhinitis with gene polymorphisms TIM-1 [9], SD14 [5], TLR 2-4 [6], RNA se 3 [7].

Specificity of the innate immune system is realized through family Toll-like receptors (TLRs). Important structural and molecular elements of the pattern - distinctive receptor (SPR) is a Toll-like receptor 2 (TLR 2) and Toll-like receptor 4 (TLR4). The genes encoding TLR2 and TLR4 show high variability in the population [1]. Recently the information has appeared about the identification of functional polymorphisms of genes TLR, due to the replacement of single nucleotides (from Eng. Single nucleotide polymorphism - SNP). As a result of these substitutions there is a reduction of ability to recognize appropriate ligands and efficiency of signal pulses, which leads to disruption of the activation of immune cells. A functional polymorphism of TLR 2-4 gives the regulation of innate immune response that is essential imbalance T1/T2-helpers. Similar mechanism may play a crucial role in the formation of chronic inflammation and has attracted attention as a potential risk factor for the development of atopic diseases, including AR [6].

In studies of foreign scientists the association of allergic rhinitis with gene polymorphisms halektyn -10 (CLC-

* To cite this English version: Sakevych V. D. Prevalence of haplotypes of polymorphic genes TLR 2, TLR 4, CLC-10 and their association with some immunological parameters in patients with allergic rhinitis - // Problemy ekologii ta medytyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 20-23.

10) is studied [3]. Halektyn -10 is representative of a family of endogenous lectins (known as lizofosfolipaza , protein Charcot - Leyden) , found in eosinophils and basophils. Exact studies have shown a significant intracellular expression of halektynu -10 to SD25+ Treg cells. In this connection, it does not participate directly in the suppression SD25+ Treg cells, but the specific blockade of halektyn -10 restores proliferative capacity SD25+ Treg cells and enhances their suppressive function. So halektyn -10 is necessary for the regulatory activity of Treg cells [8].

To determine the role of specific polymorphisms of genes that controls the structural and regulatory elements nonspecific resistance of the organism in the development of allergic rhinitis prevalence determined polymorphism 2258G / A gene TLR2 (rs5743708), TLR 4 gene (rs4986790) and CLC-10 gene (rs420297) in the group surveillance and population control group, the analysis of immunological parameters and clinical manifestations in patients with polymorphic variants studied genes.

Materials and methods.

To address the challenges put forward were examined 45 patients with AR aged 19 to 65 years ($35,6 \pm 1,57$) (men accounted for 51 % (23 patients) , and women - 49% (22 patients)). At the time of the survey , patients were in clinical remission stage and stopped receiving allergy medications 72 hours , the patients had severe comorbidity.

Diagnosis is established based on the AR diagnostic criteria ARIA (2008) diagnostic algorithm adopted in Ukraine and approved by the Ministry of Health of Ukraine. Quality of life of patients was determined using generally recognized questionnaires (Adult Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire).

Sensitization to allergens diagnosed on the basis of complex allergy diagnostic testing: collection allergic history, a positive skin scarificating test to allergens using standard sets (of "Immunologist" , Vinnitsa, Ukraine).

According to the standard procedure was conducted to determine the number of white blood cells in the blood and counting of blood cells in smears. Lymphocyte phenotype was analyzed in venous blood using monoclonal antibodies to CD4, SD25 (production of "sorbert", Russia) and intracellular protein Foxp3 («Bioscience», USA) by flow tsytofluoryometriyi by flow tsytofluoryometra EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, USA) using a program called System II TM software.

The levels of total IgE, interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) were determined using ELISA test kits (of "Ukrmed Don", Ukraine) using ELISA analyzer "Stat - Fax 2100" (USA).

To determine gene polymorphism rs420297 CLC-10 conducted the selection of genomic DNA from peripheral blood of examined using a set of "DNA Express-blood" (OOO NPF «Lyteh", Russia). Determination of gene polymorphism TLR2 (rs5743708) and TLR 4 (rs4986790) conducted by polymerase chain reaction [1].

Type allele (C \ T) CLC-10 gene was amplified using allele-specific polymerase chain reaction in 35 ml reaction mixture contained: 2.5 ml 10 x Buf for amplification, and 2 mM magnesium chloride, 0.2 mM of each dNTP , 2.5 units. Tag DNA polymerase with the addition of 5 pkmol specific primers: CLC_up 5'-CCC AGC AAC CAT

GCT TCT TGT TAC-3'; CLC_low 5'-TGA GCA AAC CCA CCT-3' and 5 pkmol specific probes labeled with fluorescent dyes FAM and R6G from the 5' end and BHQ-1, BHQ-2 from the 3' end, respectively:

CLC_wt (FAM) CG-CTG-GAG-GAA-CAG-GAA-AA (BHQ-1);

CLC_m (R6G) CG-CTG-GAG-GAA-CAA-GAA-AAA (BHQ-2)

Genomic DNA of examined of 20-50 ng was added to the mixture. Gene amplification halektynu-10 was performed on Thermocyclers detecting DT-322 (OOO "NPO DNA-technology", Russia) in real time, as follows:

- First cycle – 95°C / 3 minutes;

- 40 cycles – 95°C/15 seconds;

63°C/40 seconds

Products gene amplification CLC-10 were identified using fluorescent registration accumulation of DNA fluorescence channels: for the "wild" allele (wt): 1 channel - dye FAM, for the mutant allele (m): 2 - channel dye R6G, directly in the reaction.

The control group was consisted of 95 healthy individuals from a database of genetic samples SRI Genetic and immunological bases of pathology and pharmacogenetics VDNZU "UMSA." In the control group for the study of gene polymorphism SLC-10 were selected 45 DNA samples of persons not suffering from allergic diseases. The study was conducted in accordance with provided written consent to the inspection and conclusion of the Commission on ethical issues and bioethics Ukrainian Medical Dental Academy.

Mathematical analysis of the data was carried out using the program «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Comparison of genotype frequencies between the study groups was performed by analysis of contingency tables using Fisher's exact test. To compare allele frequencies used criterion χ^2 . To assess the reliability of differences between groups using Fisher's exact two-sided test (for small groups). For all types of analysis considered differences statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion.

In the study of family allergic history in patients with AR were found various manifestations of allergy in the family in 76%. The presence of allergic diseases in relatives and II degree relatives of the mother was found in 35% of the father - in 30% of both parents - 11% of all patients examined in AR. There were no data on the burdened history of allergy in 24% of patients with RA. The results are consistent with data indicating preferential relationship with atopic diseases of the mother [2].

As noted above , as a result of observation of the dynamics of the disease in patients with AR were installed AR severity: mild course - in 11 (25%) , medium -heavy - in 32 (71%), heavy - in 2 (4%). Also was revealed the presence of genetic predisposition to allergic relatives and II degree relatives of the mother was found in 35% of the father - in 30% of both parents - 11% of all patients examined in AR. In 44% of the course AR has been associated with various nosological forms of allergic disease. In 20% of the patients on concomitant AR was established diagnosis of asthma, 15% present symptoms of AD, the full triad of atopy was found in 11% of patients surveyed by us in AR. With Allergic examination of patients with AR in 89% of patients were found positive skin

tests to pollen, fungal, household, epidermal and food allergens. Moreover, 7% occurred sensitization to one allergen group, 29% - to two groups, 36% - up to three groups, 13% - to the four groups, and 4% - of all five groups of allergens. In 11 % of patients had negative skin tests to all allergens used .

To clarify a possible combination of different genotypes of all genes that define haplotypes were analyzed. We found that the most common haplotype GGAASS as in the control group (30%) and in patients with AR (23%) (Table 1).

Table 1.
The distribution of haplotype frequencies polymorphism TLR 2, TLR 4 and halektynu-10 gene among Poltava population and patients with allergic rhinitis, % (n)

CLC10	TLR 4	GG AA CC	GA AA CC	AA AA CC	GG AA CT	GA AA CT	AA AA CT	GG AA TT	GA AA TT	AA AA TT	GG AG CC	GA AG CC	AA AG CC	GG AG CT	GA AG CT	AA AG CT	GG AG TT	GA AG TT	AA AG TT	GG GG CC	GA GG CC	AA GG CC	GG GG CT	GA GG CT	AA GG CT	GG GG TT	GA GG TT	AA GG TT
	TLR 2	GG AA CC	GA AA CC	AA AA CC	GG AA CT	GA AA CT	AA AA CT	GG AA TT	GA AA TT	AA AA TT	GG AG CC	GA AG CC	AA AG CC	GG AG CT	GA AG CT	AA AG CT	GG AG TT	GA AG TT	AA AG TT	GG GG CC	GA GG CC	AA GG CC	GG GG CT	GA GG CT	AA GG CT	GG GG TT	GA GG TT	AA GG TT
	Group control (n=45)	66,7 (30)	4,4 (2)	0	17,8 (8)	2,2 (1)	0	2,2 (1)	0	0	4,4 (2)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Patients in AR (n=45)	51,1 (23)	2,2 (1)	0	20,0 (9)	0	0	11,1 (5)	4,4 (2)	0	4,4 (2)	0	0	4,4 (2)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CLC10	CT/TT allele carriers T	$\chi^2 = 2,45$; BШ = 2,26 (0,92-5,56); p = 0,118																										
TLR 4 896A/G	AG/GG allele carriers G	$\chi^2 = 0,49$; BШ = 2,15 (0,50-9,21); p = 0,482																										
TLR 2 2258G/A	GA/AA allele carriers A	$\chi^2 = 0,18$; BШ = 1,00 (0,19-5,24); p = 0,673																										

In comparison of the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene, allele A gene TLR 2 or TLR gene allele G 4 and the development of RA.

However, the study of family allergic history in this group of patients with AR found various manifestations of allergy in the family in 100%. As a result of observation of the dynamics of the disease in patients was found severity of AR (medium-difficult - 89%, mild course - 11%) according to the clinical form of AR (year-round (or persistent) - 100%). When Allergic to 100% of patients were found positive skin tests to pollen, fungal, household, epidermal and food allergens.

Analysis of the clinical course of disease in these patients showed the presence of comorbidity: frequent SARS that were more prolonged course and complications of the bronchopulmonary system (bronchitis, pneumonia) - 83%; polypous rhinosinusitis - 67% gastroduodenitis - 50%.

In the analysis of immunological parameters including carrier haplotypes revealed a difference in the level of statistical trend (p ≤ 0,06) in terms of CD4 / 25 / Foxp3 in carriers of the mutant allele haplotypes.

In order to better study and understanding of genetic predisposition to the emergence of AR reasonable is to study the prevalence of possible combinations of genotypes 4 and TLR genes CLC10 (Table 2).

Table 2.
Frequency distribution of haplotypes 4 and TLR polymorphisms halektynu-10 gene among Poltava population and patients with allergic rhinitis, % (n)

CLC 10 TLR4	AA CC	AA CT	AA TT	AG CC	AG CT	AG TT	GG CC	GG CT	GG TT
Group control (n=45)	66,7 (30)	17,8 (8)	2,2 (1)	4,4 (2)	2,2 (1)	0	0	0	0
Patients in AR (n=45)	53,3 (24)	20 (9)	13,3 (6)	4,4 (2)	4,4 (2)	4,4 (2)	0	0	0
(CLC10) (TLR 4)	CT/TT, AG/GG	$\chi^2 = 0,26$; BШ = 3,14 (0,31-31,42); p = 0,609							

We found that the most common haplotype AASS as in the control group (30%) and in patients with AR (24%). When comparing the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene and allele G TLR 4 gene with the development of RA.

For a more detailed assessment of cellular and humoral immunity in patients with AR depending on TLR4 polymorphisms and haplotypes CLC 10 immunological parameters were evaluated in patients with AR haplotype TLR4 CLC 10 (Table 3) in comparison with those of the patients in the AR that are not carriers of these haplotypes.

As noted earlier, the imbalance T1/T2 -helper cells with a predominance of T-2 immune response plays a major role in the development of RA. In response to exposure to allergens in patients with AR is the release of T2- induced cytokines and activation of eosinophils, mast cells and increased synthesis of IgE. There is information of mentioned reactions that occur indirectly via TLR4. Halektyn -10 does not directly take part in the suppression SD25+ Treg cells, but is necessary for the regulatory activity of Treg cells [8]. Immunological parameters were evaluated in patients with AR haplotype TLR4/CLC 10 (Table 3) in comparison with those of the patients in the AR which is not specified haplotype carriers .

Table 3.
Immunological parameters in patients with AR depending on TLR4 polymorphisms and haplotypes CLC 10

Index	Indicators of healthy individuals	Patients with AR haplotypes AG/(CT+TT), (n=4)	Patients with RA, with haplotype AA+AG/CC+TT+CT (n=41)
L, 10 ⁹ /л	4,0 - 8,8	4,72 ± 0,60	5,69 ± 0,33
Lymphocytes, %	18 - 40	28,75 ± 3,75	28,73 ± 1,19
Eosinophils, %	0 - 5	6,25 ± 1,03	4,10 ± 0,45
Total IgE, IU / ml	0 - 130	206,78 ± 5,08	197,41 ± 12,53
CD4 ⁺ , %	39 ± 5	41,68 ± 3,14	40,43 ± 1,30
CD4 ⁺ /CD25 ⁺ , %	9,4 ± 2,05	13,83 ± 2,87	17,21 ± 2,10
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , %	5-10% від CD4 ⁺	6,29 ± 0,50	4,5 ± 0,40
IL-10, pg / ml	0- 50 пг/мл	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,02
IL-4, pg / ml	0-20пг/мл	55,9 ± 11,33	49,84 ± 3,80

In the study of peripheral blood of patients with AR carriers listed haplotypes was revealed that the level of white blood cells averaged $4,72 \pm 0,60 \cdot 10^9 / L$, that did not go beyond the parameters of healthy individuals ($4,0 - 8,8 \cdot 10^9 / L$). The relative number of lymphocytes in the average of $28,75 \pm 3,75\%$, which is also not beyond the parameters of healthy individuals ($18 - 40\%$) revealed mild eosinophilia with an increase in the relative number of eosinophils that averaged $6,25 \pm 1,03\%$. According to a survey of patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10 immunological parameters in the expression of CD4 molecules in patients with AR had a tendency to increase, and the average was $41,68 \pm 3,14\%$ in terms of healthy subjects $39 \pm 5\%$ level expression of CD4 / CD25 was $13,83 \pm 2,87\%$, higher than that of healthy people

($9,4 \pm 2,05\%$). Indicator of the level of expression of CD4 CD25 Foxp3 molecules tended to increase (on average was $6,29 \pm 0,50\%$). In determining the level of total IgE in the average concentration in patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10 was $206,78 \pm 5,08$ IU / ml at performance in healthy persons $0 - 130$ IU / ml.

The content of serum IL-10 in patients with AR is averaged $0,34 \pm 0,02$ pg / ml, which is not higher than in healthy people $0 - 50$ pg / ml; marked increase in the content of IL-4 and serum was $55,9 \pm 11,33$ pg / ml at performance in healthy persons $0 - 20$ pg / ml.

In order to detect differences in immunological parameters in patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10 compared the respective groups using the Mann-Whitney (tab.4).

Tab.4
Differences in immunological parameters in patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10

Index	Patients with AR haplotypes TLR4 CLC 10 , (n=4)	Patients with RA, (n=41)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , %	6,29 ± 0,50	4,5 ± 0,40
U, p	U _(n=4;n=41) = 25,50; p=0,024	

U, p - differences between groups by Mann-Whitney.

In clarifying the dependence of the level of expression of CD4 CD25 Foxp3 molecules in patients with AR Media TLR4 CLC 10 haplotypes observed in this group rate was statistically significantly higher (Mann-Whitney U (n = 4; n = 41) = 25,50; p = 0,024) and was $6,29 \pm 0,50\%$ (thousands / ml).

The results can considered gene TLR 4 SNPs (rs4986790) and CLC-10 (rs420297), as an additional prognostic indicator in pathogenetic studies.

Conclusions

1. When comparing the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene, allele A gene TLR 2 or TLR gene allele G 4 and the development of RA.

2. In the study of the prevalence of possible combinations of genotypes TLR 4 gene (rs4986790) and CLC10 (rs420297) was found that the most common haplotype AASS as in the control group (30%) and in patients with AR (24%) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene and allele G TLR 4 gene with the development of RA.

3. In patients with AR haplotype carriers TLR4 / CLC-10 containing polymorphic alleles G and T were found significantly higher levels of expression of molecules CD4 CD25 Foxp3 MPER cells (Mann-Whitney U (n = 4; n =

41) = 25,50; p = 0.024), which was $6,29 \pm 0,50\%$ (thousands / ml) of reducing the amount of IL-10 and IL-4 increase ($55,9 \pm 11,33$ pg / ml).

References

1. Izmailova O.V. How polymorphisms TLR2 and TLR4 gene with susceptibility to certain urogenital infections. / O. Izmailov, AA Shlykova, NA Beaver [and others]. // Cytology and Genetics 2011; № 4: 29-35.
2. Ohotnikova EN Allergic "march": the link between generations and the escalation of allergies in children (lecture) // modern. pediatrics. - 2008. - № 4 (21). - P.190-197.
3. Bryborn M., Hallden C., Sall T., Cardell L. O. CLC-a novel susceptibility gene for allergic rhinitis?//Allergy.-2010.-65(2).-P.220-228
4. Ciprandi G., Cirillo I., Pistorio A. Impact of allergic rhinitis on asthma: effects on spirometric parameters // Allergy.-2007.- P.18-20.
5. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis\ Am I Pinol Allergy.- 2010. -24(I). - P.1-3
6. Identification of polymorphisms in the Toll-like receptor gene and the association with allergic rhinitis \\\Eur Arch Otorhinolaryngol.- 2010.-267 (3).-P.385-389
7. Kang I., An X.H., Oh Y.K. et al. Identification of polymorphisms in the RNA se 3 gene and the association with allergic rhinitis // Eur Arch Otorhinolaryngol.-2010.-267(3).-P.391-5
8. Kubach I.,Lutter P., Bopp T.,et al. Human CD4 CD25 regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergi and suppressive function // Blood.- 2007.-110(5).-p.1550-1558
9. Mou Z, Shi J, Tan Y. Et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population \ J Invest Allergol Clin Immunol.-2010.-20(1).-P.3-8.

Матеріал надійшов до редакції 3.12.2013

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Колесник В.В.

УДК: 616.12-094/002.331:616.24

ХРОНОЛОГІЯ ДЕСТРУКТИВНО-ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ТА ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНСУЛЬТІ У ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР*

Колесник В.В.

ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України». м. Київ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова НАМН України». м. Харків

Матеріалом дослідження стали інтактні самці крыс лінії Вистар 3-х місячного віку (n=84) і особи з моделюваним ішемічним інсультом (n=84), за якими спостерігали протягом 28 днів. Мікроскопічне дослідження проводили традиційно. Кусочки головного мозку виїмали, промивали, фіксували в 12%-м формальдегіді, піддавали постфіксації, обезжовили. Срези фарбували, аналізували в мікроскопі; фотографували цифровою камерою «Canon EOS-3000». Було встановлено, що протягом 1-х-17-х днів спостереження відбувся виражений структурно-функціональний регрес нейронів, ендотелію мікросудин головного мозку. Останній пов'язували з розвитком тромбозу, змінами трофіки, розвитком деструкції, некрозу. Характерними морфологічними ознаками вважали дегенерацію, розвиток запальних процесів. Таким чином, мікроскопічні зміни в корі головного мозку самців крыс лінії Вистар носили фазний характер; залежали від терміну дебюту моделюваного ішемічного емболічного інсульту; відбулися в деструкції ендотеліоцитів, глії, ядерно-цитоплазматичних компонентів нейронів, формуванні очагових запалень.

Ключові слова: деструкція, дегенерація, запалення, самці крыс лінії Вистар, моделюваний ішемічний емболічний інсульт.

Представлена робота являє собою фрагмент науково-дослідницької тематики: «Розробка технології отримання аутоклітин різних типів біологічних тканин із стромальних клітин кісткового мозку і застосування їх для лікування захворювань різного генезу за допомогою аутотрансплантації», номер № 0106 U003995.

З точки зору вітчизняних та зарубіжних дослідників, інсульт на теперішній час являє собою серйозну проблему як оперативної, так і консервативної неврології [2,4]. Статистика ВООЗ вказує на факти щорічної захворюваності на інсульт 16 мільйонів людей, 5 мільйонів із яких помирають. В Україні зазначені показники досягають 110-130 тисяч людей. Не дивлячись на сучасні методи нейровізуалізації, окремі аспекти розвитку інсульту залишаються недостатньо вивченими. Потребують подальшої розробки принципи структурно-функціонального дослідження хронології інсультного процесу, окремі аспекти патогенезу, клінічного перебігу хвороби, морфогенезу відтермінованого періоду [8]. Беззаперечним допоміжним фактором у цьому можуть стати експериментальні розробки з питань хронології етіопатогенезу ішемічного інсульту (розвиток та послідовність дегенеративно-деструк-

тивних, запальних реакцій), в яких суттєва роль відіграватиметься лабораторним тваринам (лінійним щурам, мишам, кролям, тощо) [6]. Можливість надійного проведення екстраполяції моделі, короткий термін спостережень відносно життєвого циклу тварин сприяє детальному аналізу отриманих результатів, подальшому впровадженню останніх в клінічну практику. Отже, вивчення хронології дегенеративно-деструктивних, запальних реакцій при експериментальному інсульті у щурів видається актуальним.

Мета вивчити хронологію деструктивно-дегенеративних та запальних процесів при експериментальному інсульті у щурів лінії Вистар

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження стали 3-х місячні самці щурів лінії Вистар контрольної (n=84) та експеримент-

* Цитування при атестації кадрів: Колесник В.В. Хронологія деструктивно-дегенеративних та запальних процесів при експериментальному інсульті у щурів лінії Вистар // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 24–28

тальної (модельований церебральний ішемічний емболічний інсульт) груп (n=84). Створення моделі інсульту відбувалось у чіткій відповідності до відпрацьованої схеми-алгоритму [1]. Тварин утримували в типових металевих клітинах із сухою тирсовою (сосна, береза) підстилкою, за стандартних умов клімат-контролю віварію ($t = 18-24^{\circ}\text{C}$, вологість 50-70 %, освітлення-60 лк). Екструдований корм та воду видавали ad libitum 30-32 г 2 рази на добу. Щурів виводили із експерименту шляхом передозування кетамінового наркозу (у відповідності до Європейської конвенції по захисту хребтових тварин, що використовуються з експериментальною метою - Страсбург, 1986). Постмортально досліджували шматочки головного мозку, його судин (розміром 0,5 куб. см) контрольних та експериментальних самців. Фіксували у 12 %-му розчині формаліну на фосфатному буфері ($\text{pH} = 7,0-7,2$), при $t^{\circ} = 18-20^{\circ}\text{C}$, зневоднювали спиртами зростаючої концентрації, заливали у парафін/целоїдин. Із блоків виготовляли зрізи товщиною 10-15 мкм (мікромом ММ-25, Росія), останні забарвлювали гематоксиліном та еозином, імпрегнували азотно-кислим сріблом. Гістологічне дослідження проводили за традиційною схемою, поетапно (на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту, 17-ту, 21-шу, 28-му добу експерименту). Для мікроскопічного аналізу матеріалу застосовували світлооптичну систему мікроскопу Lieca (Німеччина): $\times 300$; $\times 600$.

Результати та їх обговорення

Морфологічне дослідження препаратів головного мозку контрольної групи щурів продемонструвало цілісність його цито та мієлоархітекτονіки. Мікроструктура кори, підкоркових центрів виразна, без ушкоджень поширеної будови. Судини без наявності дефектів, крововиливів, параваскулярного набряку. У цілому, структура дослідженого зразка препарату відповідала показникам статеві-вікової норми для тварин відповідної лабораторної лінії.

Результати морфологічного аналізу секційного матеріалу, взятого від особин експериментальної групи з модельованим ішемічним інсультом, продемонстрували наявність властивих для ішемії розладів. Останні носили фазний характер та залежали від строків відтермінованості дебюту інсультного процесу, глибини ушкодження, величини його ділянок. У зв'язку із вище зазначеним спостереження проводили послідовно, з урахуванням критичних періодів розвитку ознак ішемії та її природного безмедикаментозного усунення.

У гістологічних препаратах, отриманих від тварин із групи з модельованим ішемічним інсультом спостерігали (перша доба спостереження) ділянки некрозу, що розповсюджувались на кору півкуль великого мозку. Зони тканини, що розташовувались поруч із ушкодженими, утримували лейкоцитарні інфільтрати, видавались більш контрастними. Одними із найбільш характерних діагностичних критеріїв розвитку ішемічного інсульту ставали інфаркти, які за своєю структурою відповідали типовим вогнищевим некрозам мозку. Розвиток ішемії та пов'язаний із нею розлад трофічних процесів призводили до руйнації кори з утворенням сітчастої структури головного мозку. Вона залишалась збереженою протягом першої доби постінсультного періоду, поступово замінюючись у наступний строк спостереження на повноцінні ділянки деструкції.

Останні утримували останки клітинного пулу із руйнованих нейронів. Їхні ядра характеризувались гомогенністю та гіперхромністю, схильністю до повторення форми клітини (витягнута, різка). Аналіз окремих препаратів головного мозку щурів, однак, не надав можливості, гістологічної реєстрації тотального некрозу, зон генералізації вогнищ «розм'якнення», організації повноцінного рубця. Мікроскопічно на цьому тлі виявляли загибель нейронів кори (фаза неповного некрозу). Звертали на себе увагу зміни ендотелію судин, що були пов'язані із гетерогенністю останнього та його спроможністю до десквамації за умов постнатального онтогенезу [7]. Згадані феномени провокували у подальшому інтенсивну міграцію лейкоцитів, «розплавлення» некротизованої тканини, «розм'якнення» структур у ушкоджених ділянках. Ці процеси додавали свого внеску у патогенез ішемічного розладу, що розвивався на тлі масштабної емболії. На мікрофотографіях світло-сіра за кольором речовина емболів, розташовуючись повздовж ушкодженого внутрішнього шару стінки, цілком заповнювала собою отвір судини, збільшувала його, тиснула на оточуючі структури. З часом у досліджених зонах розвивались дефекти шарів стінки, запалення, набряк. Останнє, у подальшому, можливо, сприяло тканевій ізоляції судин та майбутнього розвитку тканевій гіпоксії. Зазначені факти сприяли появі додаткових причин щодо посилення структурних змін у судинній стінці. Останнє, безперечно, підсилювало розвиток ішемії. [10,11].

Третя доба експерименту позначалась посиленням інфільтрації різними клітинними елементами, головним чином, лімфоцитами, невеликою кількістю макрофагів та еозинофілів. Некротичні вогнища були повністю сформовані, носили розповсюджений характер. За інтенсивністю діapedезу еритроцитів у параваскулярний простір (геморагічним компонентом) останні підпорядковувались на характерні групи. Першу із них, найбільш типову, складали білі інфаркти, що були розповсюджені як сірою, так і білою речовиною, переважно скроневій, тім'яній області, зовнішньої капсули. Мікроскопічно тканина на місці формування останніх видавалась порохнявою, крихкою, дрібною, із блідим, майже прозорим забарвленням (гематоксиліном-еозином). Іншу групу складали інфаркти змішаного типу, малочисельні, діагностовані лише на деяких гістологічних препаратах. Так звані, червоні геморагічні інфаркти, реєструвались у окремих ділянках (наближених до мікросудин, капілярів та їх розгалужень) сірої речовини мозку. Вони відрізнялись схильністю до генералізацій та формування великих ділянок вогнищ. У згаданих вище ділянках діагностували діapedез еритроцитарних клітин у параваскулярний простір, набряк, некробіотичні зміни гліальних компонентів, ішемію [7]. Ендотеліальні клітини характеризувались ознаками гіперхромності ядра, зсувом останнього у напрямку одного із полюсів клітини, появою гетерохроматину. На відміну від препаратів контрольної групи, контакти між клітинами в судинах секцій від тварин експериментальної групи, були ослаблені, у поверхневому шарі формувались щілини [5]. Периваскулярний набряк, який виникав у результаті підвищеної проникливості, призводив до певної ізоляції окремих судин від оточуючих тканин з наступним розвитком тканевій гіпоксії. Таким чином,

утворювались додаткові причини, що погіршували будову судинної стінки [10]. У безпосередній близькості від ушкодженої ділянки зосереджувались тромбоцитарні пластини та окремі мегакаріоцитами з ознаками секвестрації. В більш віддаленому діапазоні спостереження відмічались помітні деструктивно-дегенеративні зміни стінок судин, десквамація клітин поверхневого шару. На окремих препаратах відмічений ангіоспазм, стази та, як наслідок, виражений периваскулярний набряк. Речовина головного мозку у вогнищах набряку піддавалась помітному некрозу (від локальних ділянок з чітко відміченою межею до фрагментів з ознаками генералізації). Очевидно, що саме останні факти сприяли розвитку клінічної картини гіпоксії у щурів, вираженому ацидозу. Відмічена патогенетична картина розвитку ішемічного інсульту, не виключено, сприяла посиленню судинної мозкової недостатності, яка підсилювалася блокуванням мозкового кровообігу [9]. Зміни адгезивних властивостей еритроцитів, вірогідні зміни в системі згортання крові призводили до появи мікротромбів (рис. 1) у судинах, сприяли порушенню трофіки оточуючої тканини, розвитку мікробіотичних процесів.

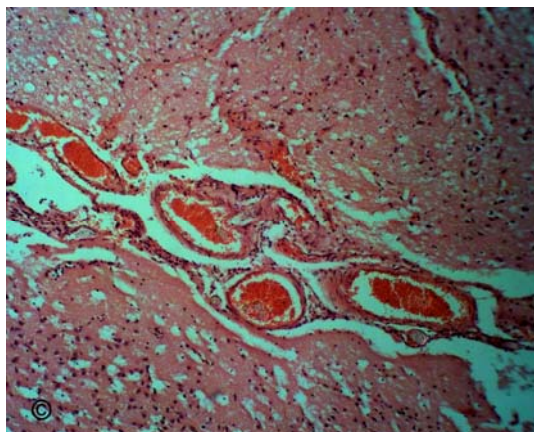


Рис. 1. Еритроцитарні тромби мікросудин головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, третя доба спостереження). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 300$.

Одним із найбільш яскравих прикладів стали тромбози церебральних судин вертебро-базиллярного басейну, фронто-парієтального кута, підкоркових вузлів правої гемісфери. Оклюзія магістральних судин створювала умови для подальшого (сьома доба спостереження) ушкодження тканини півкуль головного мозку. Зазначений період спостереження знаменувався появою астроцитів, їх проліферуючих форм. Через тиждень після розвитку модельованого інсульту спостерігалось формування великої зони розм'якшення некротичного вогнища. На межі ділянки некрозу в корі відмічались чисельні скупчення лейкоцитів-лейкоцитарний вал. У окремих зонах між некротичним вогнищем та сусідньою з ним ділянкою починала формуватись структурована межа. Між осередком некрозу та нервовою тканиною реєстрували активацію астроцитів. Клітини розташовувались на деякій відстані одне від одного, без чіткого упорядкування. На межі відносно інтактною до ішемічних розладів тканини та ушкоджень відмічали велику кількість судин різного діаметру. Навколо останніх мали місце вогнища запальних процесів, інфільтративних явищ (нейт-

рофіли), що розповсюджувались щерть до зон локалізації мигдалевидного, хвостатого ядер. У окремих випадках ще спостерігались тромбози, дефекти шарів стінок судин, паравазальні крововиливи (рис. 2) не встановлювались. Зазначений період дослідження знаменувався початком процесів активного формування колагенових волокон, що у свою чергу, сприяло утворенню гліомезодермальних, у разі незначних за своїми розмірами зон ушкоджень та сполучотканинних рубців, кист,-за умов наявності великих ділянок деструкції. Модельовані ішемічні інсульти, що спостерігались у згадані строки, супроводжувались розвитком цілої низки судинних реакцій. В першу чергу, вони були пов'язані з феноменами деформації клітин, які формували шари судинної стінки. З іншого боку, велику роль відігравали зміни поверхневої архітекτονіки еритроцитів як клітин циркулюючої ланки системи гемопоезу. В основі кожного із випадків лежали фізико-хімічні перебудови мембранних ліпідів, білків, а також, пов'язані із ними електричні властивості, іонна проникливість клітинної мембрани.

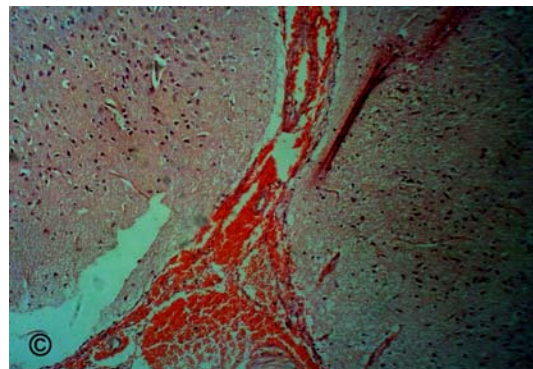


Рис. 2. Права півкуля головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х-місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, сьома доба спостереження). Еритроцитарні тромби мікросудин, паравазальні крововиливи. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 300$.

На чотирнадцяту добу спостереження очищення кори великого мозку від некротичних мас спостерігалось на усій площі ушкодженої області. В цей період ще спостерігались ознаки запальних (рис. 3) реакцій (інфільтрація у переважній більшості нейтрофілами та макрофагами). На місці вогнищ колишніх некротів формувались повноцінні лікворно-гліальні кисти. Між ділянками ушкодженої та інтактною тканини продовжувалось формування гліального рубця. Останній утворювався за участю декількох шарів астроцитів. У разі розвитку об'ємних ділянок некротів, коли патологічний процес стосувався не лише кори півкуль головного мозку, але й субкортикальних структур, на межі ушкодження спостерігалась поява значної кількості капілярів, клітин сполученої тканини, гліальних клітин. Тобто, за умов об'ємних ушкоджень формувався змішаний гліо-сполучотканинний рубець. У сусідніх із ішемізованою зоною, як і у випадках, що реєстрували на ранніх етапах, спостерігали малочисельні, дифузно розосереджені ушкоджені нейрони. У розташованих поруч із ділянками некрозу зонах визначали порушення структури кори, у окремих випадках відсутність першого та другого шарів. Пошук ділянок з ознаками клітинної проліферації виявився не задовільним.

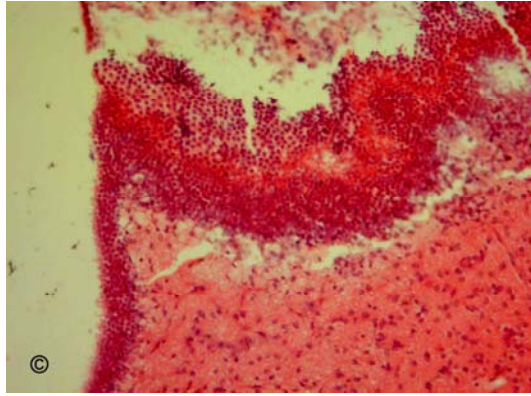


Рис. 3. Права півкуля головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, чотирнадцята доба спостереження). Розповсюджені вогнища інфільтрації. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 300$.

На сімнадцяту добу спостереження зміни у структурі півкуль головного мозку щурів з модельованим ішемічним інсультом нагадували ушкодження, що були зареєстровані у попередні строки дослідження (чотирнадцята доба). Мікроскопічно останні мало різнились між собою. Продовжувалось формування гліального рубця. На місці вогнищ колишніх некрозів відзначали повноцінні лікворно-гліальні кисти. Мікросудини півкуль головного мозку характеризувались чіткою будовою, відсутністю грубих дефектів стінок (рис. 4). Процеси усунення клітинного детриту тривали, поступово наближуючись до свого фіналу. Факти проліферації клітин встановлено не було.

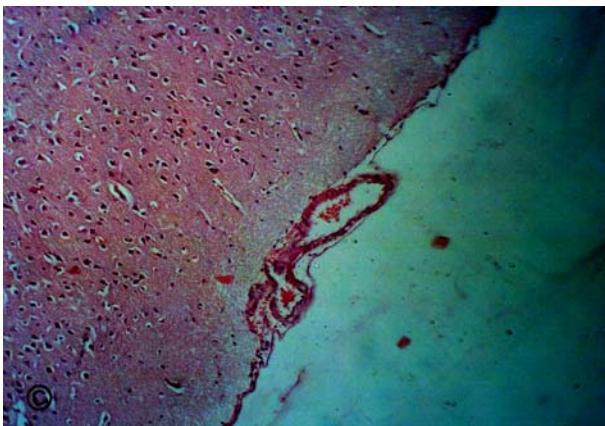


Рис. 4. Півкуля головного мозку самця щура лінії Вістар 3-х місячного віку (група тварин з модельованим ішемічним інсультом, сімнадцята доба спостереження). Отвір мікросудини. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 300$.

Через три тижні потому (двадцять перша доба спостереження) морфологічна картина змін у півкулях головного мозку щурів зводилась до тотального розповсюдження та завершення процесів очищення від некротичних мас. На цей період в окремих ділянках ще виявляли інфільтрацію ушкоджених зон мозку нейтрофілами та макрофагами, однак, зазначені явища носили поодинокий характер. У місцях некротичних вогнищ спостерігались лікворно-гліальні кисти. Процес формування останніх йшов до свого завершення (їхні фрагменти були цілком вкриті оболонкою, що утворювалась переважним чином гліальними клітинами). Між ушкодженою та не розруйнованою тканинами великого мозку зберігався гліальний рубець. Знов

сформований рубець долучав до свого складу астроцити, що розташовувались пошарово, послідовно (в три-чотири шари). Як і у попередній період спостереження (чотирнадцята доба) за умов масштабних, глибоких ушкоджень (коли руйнування стосувалось субкортикальних центрів) на межі останніх йшов розвиток капілярів. Поруч із ними концентрувались гліальні, сполученотканинні клітини (утворювався гліо-сполученотканинний рубець). У межових з ішемізованою зоною, як і у попередні строки спостерігали дифузне розосередження ушкоджених форм нейроцитів. У прилеглих до колишніх ділянок некрозу зонах кори відзначалось певні порушення пошарової структури останньої. На гістологічних препаратах мікросудини мали вигляд цілих структур.

На четвертому тижні (двадцять восьма доба) спостереження був повністю завершений процес очищення тканини від клітинного детриту. На місцях вогнищ некрозів спостерігались гліо-сполученотканинні рубці та повноцінні лікворні кисти. Визначним моментом даного терміну спостереження виявились особливості структури сусідньої з ушкодженою зоною ділянок, де переважна більшість нейронів виявилась неушкодженою. У віддалених від зони колишнього некрозу ділянках реєстрували поодинокі гіперхромні неушкоджені нейрони.

Висновки: розвиток ішемічного інсульту у лінійних щурів позначався виразною хронобіологічністю (1-ша-28 доба експерименту), що чітко залежала від давності термінів початку процесу, супроводжувалась дистрофією нейроцитів, їхніх відростків, ушкодженнями цитоплазматичних елементів, структури ядра. На тлі зазначених змін активно розвивались проліферативні та інфільтративні реакції.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні хронобіологічних закономірностей розвитку експериментального церебрального ішемічного (емболічного) інсульту у самців щурів лінії Вістар та подальшій екстраполяції отриманих результатів у клінічну практику.

Література

1. Торяник И.И. Унифицированный подход к созданию модели ишемического инсульта головного мозга в эксперименте на крысах линии Вистар / И.И. Торяник, В.В. Колесник // Актуальні проблеми сучасної медицини. - 2010. - № 4. - С. 155-159.
2. American Heart Association [American Heart Association / Heart Disease and Stroke Statistics.] [Electronic resurs]. - Update, Dallas TX, 2007. - P. 36-41. <http://www.americanheart.org/statistics>.
3. Andriessen T. M. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury / T. M. Andriessen, B. Jacobs, P. E. Vos // J. Cell. Mol. Med.—2010.—Vol. 14, N 10. — P. 2381—92.
4. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells / T. Mimura, M. Dezawa, H. Kanno, I. Yamamoto // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. - 2005. - Vol. 64, Issue 12. - P.1108-1117.
5. Bell R.D., Winkler E.A., Sagare A.P. [at al.] Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype on the adult brain and during brain aging // Neuron. - 2010. - Vol. 68. - P. 409-427.
6. Durukan A. Ischemic Stroke in Mice and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. - 2009. - Vol. 573. - P. 95-114.
7. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change / G. Tyson, G. Teasdale, D. Graham, J. Mc Culloch // Ann. Neurol. - 2004. - Vol. 15. - P. - 559-567.

8. Hossniann K.A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke / K.A. Hossmann // Cellular and Molecular Neurobiology. - 2006. - Vol. 26, Issue 7-8. - P.1057-1083.
9. Mohr J.M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / J.M. Mohr, D.W. Choi, J.C. Grotta. - Philadelphia: Livingstone, 2004. - 1616 p.
10. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats / Y. Taguchi, S. Takashima, E. Sasahara // Archives of Histology and Cytology. - 2004. - Vol. 67, № 3. - P. 253-261.
11. Wahtgren N. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe implementation of Thrombolysis in Stroke- Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study // N. Wahtgren, N. Ahmed, A. Davalos // The Lancet Neurology. - 2007. - Vol. 369. - P. 275.

English version: CHRONOLOGY OF DESTRUCTIVE AND DEGENERATIVE INFLAMATION PROCESSES IN WISTAR RATS WITH EXPERIMENTAL BRAIN STROKE*

Kolesnyk V. V.

SI A. P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Kyiv

SI I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Kharkiv

Three-month-old intact male Wistar rats (n= 84) and animals with modeled ischemic stroke (n= 84), observed during 28 days, served as material for this research. Microscopic examination was carried out in a traditional way. Bits of the brain were removed, washed, fixed in 12 % formaldehyde, subjected to postfixation and dehydrated. Sections were contrasted, analyzed under a microscope and photographed with a digital camera "Canon EOS-3000". It was found that a pronounced structural-functional regression of neurocytes and endothelium of cerebral microvessels took place during days 1–17 of the observation. The above regression was attributed to development of thrombosis, trophic changes, development of destruction and necrosis. Degeneration and development of inflammation were considered characteristic morphological features. Thus, microscopic changes in the cerebral cortex of male Wistar rats were of a phase character; depended upon terms of the début of modeled ischemic embolic stroke; consisted in destruction of endotheliocytes, glia and nucleocytoplasmic components of neurons and formation of inflammatory foci.

Key words: destruction, degeneration, inflammation, male Wistar rats, modeled ischemic embolic stroke.

This work is a part of the research: "Development of technology for obtaining autocytes of various types of biological tissue from the bone marrow stromal cells and their use for the treatment of diseases of various origins using autotransplantation", No. 0106 U003995.

Introduction

From the point of view of domestic and foreign researchers, stroke at the present time is a major issue both of the operative and conservative neurology [2, 4]. WHO statistics indicate the annual incidence of stroke is 16 million people, 5 million of whom die. In Ukraine, these values reach 110–130 thousand people. Despite modern imaging techniques, certain aspects of stroke remain poorly understood. The principles of structural and functional studies of chronology of the stroke process, as well as certain aspects of the pathogenesis, clinical disease and morphogenesis of the delayed period demand further development [8]. Undoubtedly, an auxiliary factor in reaching this goal may become experimental investigations on the chronology of the pathogenesis of ischemic stroke (development and consistency of degenerative and destructive, inflammatory reactions) in which a substantial part is to be played by laboratory animals (linear rats, mice, rabbits, etc.) [6]. The ability to conduct a reliable extrapolation model as well as a relatively short period of the observation of the life cycle of animals contribute to a detailed analysis of the results and their further implementation in clinical practice. Thus, the study of the chronology of degenerative-destructive and inflammatory reactions in rats with experimental stroke appears to be important.

Purpose

To study the chronology of destructive-degenerative and inflammatory processes in Wistar rats with experimental stroke.

Material and methods of research

The material for the study were three-month-old male Wistar rats of the control (n=84) and experimental (modeled cerebral embolic ischemic stroke; n=84) groups. Modeling of a stroke took place in strict accordance with the established pattern-algorithm [1]. The animals were housed in standard metal cages with dry sawdust (pine, birch) litter, under standard conditions of vivarium climate control (t=18–24° C, humidity 50–70%, luminance 60 lx). Extruded feed and water were given ad libitum 30–32 g, 2 times a day. Rats were taken out of the experiment by an overdose of ketamine anesthesia (according to the European Convention for the Protection of vertebral animals used for experimental purposes, Strasbourg, 1986). Slices of the brain and its vessels (size 0.5 cu. cm) of control and experimental males were researched post mortem. For this purpose, the slices were fixed in 12 % solution of formalin on phosphate buffer (pH=7,0–7,2), with t⁰=18–20°C, dehydrated with alcohols of increasing concentration and embedded in paraffin/celloidin. From the blocks, cuts were made 10–15 microns thick (microtome MK-25, Russia); the latter were dyed with hema-

* To cite this English version: Kolesnyk V. V. Chronology of destructive and degenerative inflammation processes in Wistar rats with experimental brain stroke - // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 28 -31.

toxylin and eosin, and impregnated with nitrogen acid silver. Histological studies were performed in the traditional way, on the stage-by-stage basis (on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 17 th, 21st and 28th day of the experiment). For microscopic analysis of the material, light-optical system of Lieca microscope (Germany) was used: x 300; x 600.

Results and discussion

Morphological study of the brain specimens of the rats from the control group demonstrated the integrity of its cyto- and myeloarchitectonics. The microstructure of the cortex and subcortical centers is pronounced, layered structure undamaged. Vessels show no defects, hemorrhage, or paravascular edema. In general, the structure of the examined sample of the specimens met the indicators of gender and age norms for animals of the corresponding laboratory line.

The results of the morphological analysis of sectioned material taken from the animals of the experimental group with modeled ischemic stroke showed the presence of disorders characteristic for ischemic disease. The latter being of phase character were dependent on the nature and timing of the debut of the stroke process, depth and area of damage. Due to the above mentioned, observation was performed sequentially, based on critical periods of development of signs of ischemia and its natural non-medication removal.

In histological specimens obtained from the animals from a group of modelled ischemic stroke, areas of necrosis were observed (the first day of the observation) distributed on the cortex of the cerebral hemispheres. Areas of tissue located next to the injuries contained leukocyte infiltrates and appeared more contrasting. One of the most distinctive diagnostic criteria of ischemic stroke were heart attacks, which in their structure meet the typical focal necroses of the brain. Development of ischemia and the associated disorder trophic processes led to the destruction of the cortex with formation of a network structure of the brain. It remained intact during the first day of the post-stroke period, gradually replaced by fully developed destruction areas in course of further observation. The areas held the remains of the cell pool of the destroyed neurocytes. Their nuclei were characterized by homogeneity and hyperchromy, as well as a tendency to repeat the cell shape (elongated, sharp). Analysis of individual specimens of rat brains, however, did not provide opportunity for histological registration of total necrosis, generalization areas of "softening" foci, and formation of full-scale scar. Against this background, the death of neurocytes cortex (phase of partial necrosis) was discovered by microscopy. Attention was paid to changes in the endothelium of blood vessels, which were related to the endothelium's heterogeneity and its capacity of desquamation under the conditions of postnatal ontogeny [7]. These phenomena provoked further intensive migration of leukocytes, "melting" of necrotized tissue, "softening" of the structures in damaged areas. These processes have added their contribution to the pathogenesis of ischemic disorder that developed against the backdrop of massive embolism. In micrographs, the light gray substance of the emboli, placing themselves along the damaged inner layer of the wall, filled the vessel outlet completely, increased it, and pressed on surrounding structures. Over time, in the surveyed areas defects of wall layers devel-

oped, accompanied by inflammation and swelling. The latter may have contributed to vascular isolation and future development of tissue hypoxia. These facts led to the emergence of additional reasons to strengthen the structural changes in the vascular wall. The latter, of course, contributed to the development of ischemia [10, 11].

On the third day of the experiment, the increasing infiltration of various cellular elements, mainly lymphocytes, a small number of macrophages and eosinophils was detected. Necrotic foci, fully formed, were distributed in nature. Erythrocytes were distributed into typical groups according to the intensity of diapedesis into the parabasal space (hemorrhagic component). The first and most typical group consisted of white infarctions distributed as gray and white matter of mainly temporal and parietal areas and external capsule. Microscopically, the tissue formation at the site of the latter's formation appeared crumbly, fragile, friable, with pale, almost transparent coloration (hematoxylin-eosin). The other group consisted of mixed type infarctions, numerically small, diagnosed only on some histological specimens. The so-called red hemorrhagic infarctions were registered in certain areas (close to the microvessels, capillaries and their branches) of gray matter of the brain. They differ by a tendency to generalization and formation of large foci. In the abovementioned areas, diapedesis of erythrocyte cells into the parabasal space, edema, necrobiotic changes in glial components, and ischemia were diagnosed [7]. Endothelial cells were characterized by signs of nuclear hyperchromy, the shift of the nucleus towards one of the poles of the cell, the appearance of heterochromatin. Unlike the specimens from the control group, the contacts between cells in the vessels of the animals of the experimental group were attenuated, with cracks formed in the surface layer [5]. The perivascular edema which occurred as a result of hypersensitivity led to certain isolation of individual vessels from surrounding tissue with subsequent development of tissue hypoxia. Thus, the additional reasons were formed that worsened the structure of the vascular wall [10]. In the vicinity of the damaged area, concentration of thrombocyte plates and individual megakaryocytes with signs of sequestration was detected. In the medium to long observation range, notable destructive-degenerative changes in the vessel walls and desquamation of the surface layer cell were registered. In some specimens, angiospasm, stasis and the consequent pronounced perivascular edema were detected. The substance of brain edema in the centers subjected to pronounced necrosis (from local areas with clearly marked boundary to fragments with signs of generalization). It is obvious that these facts led to the development of the clinical picture hypoxia and marked acidosis in rats. It is possible that the recorded pathogenetic picture of ischemic stroke contributed to the cerebral vascular insufficiency, which is reinforced by blocking of cerebral blood flow [9]. Changes in adhesive properties of erythrocytes and possible changes in the blood coagulation system led to the emergence of microthrombs (Fig. 1) in vessels, contributing to violation of the surrounding tissue's trophics and development of microbiotic processes.

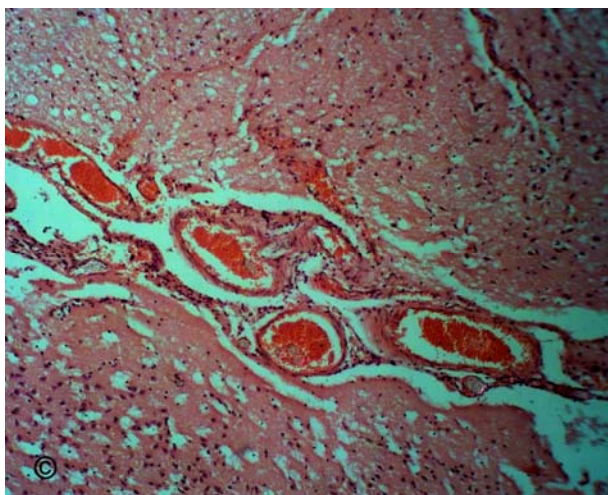


Fig. 1. Red thrombuses of brain microvessels in Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 3rd day of observation). Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

One of the most striking examples was cerebral vascular thromboses of the vertebral-basilar basin, parietal front corner, subcortical sites of the right hemisphere. Occlusion of major vessels created conditions for further (day 7 of the observation) tissue damage of the cerebral hemispheres. The above observation period was marked by the appearance of astrocytes and their proliferating forms. A week after the modeled stroke, the formation of a large area of the necrotic focus softening was observed. In the border area of necrosis in the cortex, numerous accumulations of leukocytes (leukocyte shaft) were recorded. In some areas between the necrotic focus and neighboring area, a structured limit started taking shape. Activation of astrocytes was recorded between the site of the necrosis and nervous tissue. The cells were located at some distance from each other, without a clear arrangement. On the verge of tissue relatively intact to ischemic disorders and injuries a large number of vessels of different diameters was noted. Around the latter, there were foci of inflammation — infiltrative events (neutrophils) which proliferated in the zones of localization of almond-shaped and caudate nuclei. In some cases, thromboses and defects in the layers of vessel walls were observed while paravasal hemorrhages (Fig. 2) were not established. The above study period was marked by the beginning of the process of active formation of collagen fibers, which in turn contributed to appearance of small in size gliomezodermal damage zones and conjunctive tissue scars and cysts, subject to the availability of large areas of destruction. Modeled ischemic strokes that were observed in the mentioned period, accompanied by the development of a number of vascular responses. First of all, they were connected with the phenomenon of deformation of cells that form the layers of the vessel wall. On the other hand, the major role was played by changes in the surface architectonics of erythrocytes as cells of a circulating link of the hematopoiesis system. At the heart of each of the cases lay physicochemical reorganization of membrane lipids, proteins, and the connected electrical properties, as ion penetration of the cell membrane.

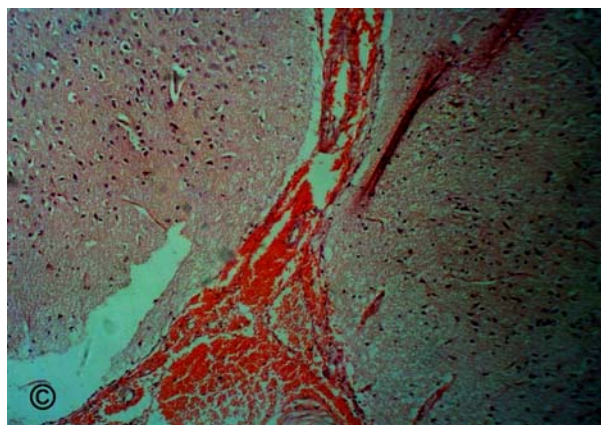


Fig. 2. Right cerebral hemisphere in male Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 7th day of observation). Red thrombuses of brain microvessels, paravasal hemorrhages. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

On day 14 of the observation, the cerebral cortex's cleaning of the necrotic masses was seen throughout the whole damaged area. During this period, signs of inflammation reactions (Fig. 3) were still observed (infiltration in most cases by neutrophils and macrophages). In the former foci of necrosis, full-sized liquor-glial cysts were observed. Between areas of damaged and intact tissue, formation of glial scar continued. The latter was formed with multiple layers of astrocytes. In the case of appearance of bulk areas of necrosis, when the pathological process concerned not only the cerebral cortex but also subcortical structures, the appearance of a large number of capillaries, conjunctive tissue and glial cells on the border of the damaged area was observed. That is, in terms of mass lesions, mixed glial and conjunctive tissue scar was formed. In the areas neighboring with the ischemic zone, just as in the cases recorded in the early stages, numerically small, diffusely scattered and damaged neurocytes were detected. In the zones located next to the areas of necrosis, damaged cortex structure and, in some cases, lack of the first and second layers were observed. Search for the areas with signs of cell proliferation did not bring any results.

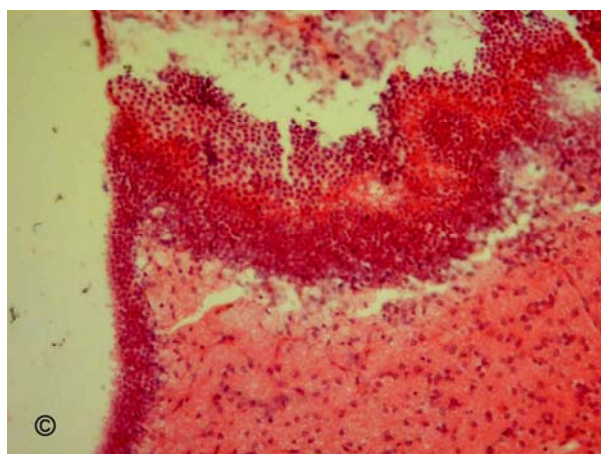


Fig. 3. Right cerebral hemisphere in male Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 14th day of observation). The widespread focal points of infiltration. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

On day 17 of the observation, changes in the structure of the cerebral hemispheres of rats with modeled ischemic stroke resembled injuries reported in the previ-

ous study periods (day 14). Microscopically, the last few differed among themselves. Formation of glial scar continued. In the former foci of necrosis, full-sized liquor-glial cysts were observed. Microvessels of the cerebral hemispheres were characterized by a clear structure and absence of gross defects in walls (Fig. 4). The processes of elimination of the cellular detritus continued, gradually attaining their final stage. No facts of cell proliferation were established.



Fig. 4. Cerebral hemisphere in male Wistar rat aged 3 months (the group of animals with simulated ischemic stroke, the 17th day of observation). Lumen of microvessels. Staining: hematoxylin-eosin. Magnification: x 300.

Three weeks later (21st day of the observation), the morphological pattern of changes in the cerebral hemispheres of rats was limited to total distribution and completion of the processes of purification from necrotic masses. During this period, some areas still showed infiltration of the damaged areas of the brain by neutrophils and macrophages; however, these events were isolated in nature. In areas of necrotic foci, liquor-glial cysts were observed. The formation of the latter was in its final phase (their fragments were completely covered with coating formed mostly by glial cells). Between the injured and undamaged tissues of the brain, a glial scar remained. The newly formed scar absorbed astrocytes were located in layers sequentially (three to four layers). As in the previous observation period (day 14) under conditions of large, deep injuries (when destruction concerned subcortical centers), the development of capillaries occurred at the border of the injuries. Next to them, glial and connective tissue cells concentrated, forming a glial and connective tissue scar. At the boundary of the ischemic zone, as in previous periods, diffuse dispersal of damaged forms of neurocytes was observed. In the areas of the cortex close to the former zones of necrosis, certain violations of the latter's layered structure were noted. Microvessels in histological specimens had the appearance of complete structures.

On the fourth week (28th day of the observation) the process of cleaning fabrics from cellular detritus was fully completed. At the local foci of necrosis, glio-conjunctive scars and fully developed liquor cysts were observed. A highlight of the observation period was discovering the

characteristic features of the structure next to the damaged zone areas, where the vast majority of neurons appeared intact. In areas not contiguous with the former zone of necrosis, isolated hyperchromic intact neurons were recorded.

Conclusions: the development of ischemic stroke in linear rats was characteristic of distinct chronobiologism (days 1–28 of the experiment), which was clearly dependent on the timing of the prescription process, accompanied by degeneration of neurocytes, their processes, damage to cytoplasmic elements and the structure of the nucleus. Amid these changes proliferative and infiltrative reactions developed actively.

Prospects for future research are to explore the chronobiological patterns of development of experimental cerebral ischemic (embolic) stroke in male Wistar rats and the subsequent implementation of the results into clinical practice.

References

1. Toryanik I.I. Unifizirovannyi pochood k sozdaniyu modeli ishemicheskogo insulta golovnogo mozga v eksperimente na kryсах linii Vistar / I.I. Toryanik, V.V. Kolesnik // Aktual'ni problemi suchasnoi meditsini. - 2010. - № 4. - S. 155-159.
2. American Heart Association [American Heart Association / Heart Disease and Stroke Statistics] [Electronic resource]. — Update, Dallas TX, 2007. — P. 36—41. <http://www.americanheart.org/statistics>
3. Andriessen, T. M. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury / T. M. Andriessen, B. Jacobs, P. E. Vos // J. Cell. Mol. Med. — 2010. — Vol. 14. — No. 10. — P. 2381—2392.
4. Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells / T. Mimura, M. Dezawa, H. Kanno, I. Yamamoto // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. — 2005. — Vol. 64, Issue 12. — P. 1108—1117.
5. Bell, R. D.; Winkler, E. A.; Sagare, A. P. [et al.] Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype on the adult brain and during brain aging // Neuron. — 2010. — Vol. 68. — P. 409—427.
6. Durukan, A. Ischemic Stroke in Mice and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. — 2009. — Vol. 573. — P. 95—114.
7. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change / G. Tyson, G. Teasdale, D. Graham, J. McCulloch // Ann. Neurol. — 2004. — Vol. 15. — P. 559—567.
8. Hossniann, K. A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke / K. A. Hossmann // Cellular and Molecular Neurobiology. — 2006. — Vol. 26, Issue 7—8. — P. 1057—1083.
9. Mohr J. M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / J. M. Mohr, D.W. Choi, J. C. Grotta. — Philadelphia: Livingstone, 2004. — 1616 p.
10. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats / Y. Taguchi, S. Takashima, E. Sasahara // Archives of Histology and Cytology. — 2004. — Vol. 67. — No. 3. — P. 253—261.
11. Wahtgren N. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the safe implementation of thrombolysis in stroke-monitoring study (SITS-MOST): an observational study // N. Wahtgren, N. Ahmed, A. Davalos // The Lancet Neurology. — 2007. — Vol. 369. — P. 275.

Матеріал надійшов до редакції 2.12.2013

© Багмут И. Ю.*, Жуков В. И., Зайцева О. В., Книгавко В. Г.
УДК 614.777:543.39:547.42

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИОННОГО ОБМЕНА В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ОЛИГОЭФИРОВ В ПОДОСТРОМ ОПЫТЕ*

Багмут И. Ю.*, Жуков В. И., Зайцева О. В., Книгавко В. Г.

*Харьковская медицинская академия последипломного образования, г.Харьков

Харьковский национальный медицинский университет, г.Харьков

Рівні мікро- і макроелементів в органах і тканинах виступають інформативними показниками оцінки змін, що відбуваються в організмі тварин та людини під дією чужорідних хімічних речовин. Проведено дослідження підгострої дії олігоєфірів Л-501-2-100, Л-1601-2-50«Б» і Л-1601-2-50«Р» дозою 1/10 DL50 на обмін іонів металів (калій, натрій, залізо, мідь, цинк, магній, кальцій, марганець, фосфор) у сироватці крові, печінці, сім'яниках білих щурів атомно-абсорбційним методом. Виявлено збільшення вмісту іонів магнію, цинку, міді, заліза, фосфору, марганцю, калію у сироватці та значне зменшення їх рівнів у внутрішніх органах, що може указувати на виведення їх із організму. Такий дисбаланс в іонному обміні, очевидно, пов'язаний зі структурно-метаболічними порушеннями, що обумовлені розвитком дистрофічних та деструктивних процесів. Іони металів виходять із клітини, внутрішньоклітинних структурно-функціональних одиниць і поступають у міжклітинний простір та кров. За таких умов можливо очікувати виникнення порушень тканинного дихання та окислювального фосфорилування, розвиток гіпоксичних процесів, а також порушень енергетичних і метаболічних синтезів. Все це свідчить про зрив адаптаційних механізмів забезпечення гомеостатичної функції організму, ведуча роль у яких належить центральній нервовій системі і гіпофізарно-наднирниковій системі.

Ключові слова: ксенобіотики (олігоєфіри), обмін іонів металів, білі щури, підгострий дослід.

Вступление

По мнению многих исследователей, достаточно информативными показателями оценки изменений, происходящих в организме животных и человека под воздействием чужеродных химических веществ, являются содержания микро- и макроэлементов [3,6,8]. Как дефицит ионов металлов, так и избыточное поступление в организм приводит к нарушению обменных процессов и может явиться причиной развития патологических состояний. Вхождение их в основные биохимические метаболические системы (ферменты, гормоны, витамины, рецепторы, нуклеиновые кислоты, рибосомы) определяет их исключительную роль в обеспечении различных физиологических и биохимических процессов – оплодотворения, митоза, созревания, перехода от пролиферации к состоянию покоя, транспорта аминокислот через мембраны, проведение нервного импульса и др. [1,4,7]. В проводимом нами исследовании полисистемной характеристики потенциальной опасности синтезированных новых марок олигоэфиров на основе раскрытия патофизиологических механизмов развития структурно-метаболических нарушений в организме в условиях подострой токсификации динамика показателей ионного обмена представляет определенный научный и практический интерес. Изучаемые олигоэфиры применяются для получения пластмасс, пенопластов, термопластов, эпоксидных смол, лаков, эмалей, тормозных, гидравлических и охлаждающих жидкостей и др. [3].

Учитывая вышесказанное, целью работы являлось исследование влияния олигоэфиров в подост-

ром опыте на обмен ионов металлов в органах и тканях экспериментальных животных.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы образцы олигоэфиров с регламентированными свойствами марок: Л-501-2-100 (ацетали монометилового эфира полиоксипропиленгликоля), Л-1601-2-50«Б» (бутилаллиловый эфир полиоксипропиленоксипропиленгликоля) и Л-1601-2-50«Р» (ацетали монобутилового эфира полиоксипропиленоксипропиленгликоля). Программа исследования предусматривала проведение подострого опыта на белых крысах и определение содержания в органах и тканях ионов калия, натрия, железа, меди, цинка, магния, кальция, марганца, фосфора. Эксперименты были поставлены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 0,18-0,20 кг, которые ежедневно на протяжении 45 суток подвергались пероральному воздействию олигоэфиров в дозе 1/10 DL50, что составляло 3,46; 3,85 и 5,17 г/кг массы животного соответственно для Л-501-2-100, Л-1601-2-50«Б» и Л-1601-2-50«Р». Вещества в виде водных растворов вводились внутрижелудочно с помощью металлического зонда ежедневно утром натощак. Контрольная группа получала соответствующие объемы питьевой воды. Было создано три опытных и одну контрольную группу, по 10 крыс в каждой группе. Животные содержались в стационарных условиях вивария при постоянной температуре и естественном освещении. Забой крыс проводили путем декапитации с предварительной анестезией тиопенталом натрия. Проведение процедур с экспериментальными животными осуществлялось в соответствии с требованиями

* Цитування при атестації кадрів: Багмут И. Ю.*, Жуков В. И., Зайцева О. В., Книгавко В. Г. Динамика показателей ионного обмена в организме крыс под влиянием олигоэфиров в подостром опыте // Проблемы экологии і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 32 –34

ми биоэтики и принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Обмен ионов металлов изучали атомно-абсорбционным методом [2]. Для проведения анализа органы и ткани подвергались предварительному озоленю и экстрагированию по Е.А. Лойко [5] и Г.О. Бабенко [2]. Полученный экстракт подавался в прибор, и определялось содержание ионов, результаты сравнивались с эталонными образцами. Статистическая обработка полученных результатов исследования выполнялась с использованием методов вариационной статистики и оценкой достоверности отличий по t-критерию Стьюдента-Фишера.

Результаты и их обсуждение

Исследования обнаружили, что олигоэфиры изучаемых марок в дозе 1/10 DL50 в сыворотке крови приводят к увеличению содержания ионов калия, кальция, магния, меди, цинка, железа, фосфора, марганца и снижению концентрации натрия (табл. 1). Так, уровень калия повышался на – 76,77%; 74,22% и 82,16%, кальция – 42,39%; 45,68% и 52,27%, магния – 106,37%; 120,91% и 132,73%, меди – 65,48%; 57,74% и 76,55%, цинка – 81,16%; 91,24% и 76,03%, железа – 130,81%; 141,98% и 115,51%, фосфора – 94,92%; 104,52% и 134,47%, марганца – 72,85%; 93,15% и 109,91%, на фоне снижения уровня натрия на 14,31%; 17,66% и 21,36%, соответственно при воздействии Л-501-2-100, Л-1601-2-50 «Б» и Л-1601-2-50 «Р» по сравнению с показателями контрольной группы.

Таблица 1

Динамика содержания ионов металлов в сыворотке крови крыс при подостром воздействии олигоэфиров в дозе 1/10 DL50

Показатели	Группа наблюдения М±m			
	Контроль	Л – 501-2-100	Л – 1601-2-50 «Б»	Л – 1601-2-50 «Р»
Калий (ммоль/л)	3,53±0,42	6,24±0,57*	6,15±0,35*	6,43±0,53*
Натрий(ммоль/л)	140,4±5,76	120,3±4,80*	115,6±5,10*	110,4±3,75*
Кальций(ммоль/л)	2,43±0,17	3,46±0,28*	3,54±0,39*	3,70±0,48*
Магний(ммоль/л)	1,10±0,16	2,27±0,19*	2,43±0,25*	2,56±0,33*
Медь(мкмоль/л)	16,8±1,44	27,8±1,32*	26,5±1,47*	29,66±1,74*
Цинк(мкмоль/л)	17,35±1,67	31,43±2,55*	33,18±1,76*	30,54±2,10*
Железо(мкмоль/л)	18,44±1,52	42,56±3,17*	44,62±3,80*	39,74±2,75*
Фосфор(ммоль/л)	1,77±0,19	3,45±0,37*	3,62±0,29*	4,15±0,32*
Марганец(мкмоль/л)	16,35±1,24	28,26±1,94*	31,58±2,63*	34,32±2,76*

Примечание: * – различия с контролем достоверные, $p < 0,05$.

Анализ оценки ионного обмена в печени выявил снижение концентрации калия, натрия, магния, цинка, меди, железа, фосфора, марганца на фоне повышения концентрации кальция (табл. 2). По сравнению с данными контрольной группы уровень калия в печени снижался на 39,29%; 41,30% и 37,51%, натрия – 29,32%; 25,08% и 28,52%, магния – 37,01%; 42,68% и 39,55%, цинка – 27,33%, 33,74% и 36,78%, меди -

26,13%; 31,81% и 39,77%, железа – 35,93%, 42,18% и 48,43%, фосфора – 36,62%; 38,71% и 47,71%, марганца – 40,61%; 45,59% и 50,95%, уровень кальция повышался на 78,53%; 87,12% и 103,38%, соответственно под влиянием Л-501-2-100, Л-1601-2-50 «Б» и Л-1601-2-50 «Р», по сравнению с данными референтной группы.

Таблица 2

Динамика содержания ионов металлов в печени крыс при подостром воздействии олигоэфиров в дозе 1/10 DL50

Показатели	Группа наблюдения М±m			
	Контроль	Л – 501-2-100	Л – 1601-2-50 «Б»	Л – 1601-2-50 «Р»
Калий (мг/100 г ткани)	8,45±0,32	5,13±0,36*	4,96±0,42*	5,28±0,47*
Натрий (мг/100 г ткани)	8,73±0,46	6,17±0,32*	6,54±0,53*	6,24±0,46*
Кальций (мг/100 г ткани)	3,26±0,25	5,82±0,49*	6,10±0,55*	6,63±0,57*
Магний (мг/100 г ткани)	6,70±0,38	4,16±0,35*	3,84±0,31*	4,05±0,24*
Цинк (мг/100 г ткани)	9,84±0,57	7,15±0,63*	6,52±0,49*	6,22±0,38*
Медь (мг/100 г ткани)	0,88±0,07	0,65±0,04*	0,60±0,05*	0,53±0,04*
Железо (мг/100 г ткани)	1,28±0,09	0,82±0,03*	0,74±0,05*	0,66±0,06*
Фосфор (мг/100 г ткани)	4,15±0,24	2,63±0,18*	2,56±0,22*	2,17±0,17*
Марганец (мг/100 г ткани)	5,22±0,46	3,10±0,27*	2,84±0,33	2,56±0,22*

Примечание: * – различия с контролем достоверные, $p < 0,05$.

Изучение обмена ионов металлов в семенниках выявило снижение содержания калия на 16,58%; 19,51% и 24,39%, натрия – 23,97%; 25,54% и 33,65%, магния – 17,95%; 20,17% и 22,36%, цинка - 62%; 60,34% и 63,79%, меди – 20,92%; 21,79% и 41,02%, железа – 48,03%; 43,30% и 50%, фосфора – 48,79%; 52,78% и 56,49%, марганца – 27,35%; 31,18% и 16,23% и увеличение содержания кальция на 38,26%;

33,34% и 40,09%, соответственно под влиянием Л-501-2-100, Л-1601-2-50 «Б» и Л-1601-2-50 «Р» (табл. 3). Исследования показывают, что олигоэфиры в основном увеличивают содержание ионов металлов в сыворотке крови, тогда как во внутренних органах они в большинстве случаев значительно снижают уровни исследуемых ионов.

Таблица 3

Динамика содержания ионов металлов в семенниках крыс при подостром воздействии олигоэфи́ров в дозе 1/10 DL50

Показатели	Группа наблюдения М±m			
	Контроль	Л – 501-2-100	Л – 1601-2-50 «Б»	Л – 1601-2-50 «Р»
Калий (мг/100 г ткани)	4,10±0,23	3,42±0,18*	3,30±0,20*	3,10±0,26*
Натрий(мг/100 г ткани)	8,26±0,35	6,28±0,43*	6,15±0,34*	5,48±0,42*
Кальций(мг/100 г ткани)	1,83±0,12	2,53±0,16*	2,44±0,21*	2,58±0,27*
Магний(мг/100 г ткани)	6,35±0,38	5,21±0,26*	5,05±0,18*	4,93±0,36*
Цинк(мг/100 г ткани)	5,80±0,27	2,16±0,18*	2,30±0,22 *	2,10±0,14*
Медь (мг/100 г ткани)	0,88±0,06	0,57±0,04*	0,61±0,03*	0,46±0,04*
Железо (мг/100 г ткани)	2,54±0,26	1,32±0,14*	1,44±0,16*	1,27±0,13*
Фосфор (мг/100 г ткани)	8,62±0,69	4,23±0,28*	4,07±0,32*	3,75±0,24*
Марганец (мг/100 г ткани)	5,74±0,46	4,17±0,23*	3,95±0,18*	3,66±0,22*

Примечание: * – различия с контролем достоверные, $p < 0,05$.

Обобщая полученные результаты исследования обмена ионов в органах и тканях животных, подвергавшихся подострому воздействию олигоэфи́ров в дозе 1/10 DL50, можно сказать, что концентрация калия повышалась в сыворотке крови и снижалась в печени и семенниках. Уровни натрия снижались в сыворотке крови, печени и семенниках, что позволяет судить о развитии натрийурии. Содержание ионов кальция было увеличенным в сыворотке, печени и семенниках. Уровни ионов магния, цинка, меди, железа, фосфора, марганца возрастали в сыворотке крови и уменьшались в печени, семенниках. Такая динамика ионов металлов может свидетельствовать о выведении их из организма [3,6].

Известно, что регуляция микро- и макроэлементного обмена в организме осуществляется как нервной системой, так и железами внутренней секреции. Большинство авторов считают, что основным регуляторным механизмом обмена микроэлементов в организме является система гипофиз-кора надпочечников, функциональное состояние которой теснейшим образом зависит и связано с деятельностью центральной нервной системы. Именно эти системы в наибольшей мере подвержены изменениям при условии формирования патологических состояний [6-8]. В связи с этим, можно судить, что дисбаланс ионов металлов в различных органах и тканях в условиях токсификации олигоэфи́рами сопряжен с нарушением кооперативного взаимодействия ЦНС и гипофизарно-надпочечниковой системы.

Выводы

Установленная динамика обмена микро- и макроэлементов в организме экспериментальных животных, подвергавшихся подострому воздействию олигоэфи́ров, может быть связана со структурно-метаболическими нарушениями, обусловленными развитием дистрофических и деструктивных процессов. Ионы металлов выходят из клетки, внутриклеточных структурно-функциональных единиц и посту-

пают в межклеточное пространство и кровь. В этих условиях следует ожидать появления нарушений тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, развития гипоксических процессов, а также нарушений энергетических и метаболических синтезов, что свидетельствует о срыве адаптационных и защитно-приспособительных механизмов обеспечения гомеостатической функции организма, ведущая роль в которых принадлежит ЦНС и гипофизарно-надпочечниковой системе.

Литература

1. Акопова А.В. Обратимость энергозависимого накопления кальция в митохондриях. // Укр. Биох. Журн. – 2008. – Т. 80, № 2. – С. 82-89.
2. Бабенко Г.О. Визначення мікроелементів і металоперментів у клінічних лабораторіях. – К: Здоров'я. – 1968. – 136 с.
3. Жуков В.И., Попова Л.Д., Зайцева О.В. и др. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов. – Харьков: «Торнадо», 2000. – 435 с.
4. Иежица И.Н., Спасов А.А., Калий-магниевый гомеостаз: физиология, патофизиология, клинические последствия дефицита и особенности фармакологической коррекции. // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39, № 1. – С. 23-41.
5. Лойко Е.А. Спектрохимическое определение микроэлементов в сыворотке и моче. // Лаб. дело. – 1967. – № 7. – С. 403-406.
6. Мухин Н.А., Козловская Л.В., Барашков Г.К. и др. Клиническое значение дисбаланса микроэлементов. // Микроэлементы в медицине. – 2005. – Т.6, – Вып. 1. – С. 42-45.
7. Протасова О.В., Максимова И.А., Ботвин М.А. и др. Исследование взаимосвязи между дисбалансом содержания макро- и микроэлементов в организме и развитием морфологических дезинтеграций в биологических жидкостях и тканях. // Физиология человека. – 2007. – Т. 33, №2. – С. 104-109.
8. Скальный А.В., Рудаков И. А. Биоэлементы в медицине. – М.: ОНИКС 21 век, изд-во «Мир». – 2004. – 216 с.

English version: DYNAMICS OF THE IONIC METABOLISM INDICES IN RATS UNDER OLIGOETHERS INFLUENCE AT SUBACUTE EXPERIMENT*

Bagmut I.Yu*, Zhukov V.I., Zaitseva O.V., Knigavko V.G.

* Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

In the organs and tissues micro- and macroelements levels there are informatic indices of the changes that are in animals and men under stranger chemical compounds effect. The subacute effect of the oligoethers L-501-2-100, L-1601-2-50 "B" and L-1601-2-50 "R" in 1/10 DL50 dose on the ionic metabolism (potassium, sodium, iron, copper, magnesium, zinc, calcium, manganese, phosphorus) was investigated in blood serum, liver, testes of the white rats by atomic-absorption method. It was determined that increasing ionic contents of magnesium, zinc, copper, iron, phosphorus, manganese, potassium in blood serum and decreasing their levels in the internal organs that shows their withdrawal from organism. Such imbalance in ionic metabolism apparently is linked with structural-metabolic disorders, that are due to the development of the dystrophic and destructive processes. Metal ions leave cells, intracellular structural-functional units and enter the intercell space and blood. In these conditions we can expect the appearance of tissue respiration disorders and oxidative phosphorylation, the development of the hypoxia processes as well as disorders of the energetic and metabolic synthesis. That is evidence of the adaptive mechanisms frustration of the organism homeostatic function provision in which the central nervous system and hypophysis-adrenal system are main.

Key words: xenobiotics (oligoethers), ionic metabolism, albino rats, toxicological experiment.

Introduction

According to many researchers, quite informative indices in estimate of processes changes occurring in animals and humans under the influence of alien chemicals are the micro- and macro- elements content [3, 6, 8]. Both deficit of metal ions and their surplus content in organism leads to metabolic disorders and may cause the development of pathological states. Their entry into basic biochemical metabolic systems (enzymes, hormones, vitamins, receptors, nucleic acids, ribosomes), determines their crucial role in providing various physiological and biochemical processes – fertilization, mitotic, maturing, transition from proliferation to a state of rest, amino acid transport across the membrane, nerve impulse carrying out, etc. [1,4,7]. In our work we studied the polysystemic characteristic of potential hazard of the new synthesized oligoethers on the basis of the pathophysiological mechanisms disclosure of the structural and metabolic disorders in the organism under subacute toxification. In this case the dynamics of ionic metabolism has a certain scientific and practical interest. Studied oligoethers are used for produce of plastics, foams, thermoplastics, epoxy resins, lacquers, enamels, brake, and hydraulic fluids, etc. [3].

Given the above, **the purpose of the work** was to study the oligoethers influence on the ionic metabolism in the animals organs and tissues in subacute experience.

Materials and methods

In the work we used oligoethers with regulated properties: L-501-2-100 (polyoxyethyleneglycol monomethyl ether acetals), L-1601-2-50 "B" (butylalilic ether of polyoxypropilenoxyethyleneglycol), and L-1601-2-50 "R" (polyoxypropilenoxyethylene monobutyl ether acetals). The research program included a subacute experiment on white rats and determination of the content in the organs and tissues of potassium, sodium, iron, copper, zinc, magnesium, calcium, manganese and phosphorus. In experiments there were adult male rats

Wistar weighting 0.18-0.20 kg, which every day for 45 days were subjected to oral exposure dose oligoethers in 1/10 DL50, which amounted to 3.46, 3.85 and 5.17 g / kg of animal body weight, respectively, for L-501-2-100, L-1601-2-50 "B" and L-1601-2-50 "R". The substances in the form of aqueous solutions were introduced intragastrically using a metal probe daily in the morning on an empty stomach. The control group received the appropriate volume of drinking water. It was created by three experimental and one control group of 10 rats in each group. The animals were kept in stationary vivarium conditions at a constant temperature and natural lighting. Slaughtering rats was carried out the decapitation with a pre-anesthetic by the thiopental sodium. Performing procedures with experimental animals was carried out in accordance with the principles of bioethics and the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1986). Ionic metabolism was studied by atomic absorption method [2]. For analysis the organs and tissues preliminary were limed and extracted by E.A. Лойко [5] and Г.О. Бабенко [2]. The resulting extract was applied to the device, and ion content was determined and the results compared with the reference samples. Analysis were performed using SPSS statistical software (SPSS for Windows Ver.11.5). Results of different groups were compared using descriptive statistics (mean±SD). $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results and discussion

In researches we revealed that oligoethers at a dose of 1/10 DL50 in **serum** lead to increased levels of potassium ions, calcium, magnesium, copper, zinc, iron, phosphorus, manganese and to decreased sodium concentration (Table 1). Thus, the potassium level increased to - 76.77 %; 74.22 % and 82.16 %, calcium - 42.39 %; 45.68 % and 52.27 %, magnesium - 106.37 %; 120.91 % and 132.73 %, copper - 65.48 %; 57.74 % and 76.55 %, zinc - 81.16 %, 91.24 % and 76.03 %, iron -

* To cite this English version: Bagmut I.Yu, Zhukov V.I., Zaitseva O.V., Knigavko V.G. Dynamics of the ionic metabolism indices in rats under oligoethers influence at subacute experiment - // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 35 -37.

130.81 %; 141.98 % and 115.51 %, phosphorus - 94.92 %; 104.52 % and 134.47 %, manganese - 72.85 %, 93.15 % and 109.91 %, against a background of the lowering sodium levels on 14.31 %; 17.66 % and 21.36

%, respectively, under L-501-2-100, L-1601-2-50 "B" and L-1601-2-50 "R" effects as compared with the control group.

Table 1
Dynamics of metal ions content in rats blood serum under subacute oligoethers exposure dose in 1/10 DL50

Indices	Monitoring Group, M±m			
	control	L – 501-2-100	L – 1601-2-50 «B»	L – 1601-2-50 «R»
Potassium (mmol / L)	3,53±0,42	6,24±0,57*	6,15±0,35*	6,43±0,53*
Sodium (mmol / L)	140,4±5,76	120,3±4,80*	115,6±5,10*	110,4±3,75*
Calcium (mmol / L)	2,43±0,17	3,46±0,28*	3,54±0,39*	3,70±0,48*
Magnesium (mmol / L)	1,10±0,16	2,27±0,19*	2,43±0,25*	2,56±0,33*
Copper (umol / L)	16,8±1,44	27,8±1,32*	26,5±1,47*	29,66±1,74*
Zinc (umol / L)	17,35±1,67	31,43±2,55*	33,18±1,76*	30,54±2,10*
Iron (umol / L)	18,44±1,52	42,56±3,17*	44,62±3,80*	39,74±2,75*
Phosphorus (mmol / L)	1,77±0,19	3,45±0,37*	3,62±0,29*	4,15±0,32*
Manganese (umol / L)	16,35±1,24	28,26±1,94*	31,58±2,63*	34,32±2,76*

Note: * - reliable differences with control, $p < 0.05$.

Ionic metabolism in **liver** showed a reduction of potassium, sodium, magnesium, zinc, copper, iron, phosphorus, manganese levels and raising calcium concentration (Table 2). As compared to the control group the level of potassium in the liver decreased on 39.29 %; 41.30% and 37.51%, sodium - 29.32 %; 25.08% and 28.52 %, magnesium - 37.01%; 42.68% and 39.55 %, zinc - 27.33%; 33.74% and 36.78 %, copper -

26.13%; 31.81% and 39.77 %, iron - 35.93%; 42.18 % and 48.43 %, phosphorus - 36.62 %; 38.71 % and 47.71 %, manganese - 40.61 %; 45.59% and 50.95 %, calcium levels increased on 78.53%; 87.12 % and 103.38%, respectively, under the L-501-2-100, L-1601-2-50, "B" and L-1601-2-50 "R" influence compared with the data of the reference group.

Table 2
Dynamics of metal ions content in the rats liver under subacute oligoethers exposure dose in 1/10 DL50

Indices	Monitoring Group, M±m			
	Control	L – 501-2-100	L – 1601-2-50 «B»	L – 1601-2-50 «R»
Potassium (mg/100 g tissue)	8,45±0,32	5,13±0,36*	4,96±0,42*	5,28±0,47*
Sodium (mg/100 g tissue)	8,73±0,46	6,17±0,32*	6,54±0,53*	6,24±0,46*
Calcium (mg/100 g tissue)	3,26±0,25	5,82±0,49*	6,10±0,55*	6,63±0,57*
Magnesium (mg/100 g tissue)	6,70±0,38	4,16±0,35*	3,84±0,31*	4,05±0,24*
Copper (mg/100 g tissue)	9,84±0,57	7,15±0,63*	6,52±0,49*	6,22±0,38*
Zinc (mg/100 g tissue)	0,88±0,07	0,65±0,04*	0,60±0,05*	0,53±0,04*
Iron (mg/100 g tissue)	1,28±0,09	0,82±0,03*	0,74±0,05*	0,66±0,06*
Phosphorus (mg/100 g tissue)	4,15±0,24	2,63±0,18*	2,56±0,22*	2,17±0,17*
Manganese (mg/100 g tissue)	5,22±0,46	3,10±0,27*	2,84±0,33	2,56±0,22*

Note: * - reliable differences with control, $p < 0.05$.

Study of the ionic metabolism in the **testes** revealed a decrease in potassium content on 16.58 %; 19.51 % and 24.39 %, sodium - 23.97 %; 25.54 % and 33.65 %, magnesium - 17.95 %; 20.17 % and 22.36 %, zinc - 62 %; 60.34 % and 63.79 %, copper - 20.92 %; 21.79 % and 41.02 %, iron - 48.03 %; 43,30 % and 50 % phosphorus - 48.79 %; 52.78 % and 56.49 %, manganese - 27.35 %;

31.18 % and 16.23 % and increase in the calcium content on 38.26 %; 33.34 % and 40.09 %, respectively, under the influence of L-501-2-100, L- 1601-2-50 "B" and L-1601-2-50 "R" (see Table 3). Studies show that oligoethers generally increase the content of metal ions in the blood serum, whereas in the viscera are in most cases much lower studied ions levels.

Table 3
Dynamics of metal ions content in the testes of rats in subacute oligoethers exposure in dose 1/10 DL50

Indices	Monitoring Group, M±m			
	Control	L – 501-2-100	L – 1601-2-50 «B»	L – 1601-2-50 «R»
Potassium (mg/100 g tissue)	4,10±0,23	3,42±0,18*	3,30±0,20*	3,10±0,26*
Sodium (mg/100 g tissue)	8,26±0,35	6,28±0,43*	6,15±0,34*	5,48±0,42*
Calcium (mg/100 g tissue)	1,83±0,12	2,53±0,16*	2,44±0,21*	2,58±0,27*
Magnesium (mg/100 g tissue)	6,35±0,38	5,21±0,26*	5,05±0,18*	4,93±0,36*
Copper (mg/100 g tissue)	5,80±0,27	2,16±0,18*	2,30±0,22 *	2,10±0,14*
Zinc (mg/100 g tissue)	0,88±0,06	0,57±0,04*	0,61±0,03*	0,46±0,04*
Iron (mg/100 g tissue)	2,54±0,26	1,32±0,14*	1,44±0,16*	1,27±0,13*
Phosphorus (mg/100 g tissue)	8,62±0,69	4,23±0,28*	4,07±0,32*	3,75±0,24*
Manganese (mg/100 g tissue)	5,74±0,46	4,17±0,23*	3,95±0,18*	3,66±0,22*

Note: * - reliable differences with control, $p < 0.05$.

Summarizing the obtained results about ionic metabolism in organs and tissues of animals exposed subacute oligoethers effect at a dose of 1/10 DL50, it can be said that the potassium concentration in the serum was increased and decreased in the liver and testes. Decreased levels of sodium in the blood serum, liver, and testes give an idea about the development of the natriuresis. The calcium content was increased in the serum, liver and testes. The magnesium, zinc, copper, iron, phosphorus, manganese levels were increased in serum and decreased in liver, testes. Such dynamics of metal ions can indicate on their removal from the body [3,6].

It is known that the regulation of micro-and makroelementic metabolism in the body is carried out both the nervous system and the endocrine glands. The most authors consider that the main regulatory mechanism in ionic metabolism is the pituitary- gland-adrenal cortex system, its functional state its strongly connected with the central nervous system activity. Just these systems are the most susceptible to changes under conditions of the pathological states formation [6-8]. In this connection, we can assert that an imbalance of metal ions in different organs and tissues under oligoethers toxification is connected with disorder of the cooperative interaction of the CNS and the pituitary-adrenal system.

Conclusions

Installed ionic metabolism in the experimental animals organism under subacute oligoethers exposure can be associated with structural and metabolic disorders caused by the development of dystrophic and destructive processes. The metal ions come out of the cells, intracellular structural and functional units and income into the extracellular space and the bloodstream. Under these conditions, we should expect violations of tissue

respiration and oxidative phosphorylation, hypoxical processes development, as well as disorders of power and metabolic synthesis, indicating on the failure of the adaptable and protective mechanisms of the organism homeostatic function, in which the leading role belongs to the central nervous system and the pituitary-adrenal system.

References

1. Akopova A.V. Obratimost' energozavisimogo nakopleniya kal'ziya v mitochondriyach. // Ukr. Bioch. Zhurn. – 2008. – T. 80, № 2. – S. 82-89.
2. Babenko G.O. Vznachennya mikroelementiv i metalofermentiv u klinichnich laboratoriyach. – K: Zdorov'ya. – 1968. – 136 s.
3. Zhukov V.I., Popova L.D., Zayzeva O.V. i dr. Prostye i makroziklicheskie efiry: nauchnye osnovy ochrany vodnykh ob'ektov. – Char'kov: «Tornado», 2000. – 435 s.
4. Iezhiza I.N., Spasov A.A., Kaliy-magnievyy gomeostaz: fiziologiya, patofiziologiya, klinicheskie posledstviya defizita i osobennosti farmakologicheskoy korrekzii. // Uspechi fiziologicheskikh nauk. – 2008. – T. 39, № 1. – S. 23-41.
5. Loyko E.A. Spektrochimicheskoe opredelenie mikroelementov v syvorotke i moche. // Lab. delo. – 1967. – № 7. – S. 403-406.
6. Muchin N.A., Kozlovskaya L.V., Barashkov G.K. i dr. Klinicheskoe znachenie disbalansa mikroelementov. // Mikroelementy v medizine. – 2005. – T.6, – Vyp. 1. – S. 42-45.
7. Protasova O.V., Maksimova I.A., Botvin M.A. i dr. Issledovanie vzaimosvyazi mezhdru disbalansom soderzhaniya makro- i mikroelementov v organizme i razvitiem morfologicheskikh dezintegrazii v biologicheskikh zhidkostyach i tkanyach. // Fiziologiya cheloveka. – 2007. – T. 33, №2. – S. 104-109.
8. Skal'nyy A.V., Rudakov I. A. Bioelementy v medizine. – M.: ONIKS 21 vek, izd-vo «Mir». – 2004. – 216 s.

Матеріал надійшов до редакції 29.11.2013

© Маракушин Д.І.

УДК 577.27:543.395:616-099-092.9

ТРИВАЛИЙ ВПЛИВ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ НА ВМІСТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ТА ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ*

Маракушин Д.І.

Харківський національний медичний університет, м. Харків

Изучено влияние оксиэтилированных нонилфенолов и их производных на содержание иммуноглобулинов и цитокинов в сыворотке крови крыс в условиях подострого эксперимента. Исследуемые детергенты в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ₅₀ приводят к супрессии антителообразования в организме крыс, снижению в сыворотке крови уровня иммуноглобулинов А, М и G и снижению секреции ИЛ-1β, 2, 4, 6, 8, 10 и ФНО-α. Эти изменения могут служить дополнительными прогностическими тестами, которые характеризуют неблагоприятное влияние оксиэтилированных нонилфенолов и их производных на организм теплокровных животных.

Ключевые слова: оксиэтилированные нонилфенолы, иммуноглобулины, цитокины, иммунная система.

Порушення механізмів регулювання гомеостазу за умов інтоксикації ксенобіотиками останнім часом розглядають як «токсичний стрес», при якому в процес втручаються не тільки нервова та ендокринна, але й імунна система [1, 2]. Крім того, імунна система, виконуючи важливу роль в адаптаційних та захисних реакціях організму, однією з перших піддається зовнішньому впливу, а виникаюче в її діяльності напруження призводить до порушення функціонування інших систем та виникнення патології [3]. Дослідження механізмів дії ксенобіотиків, розробка науково обґрунтованих діагностичних програм і виявлення об'єктивних прогностичних критеріїв перебігу патологічних процесів стає однією з пріоритетних задач сучасної медицини. Гостра необхідність її вирішення пов'язана з прогресуючим забрудненням довкілля, погіршенням здоров'я людини та базується на науковому обґрунтуванні критеріїв, що визначають початок стану декомпенсації функції організму [4]. До пріоритетних забруднювачів навколишнього середовища відносяться оксиетильовані нонілфеноли (ОЕНФ) та їх похідні - натрієві солі карбоксиметилатів оксиетильованих ізоноілфенолів (КМ-ОЕНФ), які за фізико-хімічними властивостями та особливостями будови молекул належать до іоногенних детергентів. Ці сполуки характеризуються досить значними об'ємами синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідравлічних та охолоджуючих речовин тощо), надходженням до джерел питного водопостачання та завдяки цьому можливим впливом на організм людини [5, 6]. Механізми дії ОЕНФ та їх похідних з урахуванням динаміки показників захисно-компенсаторних зсувів в організмі вивчено недостатньо, а саме їх розкриття є підставою для обґрунтування заходів з охорони довкілля та здоров'я населення.

Метою даного дослідження було вивчення в сироватці крові щурів вмісту імуноглобулінів і цитокінів за

умов тривалого перорального впливу ОЕНФ та їх похідних у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ₅₀.

Матеріали та методи дослідження

У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 10 (ОЕНФ₁₀) та КМ-ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 5, 6, 10 (КМ-ОЕНФ₅₋₁₀). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG, масою (180-220) г. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснено згідно з вимогами Європейської конвенції з біоетики. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 діб у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ₅₀. Середньолетальні дози (ДЛ₅₀) складали для ОЕНФ₁₀ – 4,3 г/кг; КМ-ОЕНФ₅ – 2,8 г/кг; КМ-ОЕНФ₆ – 2,2 г/кг; КМ-ОЕНФ₁₀ – 3,2 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження вмісту імуноглобулінів і цитокінів здійснювали через 45 діб після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Забій проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Вміст імуноглобулінів (Ig) А, М, G у сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії в гелі за допомогою моноспецифічних сироваток проти імуноглобулінів виробництва ФГУП «НПО Микроген» (Росія). Рівень цитокінів визначали імуноферментним методом з використанням наборів реагентів «ProCon IL-1β», «ProCon IL-2», «ProCon IL-4», «ProCon IL-6», «ProCon IL-10», «ProCon TNF-α» («Протеиновый контур», Росія), «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Росія) і аналізатора імуноферментного Stat Fax 303 Plus. Статистичний аналіз даних проводили з використанням комп'ютерного пакета прикладних програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Первинне статистичне опрацювання даних починали з перевірки припущення про відповідність вибірок закону гаусівського розподілу, застосовуючи критерій Шапіро-Вілکا. Додатково правильність позитивного висновку щодо

* Цитування при атестації кадрів: Маракушин Д.І. Тривалий вплив оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних на вміст імуноглобулінів та цитокінів у сироватці крові щурів // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 38 – 41

нормальності розподілу вибірок контролювали за допомогою коефіцієнтів асиметрії та ексцесу. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками - середнім значенням показника (М) та середнім квадратичним відхиленням (s); у разі відсутності нормального розподілу непараметричними - медіаною (Me) та інтерквартильним розмахом. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стюдента. Якщо принаймні один з розподілів не був нормальним, то для порівняння незалежних вибірок застосовували критерій Манна-Уїтні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На 45-ту добу дії ОЕНФ та їх похідних у дозі 1/10 ДЛ₅₀ спостерігалася статистично значуща ($p < 0,001$), порівняно з контролем, зменшення вмісту IgA в сироватці крові щурів: для ОЕНФ₁₀ і КМ-ОЕНФ₅ в середньому в 2 рази, а для КМ-ОЕНФ₆ і КМ-ОЕНФ₁₀ – майже в 3 рази (табл. 1). Така ж динаміка змін вмісту IgA визначалася й для дози 1/100 ДЛ₅₀, але менш виразна

(зменшення в середньому в 1,5 раза). Доза 1/1000 ДЛ₅₀ виявилася недіючою. Зниження вмісту IgA свідчить про недостатність гуморального та місцевого імунітету. Показник рівня IgM також достовірно значущий ($p < 0,001$), порівняно з контролем, знижувався на 45-ту добу перорального введення речовин у 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀ в середньому відповідно в 2,0 і 1,5 рази (табл. 2). Максимально високим цей рівень був зареєстрований у випадку дії КМ-ОЕНФ₅, мінімально низьким – у випадку дії ОЕНФ₁₀. Слід відзначити, що тривалий вплив КМ-ОЕНФ₅ і КМ-ОЕНФ₁₀ у дозі 1/1000 ДЛ₅₀ також супроводжувався статистично значущим ($p = 0,003$ і $p = 0,032$ відповідно) зниженням вмісту IgM, тоді як ОЕНФ₁₀ і КМ-ОЕНФ₆ у цій дозі не впливали на рівень цього показника ($p = 0,163$ і $p = 0,087$). Оскільки IgM з'являються на першому етапі імунної відповіді та в основному знаходяться у судинному руслі, вони відіграють важливу захисну роль на ранніх стадіях токсемії. Виявлене зниження вмісту IgM також свідчить про недостатність гуморального імунітету, порушення їх синтезу або посилення катаболізму.

Таблиця 1
Вміст імуноглобуліну А у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксидетильованих нонілфенолів та їх похідних (з/л; n=15; Me [25%; 75%] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ ₅₀		
	1/10	1/100	1/1000
ОЕНФ ₁₀	0,29±0,057 $p < 0,001$	0,39 [0,36; 0,41] $p < 0,001$	0,53 [0,48; 0,55] $p = 0,237$
КМ-ОЕНФ ₅	0,22±0,039 $p < 0,001$	0,33 [0,29; 0,37] $p < 0,001$	0,51±0,031 $p = 0,69$
КМ-ОЕНФ ₆	0,19 [0,17; 0,20] $p < 0,001$	0,35 [0,28; 0,37] $p < 0,001$	0,49±0,028 $p = 0,384$
КМ-ОЕНФ ₁₀	0,18 [0,15; 0,22] $p < 0,001$	0,29±0,037 $p < 0,001$	0,46 [0,43; 0,48] $p = 0,019$
Контроль	0,50±0,053		

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Таблиця 2
Вміст імуноглобуліну М у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксидетильованих нонілфенолів та їх похідних (з/л; n=15; Me [25%; 75%] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ ₅₀		
	1/10	1/100	1/1000
ОЕНФ ₁₀	0,52±0,094 $p < 0,001$	0,63±0,069 $p < 0,001$	0,82±0,062 $p = 0,163$
КМ-ОЕНФ ₅	0,38±0,043 $p < 0,001$	0,47±0,065 $p < 0,001$	0,7 [0,69; 0,79] $p = 0,003$
КМ-ОЕНФ ₆	0,42 [0,38; 0,44] $p < 0,001$	0,52 [0,49; 0,56] $p < 0,001$	0,76±0,037 $p = 0,087$
КМ-ОЕНФ ₁₀	0,46±0,041 $p < 0,001$	0,56±0,046 $p < 0,001$	0,83±0,044 $p = 0,032$
Контроль	0,81±0,028		

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Вміст IgG у сироватці крові щурів на 45-добу дії ОЕНФ та їх похідних у дозі 1/10 ДЛ₅₀ також був достовірно нижчим ($p < 0,001$) порівняно з даними групи контролю (табл. 3). У даному випадку найбільш суттєвим зниження цього показника характерно для КМ-ОЕНФ₆ (майже в 2 рази), найменш – для ОЕНФ₁₀ (в 1,4 раза). Тривалий вплив речовин у діючій дозі 1/100 ДЛ₅₀ та-

кож призводив до статистично значущого, порівняно з контролем, зниження рівня IgG у сироватці крові щурів, але воно було менш виразним (в середньому в 1,3 раза; $p < 0,006$), ніж у випадку дії 1/10 ДЛ₅₀. Дія речовин у дозі 1/1000 ДЛ₅₀ не викликала достовірно значущих змін з боку IgG. Стійке зниження рівня IgG свідчить про виснаження їх захисної ролі.

Таблиця 3

Вміст імуноглобуліну G у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксидетильованих нонілфенолів та їх похідних (а/л; n=15; Ме [25%; 75%] або M±s)

Речовина	Доза, ДЛ50		
	1/10	1/100	1/1000
ОЕНФ ₁₀	4,0±0,62 p<0,001	4,5±0,53 p=0,006	5,8 [4,9; 6,5] p=0,455
КМ-ОЕНФ ₅	2,9±0,53 p<0,001	4,0±0,88 p<0,001	5,1±0,95 p=0,283
КМ-ОЕНФ ₆	2,6 [2,4; 3,2] p<0,001	3,9±0,71 p<0,001	5,0 [4,8; 6,4] p=0,88
КМ-ОЕНФ ₁₀	3,3±0,65 p<0,001	4,3 [3,6; 5,0] p=0,002	5,4±0,79 p=0,89
Контроль	5,5±1,05		

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Адекватна імунна відповідь базується на балансі клітинно-опосередкованих і гуморальних імунних реакцій, розвиток яких підтримується та регулюється цитокинами [7-9]. Речовини призводили до порушень з боку цитокінового профілю сироватки крові щурів (табл. 4). У разі їх тривалого перорального введення у дозі 1/100 ДЛ50 спостерігали, порівняно з контролем, зниження (p<0,003) рівня ІЛ-1β: для КМ-ОЕНФ₅ – майже в 2 рази, КМ-ОЕНФ₆ і КМ-ОЕНФ₁₀ – в середньому в 1,8 рази, ОЕНФ₁₀ – лише в 1,4 рази. Прозапальний цитокін ІЛ-1β має чисельні загальні ефекти і сприяє розвитку системного характеру патологічного процесу шляхом формування аутоантитіл і підвищення концентрації у крові С-реактивного білка. Зниження цього

показника є важливим діагностичним критерієм хронічного перебігу запального процесу в організмі щурів за умов тривалого впливу ОЕНФ та їх похідних. На 45-добу в сироватці крові щурів відзначалося також зниження рівня ІЛ-2 майже в 2 рази за умов впливу КМ-ОЕНФ₅ (p<0,001), в 1,8 рази – КМ-ОЕНФ₆ (p<0,001), в 1,5 рази – КМ-ОЕНФ₁₀ (p<0,001) та в 1,3 рази – ОЕНФ₁₀ (p=0,003). ІЛ-2 розглядається як регуляторний цитокін, здатний компенсувати прояви імунної недостатності, відновлювати баланс Т-хелперів, що призводить до регуляції продукції проти- та прозапальних цитокінів. Зниження продукції ІЛ-2 є підтвердженням виникнення Т-клітинного імунодефіциту.

Таблиця 4

Вміст цитокінів у сироватці крові щурів на 45-добу впливу оксидетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозі 1/100 ДЛ₅₀ (нг/л; n=15; Ме [25%; 75%] або M±s)

Показник	ОЕНФ ₁₀	КМ-ОЕНФ ₅	КМ-ОЕНФ ₆	КМ-ОЕНФ ₁₀	Контроль
ІЛ-1β	40,2 [30,7; 50,5] p<0,001	29,3±6,36 p<0,001	30,3±5,69 p=0,0018	32,5 [29,0; 46,0] p<0,001	56,9±7,05
ІЛ-2	48,3±8,53 p=0,003	30,6±6,12 p<0,001	36,5 [25,8; 40,1] p<0,001	43,9 [32,1; 50,0] p<0,001	64,7±17,1
ІЛ-4	29,5 [26,0; 39,4] p<0,001	20,3 [17,5; 29,0] p<0,001	26,3±8,37 p<0,001	32,0 [27,9; 39,0] p<0,001	40,9 [39,4; 60,3]
ІЛ-6	24,4±6,04 p<0,001	18,9 [12,0; 28,5] p<0,001	28,9 [19,2; 30,2] p=0,0015	23,1±5,88 p<0,001	39,8 [35,0; 50,6]
ІЛ-8	31,8±6,58 p<0,001	20,1 [17,0; 27,0] p<0,001	25,1±6,27 p<0,001	30,5 [28,0; 44,5] p<0,001	48,4 [44,0; 59,0]
ІЛ-10	25,0 [19,3; 31,0] p<0,001	20,0 [15,1; 22,5] p<0,001	24,7 [17,0; 29,0] p<0,001	32,7±7,57 p=0,0013	43,9±9,66
ФНП-α	110,0 [90,6; 118,6] p<0,001	97,8 [80,5; 108,3] p<0,001	85,8±11,84 p=0,0016	118,0±9,39 p<0,001	136,8 [123,8; 148,4]

Примітка: p – рівень значущості порівняно з контролем

Як маркер аутоімунних і алергійних процесів розглядають ІЛ-4, який обумовлює активацію гуморального ланцюга імунної системи, стимулює проліферацію та диференціювання В-клітин, синтез загального ІgE, а також інгібує моноцити й макрофаги, продукцію ФНП-α. У сироватці крові щурів на 45-ту добу впливу речовин у дозі 1/100 ДЛ₅₀ виявлялося зниження (p<0,001), порівняно з контролем, рівня ІЛ-4 всередньому в 1,6 рази. Зниження секреції ІЛ-4, у даному випадку, може супроводжуватися пригніченням антигенної стимуляції Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, тучних клітин, базофілів, стромальних клітин, гемопоетичних попередників тощо.

Тривала дія ОЕНФ та їх похідних призводила також до зниження (p<0,0015) в сироватці крові тварин вмісту ІЛ-6 в середньому в 1,7 рази. Біологічна роль ІЛ-6, по-перше, полягає в індукції відновлювальних механізмів та активації імунного захисту (активація і диференціювання Т-клітин, визрівання В-клітин, посилення гемопоєзу). Поряд з цим також відома гальмівна дія ІЛ-6 на запальну реакцію шляхом гальмування синтезу ряду прозапальних субстанцій, в тому числі ФНП-α. Виявлене зниження рівня ІЛ-6 за умов тривалої дії речовин може призвести до пригнічення їх функціональної активності та зниження гуморальної імунної відповіді. Аналогічно спостерігалася тенденція до

статистично значущого ($p < 0,001$), порівняно з контролем, зниження вмісту ІЛ-8. Найбільш суттєвим це виявилось для тривалої дії ОЕФ₁₀ у дозі 1/100 ДЛ₅₀, а саме в 2,4 рази. Інші речовини знижували вміст ІЛ-8 в середньому в 1,7 рази. Цитокін ІЛ-8 продукується моноцитами та макрофагами, виконує роль індуктора гострих запальних реакцій, викликаючи експресію молекул міжклітинної адгезії та посилюючи адгезію нейтрофілів до ендотеліальних клітин і субендотеліальних матричних білків, що свідчить про його основну роль в опосередкуванні запальної відповіді. Зниження його продукції є однією з причин пригнічення клітинного та гуморального імунітету.

До цитокінів з виразним протизапальним ефектом відноситься ІЛ-10, який продукується Т-клітинами й розглядається як антагоніст ряду інших цитокінів. ІЛ-10 пригнічує продукцію прозапальних цитокінів, проліферативну відповідь Т-клітин на антигени й мітогени, а також зменшує секрецію активованими моноцитами ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6. Але одночасно ІЛ-10 може стимулювати синтез ІgЕ. У результаті він сприяє розвитку гуморальної складової імунної відповіді. ОЕФ₁₀, КМ-ОЕФ₅, КМ-ОЕФ₆ у діючій дозі 1/100 ДЛ₅₀ на 45-добу дії призводили до зниження ($p < 0,001$) рівня ІЛ-10 в середньому в 2 рази. Для КМ-ОЕФ₁₀ падіння ($p < 0,0013$) рівня ІЛ-10 було менш виразним, лише в 1,3 рази. Ці зміни також вказують на порушення функціонального стану захисних систем організму щурів.

У імунометаболічному плані важливе значення мають результати щодо вмісту ФНП- α . Так, у сироватці крові щурів на 45-ту добу введення речовин вміст цього показника статистично значуще ($p < 0,001$) знижувався, в середньому в 1,4 рази, порівняно з контрольною групою. ФНП- α продукується як клітинами імунної системи, так й іншими типами клітин (астроцитами, фібробластами, гліальними клітинами, кератиноцитами). Низькі рівні ФНП- α за умов тривалого впливу досліджуваних речовин можуть бути пов'язані з недостатньою стимуляцією макрофагального захисту організму.

У цілому зниження цитокінів в крові щурів за умов тривалої дії ППЕ є свідченням глибоких порушень імунітету, проявом розвитку вторинного імунної недостатності.

Висновки

1. ОЕФ та їх похідні за умов тривалої дії у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀ призводять до супресії антитілотворення в організмі щурів, що підтверджується зниженням в сироватці крові рівня імуноглобулінів А, М і G. Доза 1/1000 ДЛ₅₀ виявляється недіючою на вміст імуноглобулінів. 2. ОЕФ та їх похідні у разі тривалого перорального впливу у діючій дозі 1/100 ДЛ₅₀ викликають суттєві порушення у системі цитокінів – медіаторів контролю процесів проліферації, диференціювання, апоптозу та функціональної активності клітинних елементів у гомеостатичних системах організму, що підтверджується зниженням у сироватці крові щурів секреції ІЛ-1 β , 2, 4, 6, 8, 10 та ФНП- α . 3. Зміни з боку імуноглобулінів та цитокінів можуть слугувати додатковими прогностичними тестами, що характеризують несприятливий вплив ОЕФ та їх похідних у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ₅₀ на організм теплокровних тварин.

Література

1. Постановова М.В. Физиологические механизмы индивидуальной организации гомеостаза организма. - Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2011. - 356 с.
2. Забродский П. Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков / П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч. - Саратов: СВИБХБ, 2007. - 420 с.
3. Татаркин А.А. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в системе межклеточной функциональной многоуровневой регуляции гомеостаза / А.А. Татаркин, Н.Д. Татаркина, Б.Г. Андрюков // Здоровье. Медицинская экология. Наука. - 2010. - Т. 43, № 3. - С. 13-17.
4. Аманжол И.А. Реакция организма на воздействие вредных производственных факторов: оценка профессионального риска / И.А. Аманжол, З.Т. Мухаметжанова, Д.С. Абитаев. - Lambert Academic Publishing, 2013. - 116 с.
5. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання / В.А. Бурлака, Г.Б. Руденко, І.Г. Грабар, А.Д. Біба. - Ж.: ЖДТУ, 2004. - 745 с.
6. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / [Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Щербань Н.Г., Евдокимов В.И. и др.]. - Белгород, 2001. - 442 с.
7. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. 552 с.
8. Чуклин С.Н. Интерлейкины / С.Н. Чуклин, А.А. Переслов. - Львов: Лига-Пресс, 2005. - 481 с.
9. Казмірчук В.Є. Клінічна імунологія і алергологія / В.Є. Казмірчук, Л.В. Ковальчук. - Вінниця: Нова книга, 2006. - 528 с.

English version: LONG-DURATION ACTION OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES ON CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS AND CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF RATS*

Marakushin D.I.

Kharkov national medical university, Kharkov

This research deals with influence of oxyethylized alkylphenols and their derivatives on content of immunoglobulins and cytokines in the blood serum of rats during subacute experiment. Examined detergents in doses 1/10 and 1/100 DL_{50} cause a suppression of antibody production, decrease of immunoglobulins A, M, G level, decrease of secretion of IL-1 β , 2, 4, 6, 8, 10 and TNF- α . These changes may serve as additional prognostic tests, which characterize adverse action of oxyethylized alkylphenols and their derivatives on the organism of warm-blooded animals.

Key words: oxyethylized nonylphenols, immunoglobulins, cytokines, immune system

Introduction

The violation of homeostasis regulatory mechanisms in conditions of intoxication by the xenobiotics is considered as «toxic stress», at which not only nervous and endocrine systems but also immune system interfere in a process [1, 2]. In addition, immune system, carrying out an important role in the adaptation and protective reactions of an organism is one of the first systems undergo to external influence, and tension arising in its activity results in violation of functioning of other systems and provokes pathology [3]. Research of xenobiotics' mechanisms of action, creation of scientifically grounded diagnostic programs, revelation of objective prognostic tests of pathological processes becomes one of priority tasks of modern medicine. The sharp necessity of its decision is related to making progress contamination of environment, worsening of people health, and is based on the scientific ground of criteria which determine the beginning of the state of decompensation of functions of the organism [4]. Oxyethylized nonylphenols (OENP) and their derivatives sodium salts of carboxymethylates of oxyethylized isononylphenols (CM-OENP) are belong to priority contaminants of environment, which have physical and chemical properties and features of structure of molecules like ionogenic detergents. These substances are characterized by considerable output volumes of synthesis, wide usage in different industries of national economy (as basis of industrial issue of plastics, polyurethanes, cleaning agents, emulsifying agents, anticorrosing preparations, hydraulic and cooling fluids, and others like that), entry to the sources of water consumption and due to it possible influence on the organism of man [5, 6]. Mechanisms of action of OENP and their derivatives are studied not enough. Their revelation is the grounds for explanation of measures on the conservation of the environment and health of population.

The purpose of this research was to study the content of immunoglobulins and cytokines in the blood serum of rats in conditions of prolonged peroral influence of OENP and their derivatives in doses 1/10, 1/100 and 1/1000 DL_{50} .

Materials and research methods

The standard compounds with scheduled physicochemical properties were used in the work: OENP with number of oxyethylized groups 10 (OENP₁₀) and CM-OENP with number of oxyethylized groups 5, 6, 10 (CM-OENP₅₋₁₀). The experimental part of the research was

performed on white rats of WAG population, with mass (180-220) g. The experiments on white rats were performed in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Every day before feeding they received orally, through a metal probe, aqueous solutions of xenobiotics with 1/10, 1/100 and 1/1000 of LD_{50} . The duration of subacute influence was 45 days. Half-lethal doses (LD_{50}) were determined at the levels: OENP₁₀ – 4,3 g/kg; CM-OENP₅ – 2,8 g/kg; CM-OENP₆ – 2,2 g/kg; CM-OENP₁₀ – 3,2 g/kg of the animal weight. The proper volumes of water were entered to the animals of control group. Research of immunoglobulin and cytokines content was carried out in 45 days after the beginning of experiment. Every group made up 15 animals. The slaughter of animals was performed by a decapitation, preliminary using thiopental sodium.

The content of immunoglobulins (Ig) A, M, G in the blood serum is determined by method of radial immunodiffusion in a gel by the instrumentality of monospecific serums against immunoglobulins made by FGOU «NPO Microgen» (Russia). The level of cytokines was determined by an immunoenzyme method with the use of reagents sets «ProCon IL-1 β », «ProCon IL-2», «ProCon IL-4», «ProCon IL-6», «ProCon IL-10», «ProCon TNF- α » («Protein contour», Russia), «Interleukin-8-IFA-BEST» («Vector-Best», Russia) and analyzer immunoenzyme Stat Fax 303 Plus. The statistical data analysis was performed with the usage of computer programs for statistical data handling Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., the USA). The primary statistical data processing begun from verification of hypothesis about correspondence of sample to Gaussian distribution law, using Shapiro-Wilk test. the rightness of conclusion in relation to normality of sample distribution was additionally controlled by the instrumentality of the asymmetry and excess coefficients. Quantitative signs, that had normal distribution, were described by parametric descriptions - mean value of index (M) and standard deviation (s); in the case of absence of normal distribution – nonparametric: median (Me) and interquartile range. The Student's t-test is used for comparison of two normal distributions. If at least one of distribution was not normal, for comparison of independent samples the Mann-Whitney U test was used. For the critical level of statistical significance at verification of statistical hypotheses took $p < 0,05$.

* To cite this English version: Marakushin D.I. Long-duration action of oxyethylized nonylphenols and their derivatives on content of immunoglobulins and cytokines in the blood serum of rats // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 42 -45.

Results and their discussions

On 45-day of action OENP and their derivatives in a dose 1/10 DL₅₀ was observed statistically significant ($p<0,001$), comparatively with the control, reduction of IgA content in the blood serum of rats: for OENP₁₀ and CM-OENP₅ at the average in 2 times, for CM-OENP₆ and CM-OENP₁₀ – almost in 3 times (tabl. 1). The same dynamics of changes of content IgA was determined and for a dose 1/100 DL₅₀, but less expressive (reduction at the average in 1,5 times). The dose 1/1000 DL₅₀ was not effective. Reduction of IgA content testifies about insufficiency of humoral and local immunity. Index of level IgM also significantly ($p<0,001$), comparatively with the control, decreased on 45-day of peroral introduction of compounds in 1/10 and 1/100 DL₅₀ at the average accord-

ingly in 2,0 and 1,5 times (tabl. 2). At most this level was registered in the case of action CM-OENP₅, minimum low – in the case of action OENP₁₀. It should be noted that the protracted influence of CM-OENP₅ and CM-OENP₁₀ in a dose 1/1000 DL₅₀ was also accompanied by statistically significant ($p=0,003$ and $p=0,032$ accordingly) decreasing of IgM content, while OENP₁₀ and CM-OENP₆ in this dose did not affect the level of this index ($p=0,163$ and $p=0,087$). As IgM appear on the first stage of immune respond and mainly are found in a vascular bed, they play an important protective role on the early stages of toxemia. The reveal decrease of IgM content also testifies about insufficiency of humoral immunity, disturbances of their synthesis or intensification of catabolism.

Table 1
The content of immunoglobulin A in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives (g/l; $n=15$; Me [25%; 75%] or $M\pm s$)

Indices	Dose, DL ₅₀		
	1/10	1/100	1/1000
OENP ₁₀	0,29±0,057 $p<0,001$	0,39 [0,36; 0,41] $r<0,001$	0,53 [0,48; 0,55] $p=0,237$
CM-OENP ₅	0,22±0,039 $p<0,001$	0,33 [0,29; 0,37] $p<0,001$	0,51±0,031 $r=0,69$
CM-OENP ₆	0,19 [0,17; 0,20] $p<0,001$	0,35 [0,28; 0,37] $p<0,001$	0,49±0,028 $r=0,384$
CM-OENP ₁₀	0,18 [0,15; 0,22] $p<0,001$	0,29±0,037 $p<0,001$	0,46 [0,43; 0,48] $r=0,019$
Control	0,50±0,053		

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

Table 2
The content of immunoglobulin M in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives (g/l; $n=15$; Me [25%; 75%] or $M\pm s$)

Indices	Dose, DL ₅₀		
	1/10	1/100	1/1000
OENP ₁₀	0,52±0,094 $p<0,001$	0,63±0,069 $p<0,001$	0,82±0,062 $r=0,163$
CM-OENP ₅	0,38±0,043 $p<0,001$	0,47±0,065 $p<0,001$	0,7 [0,69; 0,79] $r=0,003$
CM-OENP ₆	0,42 [0,38; 0,44] $p<0,001$	0,52 [0,49; 0,56] $p<0,001$	0,76±0,037 $r=0,087$
CM-OENP ₁₀	0,46±0,041 $p<0,001$	0,56±0,046 $p<0,001$	0,83±0,044 $r=0,032$
Control	0,81±0,028		

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

The content of IgG in the blood serum of rats on 45-day of influence OENP and their derivatives in a dose 1/10 DL₅₀ also was significantly below ($p<0,001$) comparatively with data of the control group (tabl. 3). In this case most substantial decrease of this index is typical for CM-OENP₆ (almost in 2 times), minimal – for OENP₁₀ (in 1,4 times). The protracted influence of compounds in an effective dose 1/100 DL₅₀ also resulted in statistically sig-

nificant, comparatively with the control, decreasing of IgG level in blood serum of rats, but it was less expressive (at the average in 1,3 times; $p<0,006$), than in the case of influence 1/10 DL₅₀. Action of compounds in a dose 1/1000 DL₅₀ did not cause significant changes from the side of IgG. The stable decreasing of IgG level testifies about exhaustion of their protective role.

Table 3
The content of immunoglobulin G in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives (g/l; $n=15$; Me [25%; 75%] or $M\pm s$)

Indices	Dose, DL ₅₀		
	1/10	1/100	1/1000
OENP ₁₀	4,0±0,62 $p<0,001$	4,5±0,53 $r=0,006$	5,8 [4,9; 6,5] $r=0,455$
CM-OENP ₅	2,9±0,53 $p<0,001$	4,0±0,88 $p<0,001$	5,1±0,95 $r=0,283$
CM-OENP ₆	2,6 [2,4; 3,2] $p<0,001$	3,9±0,71 $p<0,001$	5,0 [4,8; 6,4] $r=0,88$
CM-OENP ₁₀	3,3±0,65 $p<0,001$	4,3 [3,6; 5,0] $r=0,002$	5,4±0,79 $r=0,89$
Control	5,5±1,05		

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

An adequate immune response is based on balance of the cellular-mediated and humoral immune reactions, development of which is supported and regulated by cytokines [7-9]. The compounds result in disturbances from the side of cytokinic profile of blood serum of rats (tabl. 4). In the case of their protracted peroral introduction in a dose 1/100 DL₅₀ it is observed, comparatively with the control, decreasing ($p<0,003$) of level IL-1 β : for CM-OENP₅ – almost in 2 times, CM-OENP₆ and CM-OENP₁₀ – at the average in 1,8 times, OENP₁₀ – only in 1,4 times. The proinflammatory cytokine IL-1 β has numeral general effects and assists to development of system character of pathological process by formation of autoantibodies and rise of concentration in the blood of the C-reactive

protein. The decrease of this index is the important diagnostic criterion of chronicity of inflammatory process in the organism of rats in conditions of protracted influence of OENP and their derivatives. The decrease of level IL-2 almost in 2 times in conditions of influence CM-OENP₅ ($p<0,001$) in 1,8 times – CM-OENP₆ ($p<0,001$), in 1,5 times – CM-OENP₁₀ ($p<0,001$) and in 1,3 times – OENP₁₀ ($p=0,003$) was marked also on a 45-day in blood serum of rats. IL-2 is considered as a regulator cytokine, able to compensate the displays of immune insufficiency, to proceed in balance T-helpers, that results to regulation of synthesis of anti- and proinflammatory cytokines. The decrease of IL-2 synthesis is confirmation of origin of the T-cell immunodeficiency.

Table 4
The content of cytokines in the blood serum of rats on 45-day under the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives in a dose 1/100 DL₅₀ (ng/l; n=15; Me [25%; 75%] or M \pm s)

Index	OENP ₁₀	CM-OENP ₅	CM-OENP ₆	CM-OENP ₁₀	Control
IL-1 β	40,2 [30,7; 50,5] $p<0,001$	29,3 \pm 6,36 $p<0,001$	30,3 \pm 5,69 $p=0,0018$	32,5 [29,0; 46,0] $p<0,001$	56,9 \pm 7,05
IL-2	48,3 \pm 8,53 $p=0,003$	30,6 \pm 6,12 $p<0,001$	36,5 [25,8; 40,1] $p<0,001$	43,9 [32,1; 50,0] $p<0,001$	64,7 \pm 17,1
IL-4	29,5 [26,0; 39,4] $p<0,001$	20,3 [17,5; 29,0] $p<0,001$	26,3 \pm 8,37 $p<0,001$	32,0 [27,9; 39,0] $p<0,001$	40,9 [39,4; 60,3]
IL-6	24,4 \pm 6,04 $p<0,001$	18,9 [12,0; 28,5] $p<0,001$	28,9 [19,2; 30,2] $p=0,0015$	23,1 \pm 5,88 $p<0,001$	39,8 [35,0; 50,6]
IL-8	31,8 \pm 6,58 $p<0,001$	20,1 [17,0; 27,0] $p<0,001$	25,1 \pm 6,27 $p<0,001$	30,5 [28,0; 44,5] $p<0,001$	48,4 [44,0; 59,0]
IL-10	25,0 [19,3; 31,0] $p<0,001$	20,0 [15,1; 22,5] $p<0,001$	24,7 [17,0; 29,0] $p<0,001$	32,7 \pm 7,57 $p=0,0013$	43,9 \pm 9,66
TNF- α	110,0 [90,6; 118,6] $p<0,001$	97,8 [80,5; 108,3] $p<0,001$	85,8 \pm 11,84 $p=0,0016$	118,0 \pm 9,39 $p<0,001$	136,8 [123,8; 148,4]

Note: p – level of statistical significance comparatively with the control

As a marker of autoimmune and allergic processes IL-4 is considered, which ensures an activation of humoral chain of the immune system, stimulates proliferation and differentiation B-cells, synthesis of IgE, and also inhibits of monocytes and macrophages, synthesis of TNF- α . In the blood serum of rats on 45-day of influence of compounds in a dose 1/100 DL₅₀ it was showed the decrease ($p<0,001$), comparatively with the control, level of IL-4 at average in 1,6 times. The decrease of secretion IL-4, in this case, can be accompanied by depression of antigen stimulation T- and B-lymphocytes, macrophages, mass cells, basophiles, stromal cells, hemopoietic precursors.

The protracted action OENP and their derivatives result also to the decrease ($p<0,0015$) of content IL-6 in the blood serum of animals on the average in 1,7 times. A biological role IL-6, at first, consists in induction of restorative mechanisms and activation of immune defence (activation and differentiation T-cells, maturation of B-cells, intensification of hemopoiesis). It is also known an inhibitory action of IL-6 on the inflammatory reaction by inhibition of synthesis of proinflammatory substances, in that number TNF- α . The decrease of IL-6 level in the condition the protracted action of compounds can result in depression of their functional activity and reduction of humoral immune response. Also a tendency to statistically significant ($p<0,001$), comparatively with the control,

decreasing of IL-8 content is observed. Most substantial it was for protracted action of OENP₁₀ in a dose 1/100 DL₅₀, namely in 2,4 times. Other compounds decrease content of IL-8 at the average in 1,7 times. Cytokine IL-8 is produced by monocytes and macrophages, executes the role of inducer of acute inflammatory reactions, causing expression of molecules of intercellular adhesion and intensifying of adhesion of neutrophils to the endothelial cells and subendothelial matrix proteins, that testifies about its basic role in mediation of inflammatory response. The decrease of its synthesis is one of the reasons of depression of cellular and humoral immunity.

IL-10 refers to cytokines with expressive anti-inflammatory effect, which is produced T-cells and examined as an antagonist of row other cytokines. IL-10 depresses the synthesis of proinflammatory cytokines, proliferative response of T-cells on antigens and mitogens, and also diminishes a secretion by activated monocytes of IL- β , TNF- α , IL-6. But simultaneously IL-10 can stimulate the synthesis of IgE. In the result it assists to development of humoral component of immune response. OENP₁₀, CM-OENP₅, CM-OENP₆ in an operating dose 1/100 DL₅₀ on a 45-day of action resulted in decrease ($p<0,001$) of IL-10 level at the average in 2 times. For CM-OENP₁₀ the level of IL-10 decrease ($p<0,0013$) was less expressive, only in 1,3 times. These changes also specify on violation of the functional state of protective systems of the rats organism.

The results of TNF- α content have an important value in metabolic plan. So, the content of this index in the blood serum of rats on 45-day of compounds introduction is statistically decreased ($p < 0,001$), at the average in 1,4 times, comparatively with a control group. TNF- α is produced by both the cells of the immune system and other types of cells (astrocytes, fibroblasts, glial cells, keratinocytes). Low levels of TNF- α in the conditions of protracted influence of the examined compounds can be related to insufficient stimulation of macrophagic defence of the organism.

In general the decrease of cytokines in the blood of rats in the conditions of protracted influence of OENP is the evidence of deep disturbances of immunity, demonstration of development of the secondary immune insufficiency.

Conclusions

1. In the conditions of protracted influence in doses 1/10 and 1/100 DL₅₀ OENP and their derivatives result in suppression of antibody synthesis in the organism of rats, that is confirmed by decrease in the blood serum of level of immunoglobulins A, M and G. The dose 1/1000 DL₅₀ is inactive on the content of immunoglobulins.

2. OENP and their derivatives in the case of the protracted peroral influence in an operating dose 1/100 DL₅₀ cause substantial disturbances in the system of cytokines – mediators of control of the processes of proliferation, differentiation, apoptosis and functional activity of cellular elements in the homeostatic systems of the organism, that is confirmed by the decrease in the blood serum of rats of secretion IL-1 β , 2, 4, 6, 8, 10 and TNF- α .

3. Changes from the side of immunoglobulins and cytokines can serve by additional prognostic tests, that

characterize the unfavorable influence of OENP and their derivatives in doses 1/10 and 1/100 DL₅₀ on the organism of warm-blooded animals.

References

1. Postanova M.V. Fiziologicheskie mechanizmy individual'noy organizazii gomeostaza organizma. - Volgo-grad: Izd-vo VolGU, 2011. – 356 s.
2. Zabrodskiy P. F. Immunotoksikologiya ksenobiotikov / P. F. Zabrodskiy, V. G. Mandych. - Saratov: SVIBChB, 2007. - 420 s.
3. Tatarkin A.A. Neyroimmunoendokrinnye vzaimodeystviya v sisteme mezhkлетochnoy funktsional'noy mnogourovnevnoy regulyazii gomeostaza / A.A. Tatarkin, N.D. Tatarkina, B.G. Andryukov // Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka. - 2010. - T. 43, № 3. - S. 13-17.
4. Amanzhol I.A. Reakziya organizma na vozdeystvie vrednykh proizvod-stvennykh faktorov: ozenka professional'nogo riska / I.A. Amanzhol, Z.T. Muchametzhanova, D.S. Abitayev. – Lambert Academic Publishing, 2013. – 116 s.
5. Detergenti suchasnosti: tekhnologiya virobniztva, ekologiya, ekonomika vikoristannya / V.A. Burlaka, G.B. Rudenko, I.G. Grabar, A.D. Biba. – Zh.: ZhDTU, 2004. – 745 s.
6. Nauchnye osnovy obosnovaniya prognoza potentsial'noy opasnosti detergentov v svyazi s reglamentaziey v vode vodoemov / [Zyganenko A.Ya., Zhukov V.I., Scherban' N.G., Evdokimov V.I. i dr.]. – Belgorod, 2001. – 442 s.
7. Ketlinskiy S.A. Zitokiny / S.A. Ketlinskiy, A.S. Simbirzev. - SPb.: OOO «Izdatel'stvo Foliant», 2008. 552 s.
8. Chuklin S.N. Interleukiny / S.N. Chuklin, A.A. Pereyaslov. - L'vov: Liga-Press, 2005.- 481 s.
9. Kazmirchuk V.E. Klinichna imunologiya i alergologiya / V.E. Kazmirchuk, L.V. Koval'chuk. – Vinnizya: Nova kniga, 2006. - 528 s.

Матеріал надійшов до редакції 2.12.2013

СТОМАТОЛОГІЯ

© Скрипников П.М., Непокупна-Слободянюк Т.С., Шинкевич В.І.
УДК: 616.314.17-002.2-08

КОНЦЕНТРАЦІЯ АЛАНІН- ТА АСПАРТАТ- АМІНОТРАНСФЕРАЗ У ПАРОДОНТАЛЬНИХ КИШЕНЯХ ЯК МАРКЕР АКТИВНОСТІ ЗАПАЛЕННЯ ПРИ КОНСЕРВАТИВНОМУ ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНОГО ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ПАРОДОНТИТУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АЗИТРОМІЦИНУ*

Скрипников П.М., Непокупна-Слободянюк Т.С., Шинкевич В.І.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава,

*Стоматологічна клініка товариства з обмеженою відповідальністю «Медікол плюс», м. Київ

Использование в клинических исследованиях объективных критериев эффективности лечения хронического пародонтита является актуальным вопросом. Исследование взаимосвязи концентраций АЛТ и АСТ с клиникой пародонтита в динамике лечения при двух режимах применения азитромицина могло бы подтвердить эффективность лечения. После стандартного пародонтологического лечения хронического генерализованного пародонтита (ХГП) I-III степени тяжести, 60 пациентов были поровну распределены на 3 группы. Во 2-й группе дополнительно назначили азитромицин по 500 мг 1 раз в день, 3 дня, в 3-й: 500 мг 1 раз в день, 7 дней, затем по 500 мг 1 раз в неделю, 12 недель. Оценивали клинические индексы и концентрацию АСТ, АЛТ до лечения и через 2 недели и 1, 3, 6, 12 мес. Установлено, что через 3 мес. стандартной терапии обострение ХГП зарегистрировано у 65% пациентов, уровни АСТ, АЛТ в группе не отличались от состояния до лечения. Через 6 мес. во 2-й группе повысились уровни АСТ, АЛТ; клиническое обострение отмечено у 50% пациентов. Через 12 мес. пониженные концентрации АСТ и АЛТ ($64,4 \pm 26,9$; $76,6 \pm 22,0$ Ед/л) подтвердили клинический эффект терапии в 3-й группе (20% обострений ХГП) по сравнению с 1-й ($110,7 \pm 17,5$; $104,9 \pm 22,0$ Ед/л) и 2-й ($82,9 \pm 18,6$; $95,2 \pm 27,3$ Ед/л), при повышении концентраций по сравнению с предыдущими сроками исследования ($p < 0,05$). Определение в пародонтальных карманах концентраций АЛТ, АСТ может быть чувствительным, доступным, удобным и простым методом определения активности воспалительной деструкции периодонта.

Ключевые слова: аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, хронический генерализованный пародонтит, азитромицин.

При хронічному генералізованому пародонтиті (ХГП) бактеріальні компоненти персистоючої під'ясенної бляшки індукують розвиток імунних реакцій макроорганізму, здатних викликати тканинну деструкцію, активуючи універсальні руйнівні механізми [4, 5]. Умовно, два взаємопов'язаних види запалення підтримують прогресування ХГП – імунне і неспецифічне, а на місце біомаркерів їх активності запропоновано широкий спектр метаболітів [2, 13, 14]. Аланін- та аспартат амінотрансферази (АЛТ, АСТ) – цитоплазматичні ферменти, важливі для продукції амінокислот, і вивільняються з клітин при їх пошкодженні [20,

21]. АЛТ та АСТ у певній концентрації завжди присутні у ротовій рідині, секреті слинних залоз [17,19], періодонті, кривікулярній рідині, емалевій пелікулі [12].

При ХГП пародонтопатогенні бактерії, потрапивши до тканин пародонту і кров, складно піддаються ерадикації [15]. Азитроміцин є полусинтетичним антибіотиком-макролідом II покоління, що має ефективність проти пародонтопатогенної мікробної біоплівки внаслідок відповідного антимікробного спектру [8] і завдяки імуномодельючим властивостям за рахунок депонування у нейтрофілах, макрофагах, фібробластах,

* Цитування при атестації кадрів: Скрипников П.М., *Непокупна-Слободянюк Т.С., Шинкевич В.І. Концентрація аланін- та аспартат- амінотрансфераз у пародонтальних кишнях як маркер активності запалення при консервативному лікуванні хронічного генералізованого пародонтиту із застосуванням азитроміцину // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 46 –50.

проявляючи антибактеріальний, протизапальний й регенеруючий ефекти [10].

Метою роботи було встановити взаємозв'язок концентрацій АЛТ та АСТ з клінічними параметрами пародонтального статусу в динаміці консервативного комплексного лікування ХГП при двох режимах застосування азитроміцину для підтвердження ефективності лікування.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося на базі стоматологічної клініки товариства з обмеженою відповідальністю «Медікол плюс», м. Київ, кафедри післядипломної освіти лікарів-стоматологів ВДНЗУ «УМСА» та Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Української медичної стоматологічної академії, м. Полтава. Перед початком дослідження було отримано схвалення комісії по біоетиці Української медичної стоматологічної академії.

У клінічне дослідження були включені 60 пацієнтів, віком 23-65 років, з ХГП I, II та III ступенів тяжкості.

Перед включенням у клінічне дослідження, всі пацієнти проходили скринингове обстеження для верифікації діагнозу. Пацієнтам проводили загальний аналіз крові, аналіз крові на глюкозу, огляд порожнини рота з визначенням індексів, рентгенологічне дослідження. Всім пацієнтам проводили первинне пародонтологічне лікування (ППЛ 1), яке включало зняття зубних відкладень, поліровку; іригації та інстиляції у пародонтальні кишені (ПК) хлоргексидину 0,2%, пародонтальну пов'язку «Парасепт» (Владмива, Росія), корекцію травматичної оклюзії, за показаннями; корекцію чи заміну пломб і реставрацій, інструктаж з гігієни та призначення засобів гігієни, та підтримуюче пародонтальне лікування (ППЛ 2) – за показаннями та згідно стандартного протоколу.

Критерії включення в дослідження: 1) підписання інформованої згоди; 2) наявність у пацієнтів ХГП I, II, III ступенів тяжкості. Критерії виключення з дослідження: 1) наявність важких, неконтрольованих захворювань внутрішніх органів, або нейропсихіатричних розладів; 2) наявність інших умов, які визначали нездатність пацієнта розуміти суть і можливі наслідки дослідження.

Після ППЛ 1 та санаційних заходів пацієнти були розподілені на три групи по 20 осіб. Пацієнтам 1-ї групи проводили тільки стандартні перераховані маніпуляції; 2-ї: додатково призначали короткочасну антибіотикотерапію азитроміцином («Азимед», ВАР «Київ-

медпрепарат», Україна) по 500 мг 1 раз на день 3 дні; пацієнтам 3-ї – тривалу схему: по 500 мг 1 раз на день, 7 днів, далі: по 500 мг 1 раз на тиждень, 12 тижнів. Пацієнтів повторно обстежували через 14 ± 3 , 30 ± 5 , 90 ± 5 , 180 ± 5 і 360 ± 5 днів.

Клінічне стоматологічне обстеження включало визначення суб'єктивного самопочуття пацієнтів за допомогою візуальної аналогової шкали, оцінку гігієнічного індексу (ГІ) Федорова-Володкіної, ГІ та індексу зубного каменю Грін-Вермільйона (ОHI-S=DI+CI), проби Шиллера-Пісарєва (ПШ-П), РМА, пародонтального індексу Расела (PI), глибини ПК, рівня рецесії ясен (РЯ), індексів патологічної рухомості зубів (IP), кровоточивості ясен (IK); ознак травматичної оклюзії.

Матеріалом для дослідження АЛТ і АСТ служили проби вмісту пародонтальних кишень, отримані паперовими штифтами (пінами). Пробу отримували з ПК одного-двох тих самих зубів, де визначалося активне запалення: ізолювали ділянку від ротової рідини, знімали над'ясенну зубну бляшку, висушували зуб, паперові піни обережно занурювали під ясенний край на 1-2 мм і витримували 30 секунд. Піни із зразками переносили у стерильні сухі епандорфи та протягом 12 годин доставляли у лабораторію. Зберігали при -80°C до проведення методики. При транспортуванні з м. Київ використовували термос із заморожувачими елементами. Визначення АЛТ, АСТ у вмісті пародонтальних кишень проводили кінетичним фотометричним (дінітрофенілгідразиним) методом за допомогою набору «Біо-La-Тест», Чехія, як описано раніше [3].

Результати обробляли статистично із застосуванням методу Т-тесту для незалежних, або залежних величин; χ^2 з поправкою Йейтса.

Загальний аналіз крові та аналіз крові на глюкозу пацієнтам проводили у сертифікованих клінічних лабораторіях м. Київ та м. Полтава, за стандартними методиками.

Результати

Пацієнтів рандомізували на три групи клінічного дослідження, врівноважених за віком, статтю, ступенями тяжкості ХГП, особливостям клініки ХГП і супутнім захворюванням, які на момент дослідження були компенсованими та/або в стані ремісії.

Середні показники індексів для кожної групи до початку лікування, наведені у таблиці 1, не мали клінічно-значимих відмін. Рентгенологічно, при ХГП спостерігали нерівномірний тип резорбції міжзубних перетинок, рівень резорбції відповідав ступені тяжкості.

Таблиця 1
Середні клінічні індекси до первинного пародонтологічного лікування

Групи	ГІ Ф.-В., бали	ОHI-S DI, бали	ОHI-S CI, бали	РМА, %	IK, бали	IP, бали	Глибина ПК, мм	Рівень РЯ, мм	PI Расела, бали
1	2,75 \pm 0,33	2,00 \pm 0,33	1,44 \pm 0,67	67,60 \pm 15,97	2,11 \pm 0,62	0,61 \pm 0,65	1,60 \pm 0,89	1,47 \pm 0,76	3,80 \pm 1,25
2	3,46 \pm 2,22	2,41 \pm 0,21*	1,42 \pm 0,77	66,05 \pm 19,29	2,0 \pm 0,62	0,73 \pm 0,52	1,29 \pm 0,72	1,72 \pm 0,83	3,75 \pm 1,28
3	3,30 \pm 0,61*	2,56 \pm 0,68*	1,27 \pm 0,74	68,75 \pm 17,88	1,95 \pm 0,43	0,52 \pm 0,54**	1,64 \pm 0,85**	1,23 \pm 0,71**	3,80 \pm 1,05

Примітка. Статистична обробка методом Т-тесту для незалежних величин: дані наведені у вигляді вибіркового середнього (M) \pm стандартне відхилення (SD, δ);

* - $p < 0,05$ при порівнянні з 1-ю групою;

** - $p < 0,05$ при порівнянні з 2-ю.

Результати визначення АСТ та АЛТ у ПК перед лікуванням показали певні індивідуальні коливання концентрації, але загальною закономірністю були досить високі їх відповідні середні концентрації: 102,4 \pm 13,7 Од/л; 89,0 \pm 11,7 – у 1-й групі, 95,0 \pm 23,6;

83,7 \pm 10,1 – у 2-й, 111,0 \pm 34,8 та 95,3 \pm 18,2 – у 3-й, які не відрізнялися достовірно між групами.

Через 14 \pm 3 дні після початку ППЛ 1, самопочуття пацієнтів всіх груп поліпшилося, що виражалося в достовірному підвищенні показників візуальної шкали (від 43,60 \pm 20,39 до 80,70 \pm 11,30* у 1-й групі; від

45,80±18,87 до 77,70±16,75* у 2-й і від 45,60±18,61 до 75,10±20,90* – у 3-й). За відповідними термінами дослідження: на 14-й±3 день середня концентрація АСТ знижувалася серед пацієнтів 3-ї групи у порівнянні з 1-ю, і з 2-ю, АЛТ в ПК пацієнтів 3-ї групи зростала (рис. 1, 2).

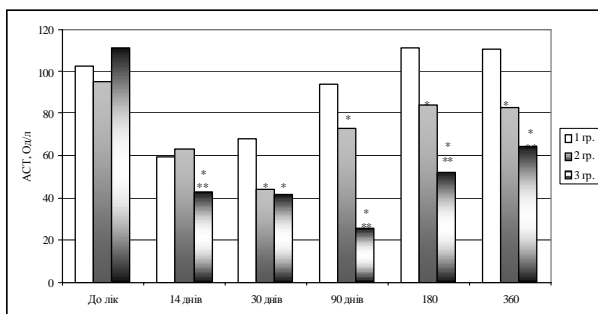


Рис. 1. Порівняльна динаміка середніх концентрацій АСТ в пародонтальних кишнях у пацієнтів 1-3-ї груп.

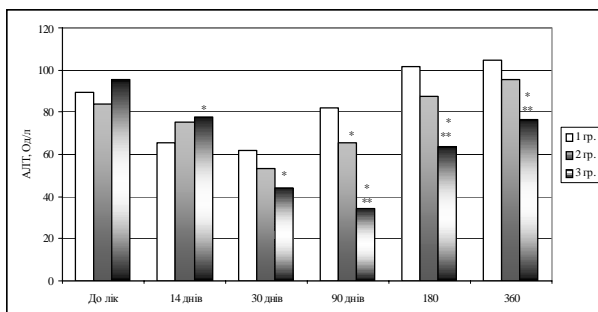


Рис. 2. Порівняльна динаміка середніх концентрацій АЛТ в пародонтальних кишнях у пацієнтів 1-3-ї груп.

Через 30±5 днів після лікування всі показники індексних оцінок у групах достовірно покращувалися і не відрізнялися між групами, окрім середнього рівня РЯ, який виявився нижчим у 3-й групі (1,53±0,89), по-

рівняно з 1-ю (1,97±0,99), $p < 0,05$. Привернуло увагу різке зниження середнього ІК в 2-й (0,54 ± 0,33) і 3-й групах (0,44 ± 0,33) в порівнянні з вихідними значеннями ($p < 0,05$). Це може відображати значну клінічну ефективність включення азитроміцину до стандартного ППЛ 1. Середня концентрація АСТ у 2-й та 3-й групах була достовірно нижче, ніж у 1-й (див. рис. 1). Середня концентрація АЛТ відрізнялася достовірно між 1-ю та 3-ю групами (див. рис. 2), що може відображати додатково ефект терапії саме у 3-й групі вже через 1 місяць після ППЛ 1.

Через 90±5 днів після ППЛ 1 середні значення візуальної аналогової шкали у всіх групах зберігалося достовірно підвищеними. Середній ГІ був достовірно нижче в 3-й групі, в порівнянні з 1-ю. У 1-й групі індекси зубного каменю, РМА, ІК, РІ, середня глибина ПК перевищували такі інших груп. У 3-й групі відзначали найменше значення середнього рівня РЯ (дані не наводили). Отже, вже через 3 місяці клінічні ефекти ППЛ 1 в першій групі стали недостатніми: загострення ХГП було зареєстроване у 13 з 20 пацієнтів (65%) (їм проводили ППЛ 2). Таким чином, клінічно, ефект лікування в 1-й групі тривав до 3-х місяців у 35% пацієнтів. Найнижчі показники концентрації АСТ та АЛТ зареєстровані саме у 3-й групі, порівняно з двома іншими (див. рис. 1, 2). Але в 2-й ці концентрації були нижчі, порівняно із 1-ю, що свідчить про найнижчу ефективність терапії у 1-й групі, а також узгоджується та доповнює клінічні дані.

Через 180±5 днів спостереження найкраще самопочуття, згідно даних візуальної шкали, визначено у пацієнтів 3-ї групи. Найкращий гігієнічний стан, найнижчий рівень клінічного запалення спостерігався в 3-й групі. Найвищий індекс зубного каменю і РІ встановлений в 1-й групі (табл. 2). На даному етапі досліджень у 9-ти пацієнтів 1-ї і 10-ти – 2-ї групи було зареєстроване клінічне загострення ХГП.

Таблиця 2
Порівняння середніх клінічних показників між 1, 2 та 3 групами дослідження через 180±5 днів спостереження

Показники	Групи дослідження		
	1	2	3
Значення візуальної шкали, мм	70,20±24,92	68,05±26,05	84,65±20,86* **
ГІ Ф.-В., бали	2,34±0,4	2,29±0,43	1,99±0,49* **
ОHI-S DI, бали	1,40±0,58	1,48±0,35	1,21±0,54 **
ОHI-S CI, бали	0,57±0,53	0,24±0,28*	0,09±0,15 *
РМА, %	57,85±14,71	53,45±14,56	49,50±14,12 *
ІК, бали	1,40±0,95	1,17±0,92	0,05±0,07* **
ІР, бали	0,48±0,49	0,52±0,40	0,22±0,30 * **
ПК, мм	1,20±0,52	1,11±0,57	1,10±0,61
РЯ, мм	2,27±1,08	2,01±1,03	1,52±0,88 * **
РІ Рассела, бали	4,08±1,41	3,75±1,03	3,56±1,18*

На термін близько півроку з боку середніх концентрацій АСТ та АЛТ у ПК пацієнтів 3-ї групи відзначається закономірність як для попереднього етапу – рівень АСТ та АЛТ у цій групі був найнижчий. У 2-й групі спостерігалися ознаки поступового зростання рівня запалення у вигляді збільшення середньої концент-

рації АЛТ, яка не відрізнялася достовірно від 1-ї групи (див. рис. 2).

Через 360±5 днів спостереження найкраще суб'єктивне самопочуття визначено у пацієнтів 3-ї групи. Ця група характеризувалася достовірно кращими показниками майже всіх індексів (табл. 3).

Таблиця 3

Порівняння середніх клінічних показників між 1, 2 та 3 групами дослідження через 360±5 днів спостереження

Показники	Групи дослідження		
	1	2	3
Значення візуальної шкали, мм	62,0±22,94	57,75±23,91	82,98±17,72 ***
П Ф.-В., бали	2,46±0,35	2,35±0,29	2,12±0,47 ***
ОHI-S DI, бали	1,37±0,59	1,55±0,39	1,39±0,41
ОHI-S CI, бали	0,67±0,54	0,28±0,25*	0,18±0,19*
PMA, %	64,35±17,08	55,70±14,04*	49,80±13,96*
IK, бали	1,75±0,76	1,46±1,01	0,06±0,09**
IP, бали	0,58±0,54	0,54±0,43	0,23±0,80**
ПК, мм	1,47±0,66	1,21±0,57	1,12±0,65*
РЯ, мм	2,47±1,05	2,24±1,0	1,55±0,90**
PI Рассела, бали	4,25±1,36	3,87±1,32	3,53±1,20*

З боку рівнів АСТ та АЛТ – у 3-й групі стабільно зберігається попередня тенденція. Знижені концентрації АСТ і АЛТ (64,4±26,9; 76,6±22,0 Од/л) підтвердили клінічний ефект терапії у 3-й групі (20% загостреного ХГП), порівняно з 1-ю (110,7±17,5; 104,9±22,0 Од/л) і 2-ю (82,9±18,6; 95,2±27,3 Од/л), при підвищенні концентрацій, порівняно з попередніми термінами дослідження ($p<0,05$). У 2-й групі середня концентрація АЛТ достовірно не відрізняється від 1-ї на кінець дослідження.

Таким чином, у 2-й і 3-й групах реєстрували кращий клінічний терапевтичний ефект, підтверджений біохімічними показниками концентрацій АСТ і АЛТ, у порівнянні з контрольною (1-ю), в якій проводили тільки стандартне лікування без ад'ювантної антибіотикотерапії.

Результати та їх обговорення

АСТ та АЛТ – цитоплазматичні ферменти, що виділяються під час клітинної загибелі чи ураженні, а підвищення рівнів ензиматичної активності чітко пов'язане з ділянками активного перебігу запалення пародонту. Ділянки з тяжким запаленням ясен і прогресуючою втратою прикріплення характеризуються значним підвищенням АСТ у кревікулярній рідині [11].

У дослідженнях серед пацієнтів з пародонтитом, активність АСТ у слині була достовірно підвищена (у 5 раз) порівняно з контрольною групою, а зміни активності АЛТ, також у слині, не досягали вірогідності [17]. Рівень АСТ у слині був достовірно підвищений у групі пацієнтів, які мали більш тяжкий пародонтит. Кровоточивість ясен і нагноєння відзначено у 20% осіб, у яких концентрація АСТ у слині була підвищена у тричі, порівняно з контролем. Серед більшої когорти пацієнтів рівень АСТ залежав від тяжкості пародонтиту, також підвищувався і рівень АЛТ [9]. Також, наукові дослідження свідчать про зниження рівнів АСТ і АЛТ у слині у пацієнтів з ХГП після скейлінгу [18].

Концентрації АСТ і АЛТ при пародонтиті пов'язують з типом тканинного некрозу [9, 16, 22]. Фібробласти періодонтальної зв'язки продукують значно менші рівні амінотрансфераз, ніж ясенні епітеліоцити [7], що підтверджує тісний зв'язок концентрації АЛТ та АСТ у ПК та активності руйнування саме пародонту.

Ми проводили визначення концентрації АСТ та АЛТ у ділянках клінічно найактивнішого перебігу пародонтиту, безпосередньо у ПК, що мало б більш точно відображати сумарну активність руйнування періодонтальної зв'язки, яка є, по суті, субстратом ХГП. Концентрації АСТ та АЛТ інтерпретували як показники активності неспецифічного запалення у пародонтальних кишнях [17,19].

Порівнюючи зміни концентрацій АСТ та АЛТ з динамікою клінічних показників, у 1-й групі на термін

90±5 днів і індекси, і концентрації АСТ та АЛТ поверталися до значень, як до лікування (рис. 1, 2). Отже, динаміка клінічних і біохімічних показників у 1-й групі співпадала за часом.

У 2-й групі показники АСТ та АЛТ з терміну 90±5 днів починали поступово зростати, залишаючись при цьому достовірно нижче вихідних значень і нижче середніх значень 1-ї групи. Але через півроку спостереження рівень АСТ не відрізнявся від вихідних показників, а середня концентрація АЛТ навіть була вище, ніж до лікування. Отже, за цими показниками, через півроку ефект терапії втрачався. В той самий час, значення клінічних індексів гігієни, зубного каменю, РМА, ІК, рухомості зубів та середня глибина ПК були достовірно зменшені, ніж до лікування. Зростала лише рецесія ясен у цій групі. Тож, спостерігається тенденція, коли біохімічні показники неспецифічного запалення зростали з випередженням клінічного погіршення, при короткочасній ад'ювантній терапії азитроміцином.

У 3-й групі на 14 день, коли антибіотикотерапія тривала, достовірно зростала середня концентрація АЛТ у ПК, коли в інших двох групах ця концентрація знижувалася, що потребує обговорення. Так, відомо, що азитроміцин викликає дегрануляцію нейтрофілів, доказами якої є підвищення рівня лізосомальних ферментів у плазмі крові і зниження їх активності в макрофагах після прийому першої дози азитроміцину. Після стандартного курсу антибіотикотерапії (по 500 мг азитроміцину на добу протягом 3 днів) рівень ферментів у крові залишається певний час високим, і одночасно – за механізмом зворотного зв'язку – відбувається накопичення гранул в нейтрофілах, що забезпечує пролонгацію антиінфекційної захисту. Одночасно з підвищенням рівня лізосомальних ферментів індукується хемотаксис макрофагів до вогнища запалення. Таким чином, відбувається істотне підвищення антиінфекційного бар'єру через залучення нових пулів лейкоцитів і активацію їх функцій [1]. Також, азитроміцин стимулює «оксидативний вибух» в макрофагах. Цей ефект досить тривалий і забезпечує активацію фагоцитів [6]. Очевидно, ці процеси можуть пояснювати певне транзиторне підвищення активності і АЛТ у locus morbid.

У 3-й групі концентрація АСТ знижувалися, як і у 2-й групі, з 14±3 дні після початку ППЛ 1, АЛТ – з 30±5 дня, але більш значно вони знизилися на третій місяць, коли антибіотикотерапія щойно завершилася. З терміну близько півроку всі значення повільно зростали, залишаючись достовірно нижче вихідних (тобто, до лікування) на кінець дослідження (див. рис. 1, 2). Така сама тенденція відмічена і для клінічних показників 3-ї групи, хоча біохімічні показники зростали з

певним випередженням, як і у 2-й групі. Лабораторні показники неспецифічного запалення при довготривалій терапії азитроміцином зростали з випередженням клінічного погіршення.

Важливість діагностичного визначення концентрацій АСТ, АЛТ у пародонтальних кишнях при різних формах хронічного пародонтиту складно переоцінити. Стандартні методи клінічного моніторингу мають ряд недоліків. Так вимірювання глибини ПК за правилами проводять у *шести* точках навколо кожного зуба, рівень прикріплення залежить від рівня рецесії ясен, який збільшується після зменшення явищ запалення, що не відображає активність запалення на момент вимірювання і за подальшими розрахунками. Далі, рівень деструкції міжальвеолярних перетинок, що є центральним об'єктивним показником для встановлення ступеня тяжкості хронічного пародонтиту, відображає головним чином кумулятивну деструкцію, але не активність запалення у даний момент, тому має клінічне значення для ортопедичного лікування чи видалення зуба, у більшій мірі, ніж у якості показання до проведення пародонтальної протизапальної терапії. Крім того, внаслідок меншої товщини міжкороневих перетинок у фронтальній ділянці нижньої щелепи, рівень деструкції тут буде більший і швидший. У бокових же відділах до сьогодні орієнтуються на інструментальне визначення кісткових кишень, кількості їх стінок і т.п., що також є досить трудоемким та займає не менше часу, ніж зняття назубних відкладень.

На відміну від визначення концентрацій АЛТ, АСТ у ротовій рідині, вимірювання активності цих ензимів у пародонтальних кишнях більш точно відображає локальний статус, оскільки на склад ротової рідини впливає, у першу чергу, стан слинних залоз та СОПР [9, 17]. Отже, діагностичне визначення концентрацій АСТ, АЛТ у пародонтальних кишнях давно має зайняти чільне місце серед стандартних скринингових методик для визначення показань до протизапального пародонтологічного лікування, завдяки своїй простоті, швидкості і недорогій вартості.

Висновки

1. Визначення саме в пародонтальних кишнях концентрацій АЛТ, АСТ може бути чутливим, доступним, зручним і простим методом визначення активності запальної деструкції періодонту у конкретній ділянці.

2. Біохімічні показники неспецифічного запалення у вигляді концентрацій АСТ та АЛТ в пародонтальних кишнях можуть підвищуватися з випередженням клінічного погіршення, вимірюваного стандартними пародонтологічними індексами, щонайменше на 1 місяць.

3. Моніторинг біохімічних показників АСТ та АЛТ в пародонтальних кишнях, в цілому, підтвердив найкращий ефект тривалого курсу азитроміцину.

Література

1. Карпов О.И. Макролиды: новая парадигма - фармакодинамика/иммунотерапия [Электронный ресурс] / О.И. Карпов // Клиническая фармакология и терапия.-2005.-Т. 14, №5.-Режим доступа к журн. : <http://medi.ru/DOC/1475187.htm>.
2. Клинико-метаболическая база данных по хроническому генерализованному пародонтиту / Э.М. Гильмияров, В.П. Бережной, И.Е. Гильмиярова, В.П. Тлустенко // Стоматология.-2008.-№5.-С.23-26.
3. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині [Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.; під ред. Кайдашева І.П.- Полтава: Полімет, 2003.-319с.

4. Очерки иммунобиологии слизистой оболочки полости рта / [Кайдашев И.П., Шинкевич В.И., Король Д.М. и др.]; под ред. И.П. Кайдашева.-Полтава: Полімет, 2008.-310с.
5. Шинкевич В.И. Характеристика иммунных клеток слизистой оболочки ясен при хроническом генерализованном пародонтите відповідно ступенів тяжкості / В.И. Шинкевич, І.П. Кайдашев // Імунологія та алергологія.-2004.-№4.-С.15-19.
6. Amsden G. Anti-inflammatory effects of macrolides - an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? / G. Amsden // J. Antimicrob. Chemother.-2005.-Vol. 55, N 1.-P.10-21.
7. Analysis of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid assessed by using PocketWatch: a longitudinal study with initial therapy / K. Shimada, T. Mizuno, K. Ohshio et al. // J. Clin. Periodontol.-2000.-Vol.27, N 11.-P.819-823.
8. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial / E. Sampaio, M. Rocha, L.C. Figueiredo et al. // J Clin Periodontol.-2011.-Vol. 38, N 9.-P.838-846.
9. Current developments in salivary diagnostics / C.S. Miller, J.D. Foley, A.L. Bailey et al. // Tex Dent J.-2010.-Vol.127, N 7.-P.651-661.
10. Effects of periodontal non-surgical therapy plus azithromycin on glycemic control in patients with diabetes: a randomized clinical trial [Електронний ресурс] / J.E. Botero, F.L. Yepes, S.P. Ochoa et al. // J Periodontal Res.-2013.-Vol. 27.-Doi: 10.1111/jre.12058.
11. Gupta G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- I: Host derived enzymes and tissue breakdown products / G. Gupta // J Med Life.-2012.-Vol. 5, N 4.-P.390-397.
12. Hannig C. Transaminases in the acquired pellicle / C. Hannig, B. Spitzmuller, M. Hannig // Arch. Oral Biol.-2009.-Vol.54, N 5.-P.445-448.
13. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease / C.A. Ramseier, J.S. Kinney, A.E. Herr et al. // J Periodontol.-2009.-Vol.80, N 3.-P.436-446.
14. Kinney J.S. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis / J.S. Kinney, C.A. Ramseier, W.V. Giannobile // Ann N Y Acad Sci.-2007.-Vol.1098.-P.230-251.
15. Mouth: A portal to the body / D. Gude, R.R. Koduganti, S.J. Prasanna, L.R. Pothini // Dent Res J (Isfahan).-2012.-Vol. 9, N 6.-P.659-664.
16. Relationship between levels of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid and conventional measures of periodontal status assessed using PocketWatch: a cross-sectional study / K. Shimada, T. Mizuno, T. Uchida et al. // J. Oral Sci.-1999.-Vol.41, N 1.-P.35-40.
17. Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? / A. Totan, M. Greabu, C. Totan, T. Spinu // Clin. Chem. Lab. Med.-2006.-Vol.44, N 5.-P.612-615.
18. Salivary enzyme levels after scaling and interleukin-1 genotypes in Japanese patients with chronic periodontitis / H. Yoshie, H. Tai, T. Kobayashi et al. // J. Periodontol.-2007.-Vol.78, N 3.-P.498-503.
19. Screening of periodontitis with salivary enzyme tests / Y. Nomura, Y. Tamaki, T. Tanaka et al. // J. Oral Sci.-2006.-Vol.48, N 4.-P.177-183.
20. Sherman K.E. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. / K.E. Sherman // Arch. Intern. Med.-1991.-Vol.151, N 2.-P.260-265.
21. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity / J. Ozer, M. Ratner, M. Shaw, W. Bailey, S. Schomaker // Toxicology.-2008.-Vol.245, N 3.-P.194-205.
22. Yucekal-Tuncer B. Gingival crevicular fluid levels of aspartate amino transferase, sulfide ions and N-benzoyl-dl-arginine-2-naphthylamide in diabetic patients with chronic periodontitis / B. Yucekal-Tuncer, C. Uygur, E. Firatli // J. Clin. Periodontol.-2003.-Vol.30, N 12.-P.1053-1060.

English version: LEVELS OF ALANINE- AND ASPARTATE AMINOTRANSFERASES IN PERIODONTAL POCKETS IN OUTCOMES OF CHRONIC PERIODONTITIS THERAPY WITH AZITHROMYCIN*

Skrypnykov P., Nepokupna-Slobodyanyuk T. *, Shynkevich V.

Higher state educational establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava;

* Dental Clinic of Company with Limited Liability "Medikol plus", Kyiv

Using of objective criteria of treatment efficiency of chronic periodontitis in clinical trials is an important issue. Therefore, establishing the relationship of ALT and AST levels with the clinic outcomes of chronic periodontitis treatment in two modes of azithromycin use could confirm the effectiveness of treatment. After the standard periodontal treatment of chronic generalized periodontitis (CGP) I-III severity, 60 patients were divided equally into 3 groups. In group 2 and 3 azithromycin was administered: 500 mg 1 time per day, for 3 days, and 500 mg 1 time per day, for 7 days, followed by 500 mg 1 time per week for 12 weeks. Clinical indexes and AST, ALT concentrations were evaluated before treatment and in 1 week time and then in 2, 3, 6, 12 months. An exacerbation of CGP reported in 65% of patients in 3 months of standard treatment, the levels of AST, ALT in the group did not differ from the state before treatment. An exacerbation of CGP reported in 50% of patients in 6 months in group 2 and increased levels of AST, ALT was observed. Reduced AST and ALT levels (64.4 ± 26.9 ; 76.6 ± 22.0 U/L) confirmed the clinical benefit of therapy in the third group (20% of exacerbations CGP) in comparison with group 1 (110.7 ± 17.5 ; 104.9 ± 22.0 U/L) and 2 (82.9 ± 18.6 ; 95.2 ± 27.3 U/L), but levels were higher than in previous periods of research ($p < 0.05$). The evaluation of ALT, AST in periodontal pockets can be sensitive, suitable, convenient and simple method to determine inflammatory periodontal destruction activity.

Key words: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, chronic generalized periodontitis, azithromycin.

Persistent subgingival bacterial plaque induces host immune response causing tissue destruction by activating universal destructive mechanisms in chronic generalized periodontitis (CGP) [4, 5]. Conventionally, two related inflammation types support the CGP progression - immune and non-specific, and there are a range of metabolites to assess inflammation activity [2, 13, 14]. Alanine and aspartate aminotransferases (ALT, AST) are cytoplasmic enzymes that have importance to amino acids synthesis, and release from destroyed cells [20, 21]. ALT and AST is always present in the oral fluid, secretions of the salivary glands [17, 19], periodontal ligament, gingival crevicular fluid and enamel pellicle [12] in some concentration.

Periodontal pathogenic bacteria penetrate periodontal tissues and blood at CGH, so it is difficult to eradicate [15]. Azithromycin is semisynthetic antibiotic-macrolide of second generation which has effectiveness against microbial biofilm due appropriate antimicrobial spectrum [8] and immunomodulating properties by accumulation in neutrophils, macrophages, fibroblasts, showing antibacterial, anti-inflammatory and regenerative effects [10].

The aim of study was to establish the relationship of ALT and AST concentrations with clinical parameters of periodontal status in outcomes of CGP complex conservative treatment in two modes of azithromycin using to confirm effectiveness of treatment.

Contingents and methods.

The study was conducted at bases of Department of postgraduate dentists education, State higher educational establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Dental Clinic of Company with Limited Liability "Medikol plus", Kyiv and Research Institute for Genetic and Immunological Bases

of Pathology and Pharmacogenetic of Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava. The study was approved by the Bioethical Committee of Ukrainian Medical Stomatological Academy.

The trial was conducted on 60 chronic periodontitis patients, aged 23-65 years, with CGP I, II and III levels of severity. Before enrolling in the clinical trial, all patients were screened and their diagnosis were verified. The patients were examined for complete blood count, blood glucose, periodontal clinical parameters (PPD, BoP and CAL), x-ray. All patients received the same initial periodontal treatment (IPT), which included scaling and root planing, irrigation and instillation in periodontal pockets (PC) 2% chlorhexidine, periodontal dressing "Parasept" (Vladmyva, Russia), oral hygiene instructions, seals and restorations correction or replacement, occlusal adjustment when indicated, and supportive periodontal therapy (SPT) when indicated, according to the standard protocol.

Criteria for inclusion in the study: 1) signing the informed consent, 2) a patient suffers from CGP I, II, III severity. Criteria for exclusion: 1) heavy non-control internal diseases, or neuropsychiatric disorders, 2) the presence of other conditions as determined by the patient's inability to understand the nature and possible consequences of the study.

Patients were randomly assigned into three groups of 20 people after initial periodontal treatment and sanation measures. The patients of the 1st group received initial periodontal treatment and supportive periodontal therapy when indicated, according to the standard protocol. In group 2 and 3 azithromycin ("Azymed", "Kievmedpreparat", Ukraine) was administered: by mode short-term prescribing 500 mg 1 time per day, 3 days; and by long-term prescribing 500 mg 1 time per day, 7 days, followed by 500 mg 1 time per week for 12 weeks.

* To cite this English version: Skrypnykov P., Nepokupna-Slobodyanyuk T. *, Shynkevich V. Levels of alanine- and aspartate aminotransferases in periodontal pockets in outcomes of chronic periodontitis therapy with azithromycin / / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 51 -55.

Clinical indexes and AST, ALT concentrations were evaluated before treatment and in 14±3, 30±5, 90±5, 180±5 and 360±5 days.

Clinical dental examination included the determination of subjective well-being of patients using a visual analog scale, assessment of hygiene index (HI) Fedorova-Volodkinoi, HI and index of dental calculus Green Vermillion (OHI-S = DI+CI), probing Shyllera-Pisareva (PS-P), PMA, periodontal index Russell's (PI), probing pocket depth (PPD), gingival recession (GR), index of teeth pathological mobility (TM), bleeding on probing (BoP), signs of traumatic occlusion.

The material for the study of ALT and AST were samples of periodontal pockets content received with paper pins. Sample obtained from one or two PCs of the same teeth, which was determined as active inflammation: area was isolated from oral fluid, supragingival plaque was removed, tooth was dried, pins gently submerged into periodontal pocket edge 1-2 mm and heated for 30 seconds. Pins with samples were put into sterile dry ependorfes, and delivered to the laboratory within 12 hours. They were stored at -80°C

prior evaluation. And they were transported from Kiev in a thermos with freezing elements. Determination of ALT, AST was performed by kinetic photometric (dinitrofenilhidrazyn) method using a kit "Bio-La-Test" (Czech Republic) as previously described [3].

The results were assessed statistically using the method of t-test for independent or dependent variables, chi-square test (χ^2) with Yates's correction. Complete blood count and blood glucose in patients were spent in certified clinical laboratories of Kyiv and Poltava, according to standard methods.

Results.

Periodontitis patients were recruited and randomized into three groups of clinical research, balanced for age, sex, CGP severity, clinical features and comorbidities that were compensated.

Average baseline data of clinical indexes for three groups did not differ clinically significantly (shown in Table 1). Results of X-rays researches showed irregular type of interalveolar bone destruction, the destruction level confirmed the CGP severity.

Table 1
Average clinical indexes before initial periodontal treatment

Groups	HI F.-V., scores	OHI-S DI, scores	OHI-S CI, scores	PMA, %	BoP, scores	TM, scores	PPD, mm	GR levels, mm	PI Russell's, scores
1	2.75±0.33	2.00±0.33	1.44±0.67	67.60±15.97	2.11±0.62	0.61±0.65	1.60±0.89	1.47±0.76	3.80±1.25
2	3.46±2.22	2.41±0.21*	1.42±0.77	66.05±19.29	2.0±0.62	0.73±0.52	1.29±0.72	1.72±0.83	3.75±1.28
3	3.30±0.61*	2.56±0.68*	1.27±0.74	68.75±17.88	1.95±0.43	0.52±0.54**	1.64±0.85**	1.23±0.71**	3.80±1.05

Note. Statistical analysis by t-test for independent variables: the data are presented as the sample mean (M) ± standard deviation (SD, δ); * - $p < 0.05$ when compared to 1st group; ** - $p < 0.05$ to 2nd.

ALT and AST levels had significant individual deviations before treatment, but the overall pattern was quite high in average: 102.4±13.7 U/l; 89.0 ±11.7 - in group 1, 95.0±23.6; 83.7±10.1 - in the 2nd, 111.0±34.8 and 95.3±18.2 - in the 3rd, which did not differ significantly.

In 14±3 days after IPT, all patients in groups showed self-esteem improvement, that was reflected in a significant increase in visual scale scores (from 43.60±20.39 to 80.70±11.30* in group 1, from 45.80±18.87 to 77.70±16.75* in the 2nd and from 45.60±18.61 to 75.1±20.90* - in the 3rd). Average AST concentration decreased significantly among patients of the 3rd group as compared with 1st, and 2nd. Periodontal pockets ALT level increased at the term in patients of group 3 (Fig. 1, 2).

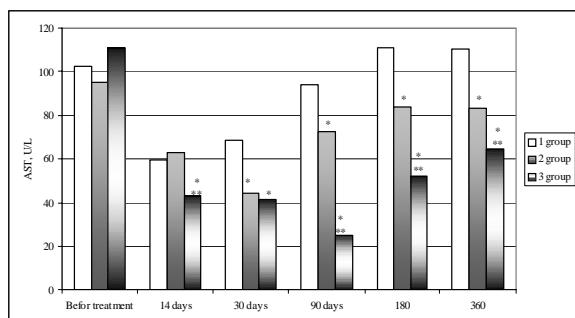


Fig. 1. Comparative average AST concentrations dynamics in periodontal pockets in patients groups

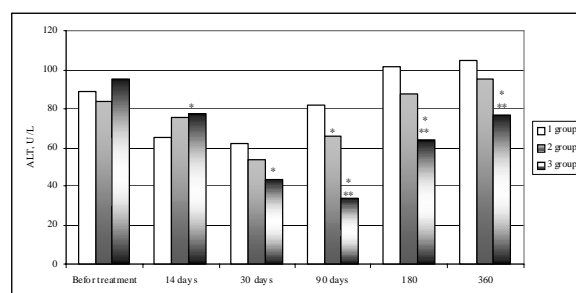


Fig. 2. Comparative average ALT concentrations dynamics in periodontal pockets in patients groups

In 30±5 days after treatment, all clinical indexes in groups improved significantly and did not differ between groups, but the average level of gingival recession was lower in the 3rd groups (1.53±0.89), compared to the 1st (1.97±0.99), $p < 0.05$. It was interesting a dramatic decrease of average BoP in 2nd (0.54±0.33) and 3rd group (0.44±0.33) compared with baseline values ($p < 0.05$). That can be explained by azithromycin clinical efficacy compared to only standard local IPT. The average AST concentrations in the 2nd and 3rd groups were significantly lower than in the 1st (Fig. 1). The average ALT concentration was significantly decrease in 3rd group versus 1st group (Fig. 2), which may reflect the additional benefice in the 3rd group within 1 month after IPT.

In 90 ± 5 days visual analogue scale values remained significantly elevated in all groups. The average HIs were significantly lower in the 3rd group, compared to the 1st. indexes Average indexes of dental calculus, PMA, BoP,

PI, PPD were exceeded those in group 1 versus other groups. In the 3rd group, the lowest value of GR was observed (data not shown). So, clinical IPT effects were not enough in the 1st group after 3 months: CGP exacerbations were registered in 13 of 20 patients (65%) (they had received SPT). Thus, clinically, the effect of treatment in group 1 lasted up to 3 months in 35 % of patients. The lowest concentrations of ALT and AST were registered in the 3rd group, compared with others (Fig. 1, 2). In 2nd group ALT and AST levels were lower

compared to the 1st, indicating the lowest therapy effect in group 1, that consistent and complement clinical data.

In 180±5 days of observation the best self-esteem recorded in the 3rd patients group according to visual scale data. The best hygienic condition, the lowest level of clinical inflammation was observed in the 3rd group. The highest indexes of dental calculus and PI Russell's were in group 1 (Table 2). CGP exacerbations were registered in 9 patients in 1st and 10 – in 2nd group at this stage of researches.

Table 2
Clinical parameters comparison between 1, 2 and 3 groups after 180±5 days of observation

Indices	Groups		
	1	2	3
Visual scale values, mm	70.20±24.92	68.05±26.05	84.65±20.86* **
HI F.-V., scores	2.34±0.4	2.29±0.43	1.99±0.49* **
OHI-S DI, scores	1.40±0.58	1.48±0.35	1.21±0.54 **
OHI-S CI, scores	0.57±0.53	0.24±0.28*	0.09±0.15 *
PMA, %	57.85±14.71	53.45±14.56	49.50±14.12 *
BoP, scores	1.40±0.95	1.17±0.92	0.05±0.07* **
TM, scores	0.48±0.49	0.52±0.40	0.22±0.30 * **
PPD, mm	1.20±0.52	1.11±0.57	1.10±0.61
GR, mm	2.27±1.08	2.01±1.03	1.52±0.88 * **
PI Russell's, scores	4.08±1.41	3.75±1.03	3.56±1.18*

In about six months after IPT average AST and ALT concentrations in patients of 3rd group observed pattern as for the previous stage – its were the lowest. In group 2, there are signs of gradual increase in inflammation in the form of an increase in the mean concentration of

ALT, which now does not differ significantly from the 1st group (see Fig. 2).

In 360 ± 5 days of observation the best self-esteem was in patients of the 3rd group. This group was characterized by significantly better performance for almost all indexes (Table 3).

Table 3
Clinical parameters comparison between 1, 2 and 3 groups after 360±5 days of observation

Indices	Groups		
	1	2	3
Visual scale values, mm	62.0±22.94	57.75±23.91	82.98±17.72 * **
HI F.-V., scores	2.46±0.35	2.35±0.29	2.12±0.47 * **
OHI-S DI, scores	1.37±0.59	1.55±0.39	1.39±0.41
OHI-S CI, scores	0.67±0.54	0.28±0.25*	0.18±0.19*
PMA, %	64.35±17.08	55.70±14.04*	49.80±13.96*
BoP, scores	1.75±0.76	1.46±1.01	0.06±0.09* **
TM, scores	0.58±0.54	0.54±0.43	0.23±0.80* **
PPD, mm	1.47±0.66	1.21±0.57	1.12±0.65*
GR, mm	2.47±1.05	2.24±1.0	1.55±0.90* **
PI Russell's, scores	4.25±1.36	3.87±1.32	3.53±1.20*

This group remains stable previous trend for AST and ALT levels. Reduced AST and ALT concentration (64.4±26.9; 76.6±22.0 U/L) confirmed the clinical benefit of therapy in the 3rd group (20% CGP exacerbations) compared to the 1st (110.7±17.5; 104.9±22.0 U/L) and 2nd (82.9±18.6; 95.2±27.3 U/L), at higher concentrations than in the previous study periods (p<0.05). Average concentration of ALT was not significantly different in group 2 and 1st at the end of the study.

Thus, in the 2nd and 3rd groups recorded the best clinical therapeutic effect confirmed by biochemical indices of AST and ALT levels compared with controls (1st group), which received only the standard treatment without adjuvant antibiotic therapy.

Discussion

AST and ALT are cytoplasmic enzymes released during cell death or lesion, and increased levels of enzymatic activity is clearly associated with sites of active periodontal inflammation. Sites with severe gingivitis and

progressive loss of attachment are characterized by a significant AST increasing in crevicular fluid [11].

In studies in patients with periodontitis, the activity of AST in saliva was significantly increased (5 times) compared with control, and ALT activity changes in saliva not reaching significance [17]. Saliva AST level was significantly increased in patients who had more severe periodontitis. Bleeding gums and suppuration was observed in 20% of those in which the concentration of AST in saliva was increased three times compared to the control. Among the larger cohort of patients AST level was dependent on the severity of periodontitis, and ALT level was increased also [9].

Research shows AST and ALT levels decreasing in saliva of patients with CGP after scaling [18].

AST and ALT concentrations in periodontitis are associated with the type of tissue necrosis [9, 16, 22]. Periodontal ligament fibroblasts produce significantly lower levels of aminotransferases than gingival epithelial cells [7], which confirms the close relationship of ALT and

AST activity in periodontal pockets and its periodontal destruction.

We determined AST and ALT concentrations in the most active clinically sites of periodontitis, directly to the periodontal pockets, which would more accurately reflect the total activity of periodontal ligament destruction, which is, in fact, substrate of chronic periodontitis. AST and ALT concentrations were interpreted as indicators of nonspecific inflammation activity in periodontal pockets [17, 19].

When comparative changes in AST, ALT concentrations and clinical parameters dynamics were measured it was suggested clinical indexes and AST, ALT levels returned to baseline values in group 1 at day 90th±5 (Fig. 1, 2). Thence, clinical and biochemical dynamics in group 1 matched at time.

In group 2 AST and ALT levels began to grow at 90th±5 day, while remaining significantly below baseline data and below average values of the 1st group. But after six months observation AST levels did not differ from the baseline once. And mean ALT concentration was even higher than before treatment. Thus, according to these findings, treatment effect was lost after six months. At the same time, the value of clinical indexes of hygiene, plaque, PMA, BoP, teeth mobility and an average PPD were significantly decreased than before treatment. GR increased in that group along. Therefore, there is an advancing tendency for the biochemical nonspecific inflammation parameters in comparing with clinical impairment at short-term adjuvant therapy with azithromycin.

ALT concentration significantly increased in 3rd group on day 14th, when antibiotic treatment was lasting. But the concentration decreased in other two groups, which requires discussion. It is known azithromycin causes degranulation of neutrophils, evidence of which is lysosomal enzymes increasing in plasma and decreasing in macrophages after the first dose of azithromycin. After a standard course of antibiotic therapy (500 mg of azithromycin daily, for 3 days) the level of enzymes in the blood remained high for some time, and at the same time granules accumulates in neutrophils by feedback mechanism, thus provides prolonged anti-infective protection. Chemotaxis of macrophages into inflammatory focus is induced at the same time with lysosomal enzymes levels increasing. Thus, significant anti-infective barrier increasing occurs through attracting new pools of leukocytes and their function activation [1]. Also, azithromycin promotes "oxidative burst" in macrophages. This effect is very long and provides activation of phagocytes [6]. Obviously, these processes can explain some transient ALT increasing in locus morbid.

In the 3rd group AST concentrations decreased, as in group 2, at day 14th ± 3 after IPT, ALT – at day 30th±5, but more significantly, they fell down at third month, when the antibiotic has just ended. On the period of about six months, ALT, AST values increased slowly, remaining significantly below the baseline (ie, before treatment) at the end of the study (see Fig. 1, 2). A similar trend was noted for clinical indicators of 3rd group, although biochemical parameters increased with some advance, as in group 2. Laboratory nonspecific inflammation parameters increased prior to clinical impairment at long therapy with azithromycin.

Importance of diagnostic AST, ALT concentrations determination in periodontal pockets at different forms of

chronic periodontitis is difficult to overestimate. Standard methods of clinical monitoring have several disadvantages. So pockets depth measurement should be carried out in six points around each tooth. Attachment level depends on the level of gingival recession, which increases after inflammation reduction, thus does not reflect active inflammation at the time of measurement and for further calculations. Further, the level of interalveolar bone destruction, which is a central objective measure to establish the severity of periodontitis, reflects mainly the cumulative destruction, but no active inflammation at the moment, so has clinical implications for orthopedic treatment or tooth extraction better than as indications for anti-inflammatory periodontal therapy. In addition, due to smaller thickness interradicular bone at the frontal, the level of destruction happened greater and faster. Instrumental determination of bone pockets, number of its walls, etc., still guided in lateral dental regions, and it is also quite time consuming rather than removal of dental plaque.

In contrast to ALT, AST determination in oral fluid, its measuring in periodontal pockets more accurately reflects local status, since the composition of oral fluid depends on salivary glands condition and oral mucous first of all [9, 17]. Thus, diagnostic of AST, ALT determination in periodontal pockets should take a prominent place among the standard screening methods to determine periodontal treatment outcomes due its simplicity, speed and inexpensive cost.

Conclusions

1. ALT, AST levels determination in the periodontal pockets can be sensitive, reasonable, convenient and easy method to determine the activity of inflammatory periodontal destruction at a certain periodontal site.

2. Biochemical AST and ALT levels reflected nonspecific inflammation activity in periodontal pockets may increase prior for at least one month to clinical impairment measured by standard periodontal indexes.

3. Biochemical AST, ALT monitoring in periodontal pockets confirmed the best effect of long adjuvant course of azithromycin.

References

1. Karpov O.I. Macrolides: a new paradigm - pharmacodynamics / immunomodulation [electronic resource] / O. Karpov // Clinical Pharmacology and terapiya.-2005.-T. 14, № 5.- access to journal.: <http://medi.ru/DOC/1475187.htm>.
2. Clinical and metabolic database of chronic generalized periodontitis / E.M. Gilmiyarov, V.P. Gentle, I.E. Gilmiyarova, V.P. Tlustenko // Stomatologiya. 2008. - № 5.-P.23-26.
3. Methods for clinical and experimental research in medicine [Berkalo L.V. Bobovich A.V., Bobrova N.A. and others.], ed. by Kaydashev I.P. - Poltava: Polimet, 2003.-319p.
4. Essays of immunobiology of the oral mucosa / [Kaydashev I.P., Shinkevich V.I., Korol D.M.et al.], ed. by I.P. Kaydashev.-Poltava: Polimet, 2008.-310p.
5. Shynkevych V.I. Characterization of immune cells from gingiva mucosa at chronic generalized periodontitis according to severity / V.I. Shynkevych, I.P. Kaydashev // Immunologiya and Alerholohiya.-2004. - № 4.-P.15-19.
6. Amsden G. Anti-inflammatory effects of macrolides - an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? / G. Amsden // J. Antimicrob. Chemother.-2005.-Vol. 55, N 1.-P.10-21.
7. Analysis of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid assessed by using PocketWatch: a longitudinal study with initial therapy / K. Shimada, T. Mizuno, K. Ohshio et al. // J. Clin. Periodontol.-2000.-Vol.27, N 11.-P.819-823.

8. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial / E. Sampaio, M. Rocha, L.C. Figueiredo et al. // J Clin Periodontol.-2011.-Vol. 38, N 9.-P.838-846.
9. Current developments in salivary diagnostics / C.S. Miller, J.D. Foley, A.L. Bailey et al. // Tex Dent J.-2010.-Vol.127, N 7.-P.651-661.
10. Effects of periodontal non-surgical therapy plus azithromycin on glycemic control in patients with diabetes: a randomized clinical trial [Електронний ресурс] / J.E. Botero, F.L. Yepes, S.P. Ochoa et al. // J Periodontal Res.-2013.-Vol. 27.-Doi: 10.1111/jre.12058.
11. Gupta G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- I: Host derived enzymes and tissue breakdown products / G. Gupta // J Med Life.-2012.-Vol. 5, N 4.-P.390-397.
12. Hannig C. Transaminases in the acquired pellicle / C. Hannig, B. Spitzmuller, M. Hannig // Arch. Oral Biol.-2009.-Vol.54, N 5.-P.445-448.
13. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease / C.A. Ramseier, J.S. Kinney, A.E. Herr et al. // J Periodontol.-2009.-Vol.80, N 3.-P.436-446.
14. Kinney J.S. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis / J.S. Kinney, C.A. Ramseier, W.V. Giannobile // Ann N Y Acad Sci.-2007.-Vol.1098.-P.230-251.
15. Mouth: A portal to the body / D. Gude, R.R. Koduganti, S.J. Prasanna, L.R. Pothini // Dent Res J (Isfahan).-2012.-Vol. 9, N 6.-P.659-664.
16. Relationship between levels of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid and conventional measures of periodontal status assessed using PocketWatch: a cross-sectional study / K. Shimada, T. Mizuno, T. Uchida et al. // J. Oral Sci.-1999.-Vol.41, N 1.-P.35-40.
17. Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? / A. Totan, M. Greabu, C. Totan, T. Spinu // Clin. Chem. Lab. Med.-2006.-Vol.44, N 5.-P.612-615.
18. Salivary enzyme levels after scaling and interleukin-1 genotypes in Japanese patients with chronic periodontitis / H. Yoshie, H. Tai, T. Kobayashi et al. // J. Periodontol.-2007.-Vol.78, N 3.-P.498-503.
19. Screening of periodontitis with salivary enzyme tests / Y. Nomura, Y. Tamaki, T. Tanaka et al. // J. Oral Sci.-2006.-Vol.48, N 4.-P.177-183.
20. Sherman K.E. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. / K.E. Sherman // Arch. Intern. Med.-1991.-Vol.151, N 2.-P.260-265.
21. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity / J. Ozer, M. Ratner, M. Shaw, W. Bailey, S. Schomaker // Toxicology.-2008.-Vol.245, N 3.-P.194-205.
22. Yucekal-Tuncer B. Gingival crevicular fluid levels of aspartate amino transferase, sulfide ions and *N*-benzoyl-dl-arginine-2-naphthylamide in diabetic patients with chronic periodontitis / B. Yucekal-Tuncer, C. Uygur, E. Firatli // J. Clin. Periodontol.-2003.-Vol.30, N 12.-P.1053-1060.

Матеріал надійшов до редакції 21.11.2013

© Рузін Г. П., Чирик О. І., Калініченко С. В.*
УДК 616.716.4-001.5-089:612.017]-053.81

ЦИТОКІНОВИЙ СТАТУС ПАЦІЄНТІВ МОЛОДОГО ВІКУ З ПЕРЕЛОМАМИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПРИ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОМУ ЗАСТОСУВАННІ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ*

Рузін Г. П., Чирик О. І., Калініченко С. В.*

Харківський національний медичний університет, м. Харків

*ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», м. Харків

С целью разработки и последующего внедрения в клиническую практику более эффективных методов лечения травматических повреждений челюстно-лицевой области проведено исследование цитокинового профиля у лиц молодого возраста с переломами нижней челюсти. Обследовано 80 человек с травматическими переломами нижней челюсти без сопутствующей соматической патологии, находившихся на лечении в клинике кафедры челюстно-лицевой хирургии ХНМУ: I группа (50 человек) – больные, которые в схеме лечения не получали антибактериальной терапии, II группа (30 человек) – пациенты, которые принимали противомикробные препараты. Установлено, что уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β у лиц с переломами нижней челюсти (как в сыворотке, так и в слюне) был выше в 3,41-5,05 раза ($p<0,05$) по сравнению с величинами показателей практически здоровых лиц. Уровень ИЛ-10 в сыворотке крови был ниже в 1,15 раза ($p<0,05$), тогда как в слюне – наоборот, выше, в среднем, в 2,53 раза ($p<0,05$) по сравнению с показателями контрольной группы. Уровень IFN- γ в сыворотке крови лиц с переломами нижней челюсти достоверно не отличался от аналогичных показателей практически здоровых лиц. Уровень ИЛ-10 в слюне пациентов с переломами было отмечено достоверное повышение уровня этого цитокина, в среднем, в 1,45 раза ($p<0,05$). Корреляционный анализ цитокинового профиля перед началом лечения выявил сильную прямо пропорциональную зависимость между временем поступления пациентов в стационар и исследованными показателями цитокинового профиля (коэффициент корреляции Спирмена составил от 0,90 до 0,96). Выяснено, что через месяц после проведенной терапии у больных, принимавших антибиотики, уровень цитокинов был достоверно ($p<0,01$) ниже по сравнению с данными пациентов, которые в схеме лечения не получали противомикробных препаратов. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что антибиотики угнетают синтез про- и противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: переломы нижней челюсти, цитокины, иммунитет, антибактериальные препараты.

Дана робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицьової хірургії Харківського національного медичного університету «Діагностика та лікування захворювань органів та тканин щелепно-лицьової ділянки», № державної реєстрації 0113U002274.

Серед ушкоджень лицевого скелету найчастіше зустрічаються переломи нижньої щелепи (НЩ), які складають, за даними вітчизняних та зарубіжних клінік, від 70% до 85% [1-3]. При лікуванні переломів щелепно-лицьової ділянки зазвичай використовують комплексну терапію, що складається з адекватного оперативного втручання і протизапального лікування. Разом з тим, далеко не завжди класичні схеми лікування забезпечують позитивні результати. Нерідко розвиваються ускладнення, хронічний перебіг, оскільки стан неспецифічної резистентності організму та імунітету хворого має велике значення в ефективності лікування [4].

Загальновідомо, що травма, незалежно від вихідного загального стану хворого та рівня його імунореактивності, сама по собі спричиняє несприятливий ефект на діяльність основних регуляторних систем організму, що проявляється складним комплексом розладів і викликає пригнічення клітинної та гуморальної ланок імунної системи [4-6].

Дисбаланс місцевої і системної імунної реактивності організму проявляється, насамперед, у зміні цитокиново-

го профілю [5]. Дані зміни варіюють залежно від ступеня пошкодження тканин і відображають процеси місцевого запалення та активації імунних механізмів захисту, причому зміни показників в слині не завжди збігаються з динамікою цитокинового профілю в крові [5-7].

При госпіталізації осіб з переломами НЩ, для профілактики виникнення запальних ускладнень, усім хворим назначають комплексну патогенетичну терапію, до складу якої обов'язково входять антибіотики. Проте, публікації останніх років свідчать, що антибактеріальні препарати є потужними імунодепресантами [8-12]. Тобто, на тлі дисбалансу імунореактивності, вони спричиняють додаткове пригнічення імунної системи. Таке навмисне ослаблення захисних сил організму, в свою чергу, може призвести до інфікування плоскості перелому патогенними й умовно-патогенними мікроорганізмами ротової порожнини з подальшим розвитком запальних ускладнень [13, 14].

Згідно даних літератури, визначення концентрації цитокинів дає інформацію про функціональну активність різних типів імунокомпетентних клітин, розви-

* Цитування при атестації кадрів Рузін Г. П., Чирик О. І., Калініченко С. В.* Цитокиновий статус пацієнтів молодого віку з переломами нижньої щелепи при диференційованому застосуванні антибактеріальної терапії // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 56–59.

ток і тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень та надає можливість прогнозувати подальший перебіг захворювання [4-7].

Метою дослідження стало вивчення рівня прозапальних й протизапальних цитокинів в сироватці крові і слині у осіб молодого віку з переломами нижньої щелепи до та після лікування з використанням різних методів патогенетичної терапії.

Об'єкт і методи дослідження

Обстежено 80 осіб з травматичними переломами нижньої щелепи, без супутньої соматичної патології, що знаходились на лікуванні в клініці кафедри щелепно-лицевої хірургії ХНМУ: I група (50 осіб) – хворі, які в схемі лікування не отримували антибактеріальну терапію, II група (30 осіб) – пацієнти, що приймали протимікробні препарати. Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб, які не мали хронічної стоматологічної патології в анамнезі та не отримували будь-якої медикаментозної терапії за місяць до обстеження.

Показники імунітету досліджували до та через місяць після проведення патогенетичної терапії.

Концентрацію інтерлейкіну-1бета (IL-1 β), інтерлейкіну-10 (IL-10) та інтерферону-гамма (IFN- γ) визначали за допомогою відповідних імуноферментних тест-систем виробництва ЗАО «Вектор-Бест», (Росія), згідно з інструкціями виробника, з вимірюванням оптичної щільності проб на планшетному фотометрі Bio-Tek ELx800, (США).

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики [15-18]. Для вибірок оцінювалась відповідність емпіричних розподілів нормальному закону (розподілення Гауса) за критеріями Колмогорова-Смірнова, Шапіро-Уїлка та Лїллієфорса. Оскільки розподіл досліджуваних вибірок відрізнявся від нормального, для обробки даних використовували непараметричні критерії: відмінності між двома вибірками оцінювали за критерієм Манна-Уїтні, кореляційні зв'язки – за коефіцієнтом кореляції Спірмена.

Результати обробляли за допомогою персонального комп'ютера із застосуванням комп'ютерних програм Statistika-8, Microsoft Office Excel 2003.

Результати та їх обговорення

Відомо, що слинні залози високо чутливі до дії нервових та гуморальних факторів [4, 14]. Розвиток патологічних змін в ротовій порожнині завжди супроводжується реакцією різних ланок її захисту: появи в порожнині рота осередків хронічної інфекції, зниження реактивності організму, мікробної сенсibiliзації тощо [4, 13, 14].

Цитокини є регуляторними пептидами, що приймають участь у формуванні та регуляції захисних сил організму. Так, інтерлейкін 1 β (IL-1 β) запускає реакції запального каскаду, стимулює синтез колагену, відіграє важливу роль у розвитку місцевого запального процесу, приймає участь у формуванні кісткової тканини та є медіатором взаємодії між імунною й нервовою системами. Інтерферон гама (IFN- γ) бере пряму участь у формуванні й розвитку клітинної відповіді (Th1) імунної системи та здійснює регуляторні функції при розвитку гуморальної відповіді (Th2). Зниження здатності клітин продукувати IFN- γ перешкоджає елімінації збудників, що може призводити до розвитку хронічної інфекції. Інтерлейкін 10 (IL-10) має протизапальний й імуносупресивний ефект та викликає «переключення» імунної відповіді з Th1- на Th2-клітини. До того ж, він може пригнічувати протимікробну відповідь на початкових стадіях запалення, проте захищає організм від гіперзапалення й ушкодження тканин [5]. Саме тому поглиблене вивчення ролі цитокинів в процесах життєзабезпечення щільних тканин зубів створює передумови для коректного втручання, як з лікувальною, так і з профілактичною метою.

Дослідження цитокинового профілю у пацієнтів двох основних груп до початку лікування встановило достовірні відмінності показників, порівняючи з показниками умовно здорових пацієнтів (табл. 1).

Таблиця 1
Цитокиновий профіль у обстежених пацієнтів до лікування, (M \pm m)

Рівень цитокинів, (пг/мл)		Групи пацієнтів		
		Пацієнти з переломами НЩ, (n=80)	Практично здорові пацієнти, (n=20)	Референс-показники лабораторії
сироватка	IL-1 β	9,47 \pm 0,86*	1,72 \pm 0,58	0-11,2
	IL-10	4,69 \pm 0,48*	5,41 \pm 0,13	0-31
	IFN- γ	10,61 \pm 0,75	12,76 \pm 1,89	0-10
слина	IL-1 β	7,96 \pm 0,76*	2,33 \pm 0,59	0-3,5
	IL-10	3,60 \pm 0,39*	1,42 \pm 0,19	0-5
	IFN- γ	9,06 \pm 0,7*	6,26 \pm 1,21	0-4

Примітка: * – різниця достовірна між показниками пацієнтів з переломами НЩ і практично здорових осіб (p<0,05).

Згідно отриманих результатів, рівень прозапального цитокіну IL-1 β , як в сироватці крові, так і в слині пацієнтів з переломами нижньої щелепи, був достовірно (p<0,05) вище, в середньому, в 3,41-5,05 разів, порівняно з показниками практично здорових осіб. Таке підвищення IL-1 β вказує на розвиток місцевого запального процесу, можливо, за рахунок дії стресу та наявності змін проникності стінок капілярів.

Встановлено, що у хворих з переломами рівень IL-10 в сироватці крові був, в середньому, нижче в 1,15 разів (p<0,05), тоді як в слині – навпаки, вище, в середньому, в 2,53 рази (p<0,05), порівняно з показниками контрольної групи. На нашу думку, це пов'язано з початком розвитку запального процесу на

місцевому рівні. Таким чином, за зміною рівня IL-10 в біологічних рідинах пацієнтів можливо прогнозувати перебіг хвороби.

Визначено, що у пацієнтів з переломами НЩ, рівень IFN- γ в сироватці крові достовірно не відрізнявся від показників практично здорових осіб, тоді як в слині осіб з переломами відмічалось достовірне підвищення цього цитокіну, в середньому, в 1,45 разів (p<0,05). Таке збільшення рівня IFN- γ , з нашої точки зору, вказує на активацію місцевих механізмів захисту.

Кореляційний аналіз цитокинового профілю у сироватці крові та слині пацієнтів з переломами НЩ залежно від часу їх надходження до стаціонару виявив сильну прямо пропорційну залежність між добою надхо-

дження пацієнту до стаціонару та рівнями досліджених цитокінів перед початком лікування (коефіцієнт кореляції Спірмена склав від 0,9 до 0,96) (рис. 1).

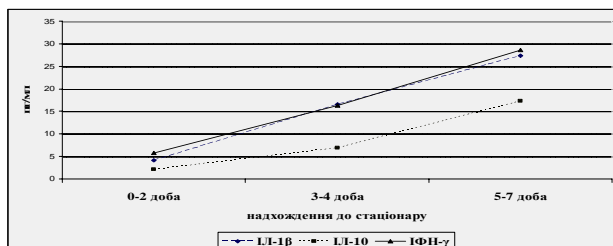


Рис. 1. Кореляційний аналіз цитокінового профілю пацієнтів з переломами НЩ залежно від часу їх надходження до стаціонару.

З'ясовано, що у пацієнтів, на 3-4 добу після травми, рівень ІЛ-1β підвищувався, в 3,7-4,25 разів ($p<0,01$), ІЛ-10 – в 3,0-3,25 разів ($p<0,01$) та ІФН-γ – в 2,7-2,9 разів ($p<0,01$), порівняно з показниками у перші дві доби після травми. На 5-7 день після травми,

рівень цитокінів підвищувався ще більше: ІЛ-1β – в 6,3-6,9 разів ($p<0,01$), ІЛ-10 – в 7,8-8,2 разів ($p<0,01$), ІФН-γ – в 4,7-5,2 разів ($p<0,01$). Зазначене вказує на активну імунну відповідь.

Наступна ланка досліджень була присвячена визначенню рівня цитокінів після терапії (з застосуванням та без застосування антибактеріальних препаратів в комплексі проведеного лікування).

Встановлено, що у хворих, які приймали антибіотики, рівень цитокінів був достовірно ($p<0,01$) нижчим, порівняно з пацієнтами, які в схемі лікування не отримували антибактеріальну терапію. Так, рівень ІЛ-1β був, в середньому, нижче в 4,4-5,6 разів, рівень ІЛ-10 – в 3,0-3,5 разів, а ІФН-γ – в 6,7-9,7 разів. Тобто, у осіб, які отримували в комплексі терапії протимікробні препарати, відбувалось пригнічення продукції як прозапальних, так і протизапальних цитокінів. Отримані дані свідчать про розвиток дисбалансу в імунній системі пацієнтів (табл. 2).

Таблиця 2
Цитокіновий профіль у обстежених пацієнтів після лікування, (М±m)

Клінічні групи хворих	Рівень цитокінів, (пг/мл)					
	ІЛ-1β		ІЛ-10		ІФН-γ	
	у слині	у сироватці крові	у слині	у сироватці крові	у слині	у сироватці крові
I (n=50)	3,47±0,13*	3,89±0,13*	2,92±0,08*	3,33±0,08*	3,61±0,09*	4,16±0,1*
II (n=30)	0,61±0,03*	0,88±0,03*	0,82±0,03*	1,09±0,03*	0,37±0,04*	0,62±0,05*

Примітка: * – різниця достовірна між показниками групи, ($p<0,01$).

Таким чином відбувається різке зниження імунореактивності хворих, які приймали протимікробні препарати. Отримані дані підтверджують висновки науковців про те, що антибактеріальні препарати є потужними імунодепресантами [9-11].

У пацієнтів, які не приймали антимикробні засоби, рівень цитокінів знижувався порівняно з показниками до лікування, але більш повільно, ніж у хворих, що отримували антибактеріальні препарати. Так, в середньому, рівень ІЛ-1β був нижче в 2,2-2,4 рази ($p<0,05$), рівень ІЛ-10 – в 1,2-1,4 рази ($p<0,05$), рівень ІФН-γ – в 2,5-2,6 рази ($p<0,05$) у порівнянні з вихідними показниками (рис. 2).



Рис. 2. Цитокіновий профіль у пацієнтів з переломами нижньої щелепи до та після лікування.

Слід зазначити, що у осіб цієї групи, порівняно з відповідними показниками хворих, які отримували протимікробні препарати, рівень цитокінів був достовірно вищим ($p<0,05$). Це свідчить про захист від розвитку аутоімунних процесів та вказує на подальший сприятливий прогноз перебігу хвороби. Проте, показники цитокінового профілю I клінічної групи не досягали показників контрольної групи (практично здорові особи).

Узагальнюючи отримані результати зазначимо, що у хворих, які в комплексі терапії отримували протимікробні препарати, рівень всіх досліджених цитокінів

був достовірно нижче ($p<0,01$), порівняно з пацієнтами, що не отримували антибіотики. Це свідчить про пригнічення протимікробними засобами імунітету, що в свою чергу, може обумовлювати додаткове ослаблення захисних сил організму. Тобто, зниження імунореактивності макроорганізму може обумовити не ефективну боротьбу з патогенами, створити умови для формування недостатності локальних і системних механізмів ефективного захисту, що в свою чергу, може стати однією з причин розвитку синдрому вторинної імунної недостатності.

Висновки

1. При дослідженні цитокінового профілю всіх пацієнтів з переломами нижньої щелепи до початку лікування встановлено, що рівень прозапального цитокіну ІЛ-1β був вище, в середньому, в 3,41-5,05 разів ($p<0,05$), порівняно з показниками практично здорових осіб.

2. Рівень ІЛ-10 у сироватці крові був, в середньому, нижче в 1,15 разів ($p<0,05$), тоді як в слині – навпаки, вище, в середньому, в 2,53 рази ($p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи.

3. Рівень ІФН-γ у сироватці крові достовірно не відрізнявся від показників практично здорових осіб, тоді як в слині осіб з переломами було відмічено достовірне підвищення цього цитокіну, в середньому, в 1,45 разів ($p<0,05$).

4. Кореляційний аналіз цитокінового профілю перед початком лікування виявив сильну прямо пропорційну залежність між добою надходження пацієнту до стаціонару та рівнями цитокінів у сироватці крові та слині (коефіцієнт кореляції Спірмена склав від 0,9 до 0,96).

5. Встановлено, що у хворих, які приймали антибіотики, рівень цитокінів був достовірно ($p<0,01$) нижчим, порівняно з пацієнтами, які в схемі лікування не отримували антибактеріальну терапію.

6. Результати досліджень свідчать про те, що антибактеріальні препарати пригнічують синтез про- та протизапальних цитокінів.

Перспективи подальших досліджень

Вивчення реакцій імунної системи є одним з напрямків у хірургічній стоматології, що сприяє розробці та впровадженню в клінічну практику нових більш ефективних методів діагностики та прогнозування ранніх проявів запальних захворювань.

Література

1. Хирургия: антибиотики, травматизм, переломы, вывихи [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://medicedu.ru/hirurgia/86-antibiotiki-travmatizm.html>
2. Готь, І. М. Сучасні аспекти хірургічного лікування переломів нижньої щелепи [Текст] / І. М. Готь, Я. Е. Варес, Т. А. Філіпська // Український медичний альманах. – 2008. – Т. 11, № 6. – С. 58-61.
3. Берест, Е. Л. Метод прогнозирования гнойно-воспалительных осложнений переломов нижней челюсти при изолированной и сочетанной челюстно-мозговой травме в эксперименте [Текст] / Е. Л. Берест // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 4 (60). – С. 379-382.
4. Агасян, В. А. Механизмы формирования стрессорного иммунодефицита при переломах нижней челюсти и методы их коррекции [Текст] : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.01.14 / Владимир Альбертович Агасян ; Московский медико-стоматологический университет. - Москва, 2012. – С. 24.
5. Freidlin, I. S. How the immunogram might be deciphered [Text] / Biology. – 1997. - Vol. 6. – P.25-29.
6. Сергеева, И. Е. Функциональная способность иммунокомпетентных клеток у больных генерализованым пародонтитом, принципы интерпритации результатов исследования [Текст] / И. Е. Сергеева, А. В. Борисенко // Современная стоматология. – 2010. - № 3. – С. 60-64.
7. Оскольский, Г. И. Анализ местного и общего иммунитета при одонтопрепарировании [Текст] / Г. И. Оскольский, А. В. Щеглов // Фундаментальные исследования. – 2012. - № 12. – С. 167-172.
8. Mark, Dustin G. Are Prophylactic Oral Antibiotics Indicated for the Treatment of Intraoral Wounds? [Text] / Dustin G. Mark, Eric J. Granquist // J. Ann Emerg Med. – 2008. - V. 52. P. 368-372.
9. Adalarasan, S. Prophylactic Antibiotics in Maxillofacial Fractures: A Requisite? [Text] / S. Adalarasan, Alexander Mohan, Sanjay Pasupathy // J. Craniofac Surg. – 2010. V. 21. P. – 1009-1011.
10. Rabindra P., Singh. Antimicrobial prophylaxis in open reduction and internal fixation of compound mandibular fractures: a collaborative regional audit of outcome [Text] / Rabindra P. Singh, Lachlan M. Carter, Paul H. Whitfield // British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery/ - 2012. - Accepted 21 August 2012. - P. 4-8.
11. Schaefer, Edward H. Antibiotic Selection for Open Reduction Internal Fixation of Mandible Fractures [Text] / Edward H. Schaefer, Edward J. Caterson // J. Craniofac Surg. – 2013. V. 24. P. – 85-88.
12. Резистентність до протимікробних препаратів: повторення «трагедії» загального надбання [Електронний ресурс] / Режим доступу : http://uphiq.org/service/vooz/vooz_04112010
13. Савичук, Н. О. Превентивна та протирецидивна терапія захворювань слизової оболонки порожнини рота [Текст] / Н. О. Савичук // Современная стоматология. – 2011. – № 5. – С. 35-38.
14. Савичук, Н. О. Колонізаційна резистентність порожнини рота [Текст] / Н. О. Савичук // Укр. мед. часопис – 2012. – № 4 (90). – С. 57-63.
15. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4.
16. Боровиков, В. П. Statistica. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows [Текст] / В. П. Боровиков, И. П. Боровиков. – М. : Филинь, 1998. – 592 с.
17. Прикладная медицинская статистика [Текст] / [под ред. В. М. Зайцева, В. Г. Лифляндского]. – СПб. : СПбГМА им. И. И. Мечникова, 2000. – 299 с.
18. Гельман, В. Я. Медицинская информатика: практикум [Текст] / В. Я. Гельман. – [2-е изд.]. – СПб. : Питер, 2002. – 480 с.

English version: CYTOKINE PROFILE IN YOUNG PATIENTS WITH MANDIBULAR FRACTURES NOT TREATED WITH ANTIBIOTIC THERAPY*

Ruzin G., Chyryk O., Kalinichenko S.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv

Institute of Microbiology and Immunology them. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov

Mandibular fractures are very common among the maxillofacial injuries and occur in 65-90 % cases. The aim of this research is to determine cytokine profiles of young patients with mandibular fractures to introduce more effective medication for maxillofacial injuries into clinical practice. Object and methods of research. 80 patients aged 18-35 years with mandibular fractures with no evidence of concomitant somatic diseases were examined. Patients were divided into two groups: group I (50 patients) not treated with antibiotics and group II (30 patients) treated with antimicrobials. Immunological studies included determination of serum and salivary IL-1 β , IL-10 and IFN- γ levels in patients at admission to hospital and 1 month after discharge. Results. It was determined that levels of proinflammatory cytokine IL-1 β in the patients with mandibular fractures (both in serum and in saliva) were 3.41-5.05 times higher ($p < 0.05$) compared with those of healthy controls. IL-10 levels were 1.15 times lower ($p < 0.05$) in serum, 2.53 times higher ($p < 0.05$) in saliva compared with control group levels. Serum IFN- γ levels in patients with mandibular fractures demonstrated no significant difference from the similar parameters of healthy individuals, whereas salivary levels of this cytokine in the patients with fractures were 1.45 times higher ($p < 0.05$). Correlation analysis of cytokine profile before treatment revealed a strong directly proportional relationship between the hospitalisation time and cytokine profile parameters that were examined (correlation coefficient ranged from 0.90 to 0.96). It has been established that one month after the treatment cytokine levels of the control group patients were significantly ($p < 0.01$) lower compared with those of the patients from the main group. These results show that antibiotics inhibit proinflammatory and anti-inflammatory cytokines synthesis.

Key words: mandibular fractures, cytokines, immunity, antibiotics.

Introduction

Mandibular fractures are the most common among maxillofacial traumatic injuries (65-90 %) [2, 3, 10]. The incidence of post-operative complications is quite high and varies from 11 to 37 % despite constant improvement of complex treatment, development of research techniques and increasing number of drugs [4, 8].

The immune status of a patient with mandibular fractures and its post-operative infection were studied by numerous researchers, since the body nonspecific resistance state and the patient's immunity are important for effectiveness of the treatment [1].

It is well known that in spite of the basic patient's general condition and immune reactivity level, the injury itself causes unfavorable effect on activity of the most of regulatory systems of the body which manifests in complex disorders and induces inhibition of cellular and humoral immunity [1, 7, 11].

The imbalance of local and system immune reactivity is manifested first of all in changing cytokine profile [7, 11]. These changes range depending on the extent of tissue damage and reflect the processes of local inflammation and activation of immune protection mechanisms, and changes in saliva and in blood do not always coincide with each other [5].

Current routine medication treatment of patients with mandibular fractures is a drug complex which includes preventive antibiotics regardless of age of the patient, presence of systemic diseases, interval between the moment of fracture and start of treatment, etc. However, recent publications give evidence of potent immune suppressive properties of antibiotics [9, 12]. That is, against the imbalanced immune reactivity, they suppress additionally the immune system. This intentional weakening

of the body's defense, in turn, can cause infection of the fracture fissure with oral cavity pathogenic and opportunistic microorganisms resulting in the further development of inflammatory complications [6].

According to the literature, cytokines concentration level provides information on functional activity of different immunocompetent cells types, development and severity of inflammatory process, its switching to a level of the system and allows to predict the course of the disease [1, 5, 7, 11].

The aim of this research is to determine cytokine profiles in the young patients with mandibular fractures to introduce more effective medication for maxillofacial injuries into clinical practice.

Object and methods of research

80 patients aged 18-35 years with mandibular fractures with no evidence of concomitant somatic diseases were examined. Patients were divided into two groups: group I (50 patients) not treated with antibiotics and group II (30 patients) treated with antimicrobials. Control group consisted of 20 healthy individuals with no chronic diseases in history and not treated with any drug therapy one month prior to the research.

Immunological studies included determination of serum and salivary IL-1 β , IL-10 and IFN- γ levels in patients at admission to hospital and 1 month after discharge.

Statistical analysis of data was carried out according to the rules of ordinary and alternative variation statistics.

Results and discussion

It is known that salivary glands are highly sensitive to neural and humoral factors. Development of pathological changes in oral cavity are always accompanied by a response of various parts of its defense: emergence of oral

* To cite this English version: Ruzin G., Chyryk O., Kalinichenko S. Cytokine profile in young patients with mandibular fractures not treated with antibiotic therapy // *Problemy ekologii ta medytsyny*. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 60 -62.

foci of chronic infection, decreased reactivity, microbial sensitization, etc. [1, 5, 6].

Cytokines are regulatory peptides that are involved in formation and regulation of the body's defenses. Thus, interleukin 1 β (IL-1 β) launches an inflammatory response cascade, stimulates collagen synthesis, plays an important role in local inflammatory process, is involved in the formation of osseous tissue and mediates interactions of immune and nervous systems. Interferon gamma (IFN- γ) is involved directly in the formation and development of cellular immune response (Th1) and performs regulatory functions in development of humoral response (Th2). De-

creased cellular ability to produce IFN- γ prevents elimination of pathogens which can lead to chronic infection. Interleukin 10 (IL-10) has anti-inflammatory and immunosuppressive effects and causes Th1- to Th2-cellular "shift" in immune response. In addition, it can inhibit antimicrobial response at early stages of inflammation, but it protects the body from hyperinflammation and tissue damage [11].

Study of cytokine profile in patients of two main groups before treatment allowed to determine values of significant differences compared with those in relatively healthy patients (Table 1).

Table 1
Cytokine profile in patients of two main groups before treatment ($M \pm m$)

Cytokine level (pg/ml)		Group of patients		
		Patients with mandibular fractures (n=80)	Relatively healthy patients (n=20)	Reference laboratory index
serum	IL-1 β	9,47 \pm 0,86*	1,72 \pm 0,58	0-11,2
	IL-10	4,69 \pm 0,48*	5,41 \pm 0,13	0-31
	IFN- γ	10,61 \pm 0,75	12,76 \pm 1,89	0-10
saliva	IL-1 β	7,96 \pm 0,76*	2,33 \pm 0,59	0-3,5
	IL-10	3,60 \pm 0,39*	1,42 \pm 0,19	0-5
	IFN- γ	9,06 \pm 0,70*	6,26 \pm 1,21	0-4

Note: * – significant difference between the indicators of patients with mandibular fractures and healthy individuals ($p < 0,05$).

According to the results, levels of proinflammatory cytokine IL-1 β , both in serum and saliva of the patients with mandibular fractures were significantly ($p < 0,05$) higher (3.41-5.05 times the average) compared with those of healthy individuals. These elevated IL-1 β levels indicate the development of local inflammatory process, possibly by action of stress and modification of permeability of capillary walls in the area of fracture.

It was established that in patients with fractures serum IL-10 level was on average 1.15 times lower ($p < 0,05$), whereas in saliva – vice versa, higher, on average, 2.53 times ($p < 0,05$) compared with those in the control group. In our opinion, this is an evidence of the beginning of the local inflammatory process. Thus, changed IL-10 level in biological fluids of the patients may predict disease.

It was determined that IFN- γ serum levels in the patients with mandibular fractures did not differ significantly from those of healthy individuals, whereas a significant (on average, 1.45 times) increase of this cytokine salivary level, ($p < 0,05$), was observed in the patients with fractures compared to the controls. This elevation of IFN- γ values, in our view, indicates the activation of local protection mechanisms.

Correlation analysis of cytokine profile in serum and saliva of the patients with mandibular fractures, depending on the time of their admission to hospital showed a strong proportional correlation between the day of hospitalisation and their cytokine levels before treatment (Spearman correlation coefficient ranged from 0.90 to 0.96) (Fig. 1).

It was found that patients at day 3-4 after injury develop 3.70-4.25-fold increase in IL-1 β levels ($p < 0,01$), 3.00-3.25 times increase in IL-10 ($p < 0,01$) and 2.7-2.9

times increase in IFN- γ levels ($p < 0,01$) compared with those identified in the first two days after injury. 5-7 days after injury, cytokine levels increased even more: 6.3-6.9-fold IL-1 β level increase ($p < 0,01$), 7.8-8.2 times in IL-10 ($p < 0,01$), and 4.7-5.2 in IFN- γ values ($p < 0,01$). The above mentioned indicates an active immune response.

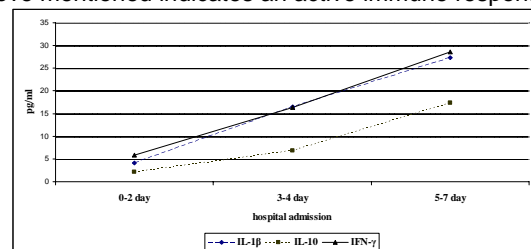


Fig. 1. Correlation analysis of cytokine profile in patients with mandibular fractures, depending on the time of their admission to hospital.

Next research link was to determine the level of cytokines after treatment (with and with no antimicrobials in the treatment combination).

It was found that the levels of cytokines in the patients treated with antibiotics were significantly ($p < 0,01$) lower compared with those in the patients with no antibiotic therapy in the treatment scheme. Thus, IL-1 β levels were, on average, 4.4-5.6 times lower, IL-10 values – 3.0-3.5 times, and IFN- γ – 6.7-9.7 times lower. It shows the inhibition in production of proinflammatory as well as anti-inflammatory cytokines in those treated with antimicrobials. These figures suggest the development of an imbalance in immune system of the patients (Table 2).

Table 2
Cytokine profile in patients studied after treatment ($M \pm m$)

The clinical group of patients	Cytokine level (pg/ml)					
	IL-1 β		IL-10		IFN- γ	
	saliva	serum	saliva	serum	saliva	serum
I (n=11)	3,03 \pm 0,11*	3,5 \pm 0,12*	2,82 \pm 0,11*	3,27 \pm 0,13*	3,32 \pm 0,10*	3,83 \pm 0,10*
II (n=6)	0,63 \pm 0,11*	0,89 \pm 0,10*	0,87 \pm 0,09*	1,18 \pm 0,12*	0,27 \pm 0,06*	0,52 \pm 0,07*

Note: * – significant difference between the indicators of groups ($p < 0,01$).

Thus, there is a sharp decline in immune reactivity of the patients treated with antimicrobials. These data confirm the research findings concerning potent immunosuppressive effect of antibiotics [9, 12].

In the patients not treated with antimicrobials cytokine levels decreased comparatively with the values before treatment, but more slowly than in the patients treated with antibiotics. Thus, on average, IL-1 β levels were 2.2-2.4 times lower ($p < 0.05$), IL-10 – 1.2-1.4 times ($p < 0.05$), IFN- γ levels – 2.5-2.6 times lower ($p < 0.05$) compared with the baseline data (Fig. 2).

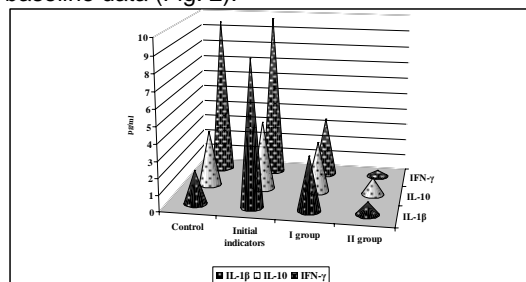


Fig. 2. Cytokine profile in patients with mandibular fractures before and after treatment.

The levels of cytokines in the patients of this group were significantly higher ($p < 0.05$) as to those treated with antimicrobial drugs. This is an evidence of protection against the development of autoimmune processes and suggests the further favorable prognosis of the disease. However, the cytokine profile values obtained in the patients of clinical group I did not reach the figures of the controls (practically healthy individuals).

Summarizing the results, we note that the patients received antimicrobials in combination therapy demonstrated significantly lower levels of all investigated cytokines ($p < 0.01$) compared to the patients not treated with antibiotics. It indicates inhibition of immunity by antimicrobials, which in turn, may additionally weaken defenses. That is, the reduction in macroorganism immune reactivity may make inefficient fighting against pathogens, create the conditions for failure of local and systemic mechanisms of effective protection, which in turn may be one of the causes of secondary immune deficiency syndrome.

Conclusions

1. Study of cytokine profile in all patients with mandibular fractures before treatment found that levels of proinflammatory cytokine IL-1 β were, on average, 3.41-5.05 times higher ($p < 0.05$) compared with those of healthy controls.

2. IL-10 levels were in serum, on average, 1.15 times lower ($p < 0.05$), whereas in saliva – vice versa, on average, 2.53 times higher ($p < 0.05$) compared with those data of the control group.

3. IFN- γ levels in serum did not differ significantly from those of healthy individuals, whereas in saliva of the patients with fractures a significant (1.45 times) increase of this cytokine values, on average, ($p < 0.05$) was observed.

4. Correlation analysis of cytokine profile before treatment showed a strong direct proportional relationship between the day of hospitalisation and cytokine levels in serum and saliva (Spearman correlation coefficient ranged from 0.90 to 0.96).

5. Levels of cytokines were significantly ($p < 0.01$) lower in the patients treated with antibiotics versus the patients treated with no antibiotics.

6. The results of studies indicate that antibiotics inhibit the synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Literature

- Chirurgiya: antibiotiki, travmatizm, perelomy, vyvichi [Elektronnyy resurs] / Rezhim dostupa: <http://medicedu.ru/hirurgia/86-antibiotiki-travmatizm.html>
- Got', I. M. Suchasni aspekti chirurgichnogo likuvannya perelomiv nizhn'oi schelepi [Tekst] / I. M. Got', Ya. E. Vares, T. A. Filip'ska // Ukraïns'kiy medichniy al'manach. – 2008. – T. 11, № 6. – S. 58-61.
- Berest, E. L. Metod prognozovaniya gnoynovospalitel'nykh oslozhneniy perelomov nizhney chelyusti pri izolirovannoy i sochetannoy chelyustno-mozgovoy travme v eksperimente [Tekst] / E. L. Berest // Tavricheskiy mediko-biologicheskii vesnik. – 2012. – T. 15, № 4 (60). – S. 379-382.
- Agasyan, V. A. Mechanizmy formirovaniya stressornogo immunodefizita pri perelomach nizhney chelyusti i metody ich korrekzii [Tekst] : avtoref. dis. kand. med. nauk : 14.01.14 / Vladimir Al'bertovich Agasyan ; Moskovskiy mediko-stomatologicheskii universitet. – Mo-skva, 2012. – S. 24.
- Freidlin, I. S. How the immunogram might be deciphered [Text] / Biology. – 1997. – Vol. 6. – P.25-29.
- Sergeeva, I. E. Funktsional'naya sposobnost' immunokompetentnykh kletok u bol'nykh generalizovannym parodontitom, prinzipy interpretatsii rezul'tatov is-sledovaniya [Tekst] / I. E. Sergeeva, A. V. Borisenko // Sovremennaya stomatologiya. – 2010. – № 3. – S. 60-64.
- Oskol'skiy, G. I. Analiz mestnogo i obshchego immuni-teta pri odontopreparirovani [Tekst] / G. I. Oskol'skiy, A. V. Scheglov // Fundamental'nye is-sledovaniya. – 2012. – № 12. – S. 167-172.
- Mark, Dustin G. Are Prophylactic Oral Antibiotics Indicated for the Treatment of Intraoral Wounds? [Text] / Dustin G. Mark, Eric J. Granquist // J. Ann Emerg Med. – 2008. – V. 52, P. 368-372.
- Adalarasan, S. Prophylactic Antibiotics in Maxillofacial Fractures: A Requisite? [Text] / S. Adalarasan, Alexander Mohan, Sanjay Pasupathy // J. Craniofac Surg. – 2010. V. 21, P. – 1009-1011.
- Rabindra P., Singh. Antimicrobial prophylaxis in open reduction and internal fixation of compound mandibular fractures: a collaborative regional audit of outcome [Text] / Rabindra P. Singh, Lachlan M. Carter, Paul H. Whitfield // British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery/ - 2012. - Accepted 21 August 2012. - P. 4-8.
- Schaefer, Edward H. Antibiotic Selection for Open Reduction Internal Fixation of Mandible Fractures [Text] / Edward H. Schaefer, Edward J. Caterson // J. Craniofac Surg. – 2013. V. 24, P. – 85-88.
- Rezistentnist' do protimikrobnich preparativ: povtorenniya «tragedii» zagal'nogo nadbannya [Elektronniy resurs] / Rezhim dostupu : http://uphiq.org/service/vooz/vooz_04112010
- Savichuk, N. O. Preventivna ta protirezidivna terapiya zachvoryuvan' slizovoï obolonki porozhnini rota [Tekst] / N. O. Savichuk // Sovremennaya stomatologiya. – 2011. – № 5. – S. 35-38.
- Savichuk, N. O. Kolonizaziyna rezistentnist' porozhnini rota [Tekst] / N. O. Savichuk // Ukr. med. chasopis – 2012. – № 4 (90). – S. 57-63.
- Lapach, S. N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyach s ispol'zovaniem Excel [Tekst] / S. N. Lapach, A. V. Chubenko, P. N. Babich. – K.: Morion, 2000. – 320 s. – ISBN 966-7632-16-4.
- Borovikov, V. P. Statistika. Statisticheskii analiz i obrabotka dannykh v srede Windows [Tekst] / V. P. Borovikov, I. P. Borovikov. – M. : Filin', 1998. – 592 s.
- Prikladnaya medizinskaya statistika [Tekst] / [pod red. V. M. Zayzeva, V. G. Liflyandskogo]. – SPb. : SPbGMA im. I. I. Mechnikova, 2000. – 299 s.
- Gel'man, V. Ya. Medizinskaya informatika: praktikum [Tekst] / V. Ya. Gel'man. – [2-e izd.]. – SPb. : Piter, 2002. – 480 s.

Матеріал надійшов до редакції 4.12.2013 р.

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

© Пельо І.М., Благая А.В.

УДК 613.615.9:632.952:635.1/.7

ОБГРУНТУВАННЯ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМИХ РІВНІВ ФЛУОПІКОЛІДУ В ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУРАХ, ВИРОЩЕНИХ З ЗАСТОСУВАННЯМ ФУНГІЦИДУ ІНФІНІТО SC 61,9, К.С.*

Пельо І.М., Благая А.В.

Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця, м.Київ.

Цель исследования. Гигиеническая оценка динамики остаточных количеств пропамокарб гидрохлорида и флуопиколида в овощных культурах, выращенных с применением фунгицида Инфинито SC 61,9, к.с. Обоснование максимально допустимых уровней флуопиколида в огурцах, томатах и томатном соке. Методы исследования. Натурный эксперимент по изучению динамики содержания остаточных количеств пропамокарб гидрохлорида и флуопиколида в огурцах и томатах; химико-аналитические методы определения остаточных количеств пестицидов; математические методы. Результаты. Установлено, что применение фунгицида Инфинито SC 61,9, к.с. (действующие вещества - пропамокарб гидрохлорид и флуопиколид) при выращивании овощных культур (огурцов и томатов) не приводит к загрязнению действующими веществами сельскохозяйственного сырья выше гигиенических нормативов и не ухудшает органолептических свойств продуктов урожая. По параметрам острой токсичности при различных путях поступления в организм человека фунгицид Инфинито SC 61,9, к.с. и его действующие вещества пропамокарб гидрохлорид и флуопиколид относятся к пестицидам III класса опасности – умеренно опасные (лимитирующий критерий – ингаляционная токсичность). Исследуемые вещества не обладают сенситизирующим действием. Отдаленные эффекты действия (канцерогенное действие, мутагенная активность, эмбриотоксическое и тератогенное действие, влияние на репродуктивную функцию) не являются лимитирующим критерием при оценке опасности флуопиколида и обосновании допустимой суточной дозы для человека. Допустимая суточная доза флуопиколида для человека – 0,07 мг/кг, пропамокарб гидрохлорида – 0,02 мг/кг. Флуопиколид по критерию «стабильность в почве» относится к пестицидам III класса опасности (умеренно опасный). Величина ориентировочно допустимой концентрации (ОДК) в почве – 0,01 мг/кг. Выводы. Обоснованы максимально допустимые уровни (МДУ) флуопиколида в огурцах и томатах на уровне 0,04 мг/кг (предел количественного определения (ПКО) методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) – 0,02 мг/кг); в томатном соке (продукт детского питания) – «не допускается» (ПКО методом ГЖХ – 0,03 мг/кг). Разработаны гигиенические регламенты безопасного применения фунгицида Инфинито SC 61,9, к.с. Сроки ожидания до сбора урожая огурцов – 10 дней, томатов – 14 дней.

Ключевые слова: фунгицид, флуопиколид, токсичность, отдаленные эффекты действия, остаточные количества, гигиенические нормативы.

Сучасне агропромислове виробництво потребує комплексного захисту сільськогосподарських рослин, який передбачає використання фунгіцидів в системі хімічного захисту рослин [1,3]. За даними [2,3,4] при вирощуванні овочевих культур за рівних умов, але без застосування фунгіцидів, можливі втрати урожаю складають 45-80%.

З огляду на те, що більшість овочів вживають свіжими, а також беручи до уваги особливості застосування засобів хімічного захисту рослин, фунгіциди по-

винні бути безпечними для людей і навколишнього середовища [1-5].

У цьому аспекті нами проведено санітарно-гігієнічне дослідження препарату Інфініто SC 61,9, к.с. виробництва фірми Байер Кроп Саєнс ГмбХ, Німеччина.

Діючими речовинами препарату Інфініто SC 61,9, к.с. є пропамокарб гідрохлорид (62,5 г/л) і флуопіколід (6,25 г/л).

* Цитування при атестації кадрів: Пельо І.М., Благая А.В. Обґрунтування максимально допустимих рівнів флуопіколіду в овочевих культурах, вирощених з застосуванням фунгіциду інфініто SC 61,9, к.с. // Проблеми екології та медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 63 –66.

Пропамокарб гідрохлорид достатньо вивчений у токсикологічному та гігієнічному аспектах. За параметрами гострої токсичності при різних шляхах надходження в організм пропамокарб гідрохлорид у відповідності до [6] відноситься до III класу небезпечності.

В Україні затверджена допустима добова доза (ДДД) для людини – 0,02 мг/кг маси тіла та необхідні гігієнічні нормативи, зокрема максимально допустимий рівень (МДР) в огірках, поматах і томатному соці – 0,05 мг/кг [5].

В Україні препарати на основі флуопіколіду раніше не застосовувалися. Гігієнічна регламентація флуопіколіду не проводилася.

У 2005-2006 роках препарат Інфініто SC 61,9, к.с. проходив випробування на поматах і огірках з нормами витрат 1,2-1,6 л/га, двократно.

Цим і обумовлена мета нашого дослідження.

Мета дослідження

Гігієнічна оцінка динаміки залишкових кількостей пропамокарб гідрохлориду та флуопіколіду в овочевих культурах, вирощених з використанням фунгіциду Інфініто SC 61,9, к.с. Обґрунтування МДР флуопіколіду в огірках, поматах і томатному соці.

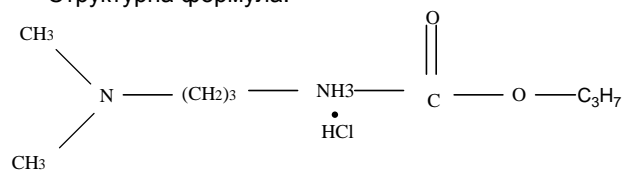
Об'єкти та методи дослідження

Досліджувані речовини: препарат Інфініто SC 61,9, к.с. та його діючі речовини пропамокарб гідрохлорид і флуопіколід.

Назва діючої речовини: пропамокарб гідрохлорид.
Хімічна назва: пропіл-3-(диметиламіно)-пропікарбамат гідрохлорид (IUPAC).

Реєстраційний номер CAS N: 256006-41-1.

Структурна формула:



Емпірична формула: $C_9H_{21}ClN_2O_2$.

Молекулярна маса: 224,73.

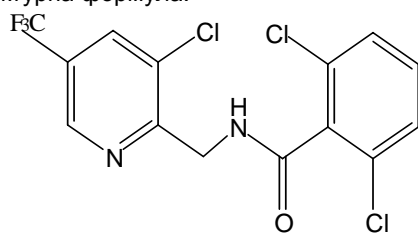
Пропамокарб гідрохлорид являє собою гігроскопічну кристалічну речовину білого кольору зі специфічним запахом, температурою плавлення 45-55°C, щільністю 1,1 г/см³. Тиск пари при 25°C – 6·10⁻⁶ мм.рт.ст. Розчинність у воді (25°C): >700 г/дм³. Розчинність в органічних розчинниках (г/дм³) при 25°C: метанолі – >500; метилхлориді – >430; ізопропанолі – >300; етилацетаті – 23,0; толуолі та гексані – <0,1. Коефіцієнт розподілу n-октанол/вода – 2,5·10⁻³ [7,8].

Назва діючої речовини: флуопіколід, АЕС638206.

Хімічна назва: 2,6-дихлор-N-[[3-хлор-5-(трифторметил)-2-піридиніл] метил] бензамід (IUPAC).

Реєстраційний номер CAS N: 239110-15-7, ступінь чистоти – 99,3%.

Структурна формула:



Емпірична формула: $C_{14}H_8Cl_3F_3N_2O$.

Молекулярна маса: 383,59.

Хімічно чистий флуопіколід являє собою кристалічний порошок білого кольору зі слабким фенольним запахом, температурою плавлення 150°C, щільністю 1,62 г/см³ (20°C). Тиск пари: 3,03·10⁻⁷ Па (20°C), 8,03·10⁻⁷ Па (25°C). Розчинність у воді (25°C) – 2,86 мг/л (рН 1,04). Розчинність в органічних розчинниках (20°C) г/м³: гексані – 0,2; етанолі – 19,2; толуолі – 20,5; етилацетаті – 37,7; ацетоні – 120; диметилсульфоксиді – 180. Коефіцієнт розподілу n-октанол/вода – 2,9 (P_{ow} – 79,4) [7,8].

Препаративна форма Інфініто SC 61,9, к.с. – це рідина бежового кольору з запахом ефіру, рН7 (23°C), температура кипіння – 100°C, щільність 1,13 г/см³ при 20°C. Тиск пари: 520-800 мПа при 20°C.

Діючі речовини та препарат синтезовані фірмою Байер Кроп Саєнс ГмбХ (Німеччина).

Токсикологічна оцінка препарату і його діючих речовин здійснена за даними [7,8].

Санітарно-гігієнічні дослідження виконані нами згідно з "Методическими указаниями по гигиенической оценке новых пестицидов" [9].

Вивчення динаміки вмісту залишкових кількостей флуопіколіду та пропамокарб гідрохлориду нами проведено в натурних умовах у Київській області, Фастівському районі, с. Борова на базі дослідної станції УА-АН при застосуванні препарату Інфініто SC, к.с. на поматах та огірках. Інформація про умови проведення гігієнічних досліджень і динаміку вмісту флуопіколіду та пропамокарб гідрохлориду в ґрунті, рослинах і урожаї наведена в таблицях 2, 3.

Забір зразків для дослідження здійснювали відповідно до "Унифицированных правил отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов" [10].

Визначення залишкових кількостей флуопіколіду проводили методом газорідинної хроматографії [11,12]. Межа визначення в поматах, огірках – 0,02 мг/кг; ґрунті – 0,04 мг/кг.

Визначення залишкових кількостей пропамокарб гідрохлориду проводили методами газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії [13,14]. Межа визначення в ґрунті – 0,025 мг/кг, огірках і поматах – 0,025 мг/кг.

Результати та їх обговорення

Обґрунтування МДР флуопіколіду в огірках, поматах і томатному соці здійснювали згідно з принципами комплексного гігієнічного нормування [9,15], основними з яких є:

добова кількість речовини, що може надійти в організм з продуктами харчування, водою та атмосферним повітрям, не повинна перевищувати ДДД для людини;

при обґрунтуванні МДР лімітуючими показниками повинні бути токсикологічні властивості пестициду та зміна смакових якостей продукту [9].

Наведене вище свідчить про те, що токсикологічне вивчення речовини та визначення ДДД для людини є першим етапом обґрунтування МДР у продуктах харчування.

Власне цьому і підпорядкована послідовність викладення результатів дослідження.

Параметри токсичної дії сполук наведені в таблиці 1.

Виходячи з наведених даних, Інфініто SC61,9, к.с. і флуопіколід згідно з [6] за параметрами гострої токсичності

чності належить до III класу небезпечності (лімітуючий критерій – інгалаційна токсичність).

Флуопіколід не подразнює шкіру і слизові оболонки очей, Інфініто SC 61,9, к.с. – слабкий подразник сли-

зових оболонок за оцінкою по шкалі Draize [16]. Алергенна активність речовин не встановлена при дослідженні методом Magnusson and Kligman [17].

Таблиця 1.
Параметри токсичної дії Інфініто SC 61,6, к.с. та флуопіколіду.

Критерій	Тварини	Інфініто	Флуопіколід
ЛД ₅₀ per os	щурі	>2500 мг/кг л. Wistar	>5000 мг/кг л. Sprague Dawley
ЛД ₅₀ на шкіру	щурі	>4000 мг/кг л. Wistar	>5000 мг/кг л. Sprague Dawley
ЛК ₅₀ , інгаляція	щурі	>3195 мг/м ³ л. Wistar	>5160 мг/м ³ л. Sprague Dawley
Подразнення: -шкіри -слизових оболонок	кролі п. New Zealand	відсутнє слабке	відсутнє відсутнє
Алергенна дія	Гвінейські свинки	не встановлена	не встановлена

Примітка: л. – лінія, п. – порода.

В субхронічному (90 днів) експерименті вивчали токсичну дію флуопіколіду на мишах лінії C57BL/6jCO в дозах: 50, 200, 800 і 3200 ppm; щурах лінії Sprague Dawley в дозах: 100, 1400 і 20000 ppm; собаках породи Beagle в дозах: 5, 70 і 1000 мг/кг м.т. Досліджували: масу тіла, гематологічні показники, активність лужної фосфатази і холінестерази; вміст у сироватці крові альбуміну, холестерину, креатиніну, білірубину, рівня калію та кальцію; гістологічні показники.

З урахуванням змін цих показників встановлені максимально недіючі дози (NOEL) в субхронічному експерименті: для мишей – 34,8 мг/кг, щурів – 7,4 мг/кг, собак – 1000 мг/кг.

У хронічному (24 місяці) експерименті NOEL становлять: для мишей – 7,9 мг/кг, щурів – 8,4 мг/кг.

Віддалені ефекти дії флуопіколіду (канцерогенна, мутагенна, ембріотоксична і тератогенна дія, вплив на репродуктивну функцію) не являються лімітуючим

критерієм при оцінці небезпечності і обґрунтуванні ДДД для людини.

Базуючись на лімітуючій величині NOEL – 7,4 мг/кг маси тіла (для щурів у субхронічному експерименті) і використовуючи коефіцієнт запасу 100, обґрунтована величина ДДД флуопіколіду для людини – 0,07 мг/кг маси тіла.

Флуопіколід за критерієм “стабільність у ґрунті” відноситься до III класу небезпечності – помірно небезпечний [6]. Величина ОДК (орієнтовно допустима концентрація) – 0,1 мг/кг.

У відповідності до поставленої мети нами проведені дослідження динаміки залишкових кількостей пропамокарб гідрохлориду та флуопіколіду в огірках і томатах, вирощених з використанням препарату Інфініто SC 61,9, к.с.

Результати вивчення динаміки залишкових кількостей пропамокарб гідрохлориду та флуопіколіду в томатах, огірках і ґрунті наведені в таблицях 2, 3.

Таблиця 2.
Вміст флуопіколіду та пропамокарб гідрохлориду в томатах

Доба (після останньої обробки)	Вміст, мг/кг **			
	флуопіколід		пропамокарб гідрохлорид	
	плоди	бадилля	плоди	бадилля
3	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,80 ± 0,20
7	0,03 ± 0,006	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,60 ± 0,15
14	0,02 ± 0,005	0,02 ± 0,005	0,02 ± 0,005	0,21 ± 0,05
20	н.в.*	н.в.	н.в.	0,12 ± 0,03
33 (урожай)	н.в. – томати н.в. – сік	н.в.	н.в. – томати н.в. – сік	0,04 ± 0,006

Примітка: * - н.в. – не визначено,

** - у контрольних зразках флуопіколід і пропамокарб гідрохлорид не знайдені.

Аналіз даних таблиці 2 показав, що залишкові кількості флуопіколіду та пропамокарб гідрохлориду в томатах поступово зменшувалися. На 14-ту добу залишкові кількості пропамокарб гідрохлориду не перевищували МДР(0,05 мг/кг). Залишкові кількості флуопіколіду на 14-ту добу складали 0,21 мг/кг. На 20-ту добу залишкові кількості флуопіколіду і пропамокарб гідрохлориду в томатах не визначені. На момент збору врожаю в томатах і отриманому з них томатному соці – не знайдені.

Нами встановлено, що органолептичні властивості томатів, огірків і томатного соку (запах, колір, смак,

зовнішній вигляд) не відрізнялися від контрольних зразків.

Отримані результати дозволили нам обґрунтувати МДР флуопіколіду в огірках і томатах на рівні 0,04 мг/кг (межа визначення методу – 0,02 мг/кг).

У томатному соці, як продукті дитячого харчування, рекомендуємо МДР – “не допускається” (межа визначення методу – 0,03 мг/кг). Терміни очікування до збору врожаю огірків – 10 днів, томатів – 14 днів.

Наступним етапом дослідження була перевірка безпечності обґрунтованих нами гігієнічних нормативів.

Таблиця 3.
Вміст флуопіколіду та пропамокарб гідрохлориду в огірках і ґрунті

Доба (після останньої обробки)	Вміст, мг/кг **			
	флуопіколід		пропамокарб гідрохлорид	
	плоди	грунт	плоди	грунт
1	0,03 ± 0,006	0,053 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,62 ± 0,15
3	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,53 ± 0,13
7	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,20 ± 0,05
10	0,02 ± 0,005	<0,04	0,04 ± 0,006	0,10 ± 0,03
20 (урожай)	н.в.*	н.в.	н.в.	0,06 ± 0,01

Примітка: * - н.в. – не визначено,

** - у контрольних зразках флуопіколід і пропамокарб гідрохлорид не знайдені.

Виходячи з принципів комплексного гігієнічного нормування, нами було визначено сумарне надходження флуопіколіду в організм людини з продуктами харчування (томати, картопля, огірки, томатний сік), водою та атмосферним повітрям, яке складало 0,0316 мг (0,75% від ДДД).

Це свідчить про безпечність для населення продуктів овочівництва, вирощених з використанням фунгіциду Інфініто SC 61,9, к.с. при умові додержання регламентів застосування, гігієнічних нормативів і термінів очікування до збору урожаю.

Висновки

Фунгіцид флуопіколід і препарат на його основі Інфініто SC 61,9, к.с. за параметрами гострої токсичності при різних шляхах надходження в організм лабораторних тварин відповідно до Гігієнічної класифікації пестицидів [15] належать до III класу небезпечності – помірно небезпечні.

Шкіру та слизові оболонки флуопіколід не подразнює, Інфініто SC 61,9, к.с. – слабкий подразник слизових оболонок. Алергенні властивості у досліджуваних сполук не встановлені.

Флуопіколід – сполука політропної дії. За результатами дослідження комплексу показників (фізіологічних, гематологічних, біохімічних, гістологічних) встановлені максимальні недіючі дози (NOEL): у субхронічному експерименті – для мишей 34,8 мг/кг, щурів 7,4 мг/кг, собак 1000 мг/кг; у хронічному – для мишей 7,9 мг/кг, щурів 8,4 мг/кг.

Величина допустимої добової дози флуопіколіду обґрунтована на рівні 0,07 мг/кг маси тіла, виходячи з найменшої NOEL – 7,4 мг/кг і коефіцієнту запасу – 100.

За результатами дослідження динаміки залишкових кількостей флуопіколіду в овочах, вирощених з застосуванням препарату Інфініто SC 61,9, к.с. та беручи до уваги токсикологічні властивості флуопіколіду, нами обґрунтовані величини максимально допустимих рівнів: в огірках і томатах – 0,04 мг/кг, у томатному соці – вміст флуопіколіду не допускається. Термін очікування до збору урожаю огірків – 10 днів, томатів – 14 днів.

Література

1. Лапа О.М., Дрозда В.Ф., Пшець Н.В. Екологічно-безпечні інтенсивні технології вирощування та захисту овочевих культур. – К.: Колодіг, 2006. – 169с.
2. Лапа О.М., Дрозда В.Ф., Гоголев А.І. Сучасні технології вирощування та захисту овочевих культур. – К.: Світ, 2004. – 111с.

3. Каталог засобів захисту рослин та насіння (на 2007-2008 рр.). – К.: Видавництво ТОВ "Сингента", 2007. – 155с.
4. Результати вирощування культур за технологією Оп-тиТех. – К.: Видавництво ТОВ "Сингента", 2006. – 31с.
5. Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті. ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001: Затв. 20.09.01/МОЗ України. – К., – 245с.
6. Гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності: ДСанПіН 8.8.1.002-98: Затв. МОЗ України 28.08.98. – К., 1998. – 20с.
7. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 59/2006, 2-3. – 344р.
8. The Pesticide Manual, Incorporating The Agrochemicals Handbook./Edited by Clive Tomlin. – Tenth edition. – Bath, UK: The Bass Press, - 1994.
9. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов, Киев, 1988, утв. МЗ СССР 13.03.1987, № 4263-87.
10. Унифицированные правила отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов. Утв. МЗ СССР 21.08.1997, № 2051-79.
11. Методичні вказівки з визначення флуопіколіду в ґрунті методом газорідної хроматографії, Затв. Міністерством охорони навколишнього природного середовища України №16 від 22.01.2007р., № 741-2007.
12. Методичні вказівки з визначення флуопіколіду в огірках, картоплі, томатах, томатному соку методом газорідної хроматографії, Затв. Міністерством охорони навколишнього природного середовища України №16 від 22.01.2007р., № 742-2007.
13. Методические указания по определению пропамокарб гидрохлорида (превикура-Н) в воде, почве, картофеле, сахарной свекле методами газожидкостной и тонкослойной хроматографии, № 12-96.// Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Киев, 2000, № 27-С.82-88.
14. Методичні вказівки з визначення пропамокарб гідрохлориду в картоплі, перці, кавунах, баклажанах, капусті, огірках, томатах та томатному соку методом високоефективної рідинної хроматографії, № 343-2002// Методичні вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в продуктах харчування, кормах та навколишньому середовищі. Київ, 2004, № 40-С.58-67.
15. Спыну Е.И. Современные проблемы комплексного регламентирования пестицидов// Актуальные проблемы токсикологии. Тезисы докладов научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения Ю.С. Кагана, 7-8 октября 1999г., 1999. – С.142.
16. Patrich E. and H. Maibach. Dermatotoxicology in Principles and Methods of Toxicology/ Edited by A.W.Hayes – 3rd edition. – New York, USA: Raven Press, Ltd New York, 1994. – P.767-803.
17. Magnusson B. and Kligman A.M. The Identification of Contact Allergens by Animal Assay. The Guinea Pig Maximization Test.// The Journal of Investigative Dermatology/1968. – Vol.52, Issue 3. – P. 268-277.

English version: SUBSTANTIATION OF FLUOPICOLIDE MAXIMUM RESIDUE LEVELS IN VEGETABLES GROWN WITH INFINITO SC 61,9 FUNGICIDE APPLICATIONS*

Pelo I.M., Blagaia A.V.

Institute of hygiene and ecology of Bohomolets National medical university, Kyiv

Fluopicolide and Infinito 61,9 SC fungicide are pertained to the third class of hazard (moderately hazardous) by the parameters of acute toxicity via different routes of exposure of laboratory animals in accordance with the safety classification of pesticides. Fluopicolide is not irritating the skin and mucous membranes, Infinito 61,9 SC is a light irritant of mucous membranes. Allergic properties of the compounds have not been established. Fluopicolide is a polytropic action compound. No-observed effect levels (NOEL) were set in the study of complex parameters (physiological, hematological, biochemical, histological) and were: in subchronic experiment in mice – 34.8 mg/kg, rats – 7.4 mg/kg, dogs 1000 mg/kg; in chronic experiment in mice – 7.9 mg/kg, rats – 8.4 mg/kg. The fluopicolide acceptable daily intake (ADI) was substantiated at the level of 0.07 mg/kg of body weight, based on the lowest NOEL – 7.4 mg/kg and the safety factor 100. The study of fluopicolide residues dynamics in vegetables grown with the application of Infinito 61,9 SC fungicide and taking into account toxicological properties of fluopicolide, we substantiated the values of the maximum residue levels: in cucumbers and tomatoes – 0.04 mg/kg; in tomato juice - fluopicolide content is not allowed. Pre-harvest intervals for cucumbers – 10 days, tomatoes – 14 days.

Modern agro-industry requires comprehensive protection of crops including the use of fungicides in plant chemical protection systems [1,3]. According to [2,3,4] for the cultivation of vegetables under equal conditions, excepting the use of fungicides, yield losses may account for 45-80 %.

Considering the fact that most vegetables are consumed fresh, as well as taking into account the application of chemical plant protection, fungicides should be safe for humans and for the environment [1-5]. Regarded this light we conducted sanitary and hygienic studies of Infinito 61,9 SC fungicide produced by Bayer Crop Science GmbH (Germany). Active substances of the Infinito 61,9 SC preparation are propamocarb hydrochloride (62.5 g/l) and fluopicolide (6.25 g/l). Propamocarb hydrochloride sufficiently studied in toxicological and hygienic aspects. Propamocarb hydrochloride according to [6] refers to the third class of hazard by acute toxicity parameters via different routes of exposure. Acceptable daily intake (ADI) for humans equal to 0.02 mg/kg of body weight and required hygienic standards, in particular the maximum levels (MRLs) in cucumbers, tomatoes and tomato juice equal to 0.05 mg/kg are approved in Ukraine [5].

Fluopicolide-based preparations previously were not used in Ukraine. Hygienic regulation for fluopicolide is not performed also. Thus, Infinito 61,9 SC was tested on tomatoes and cucumbers with 1.2-1.6 l/ha (twice) application rates, and this caused the aim of our study.

Objective: hygienic evaluation of fluopicolide and propamocarb hydrochloride residues dynamics in vegetable crops grown with the use of Infinito 61,9 SC fungicide; substantiation of fluopicolide MRIs in cucumbers tomatoes and tomato juice.

Objects and methods

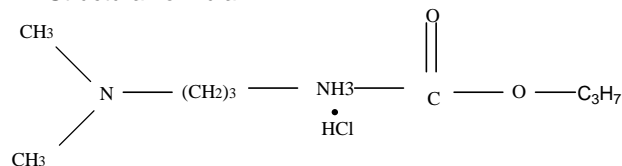
The substance: Infinito 61,9 SC fungicide and its active ingredients fluopicolide and propamocarb hydrochloride.

Active ingredient common name: propamocarb hydrochloride.

Chemical Name: Propyl -3-(dimethylamino)- propicarbamate hydrochloride (IUPAC).

CAS registration number: 256006-41-1.

Structural formula:



Empirical formula: $C_9H_{21}ClN_2O_2$.

Molecular weight: 224.73.

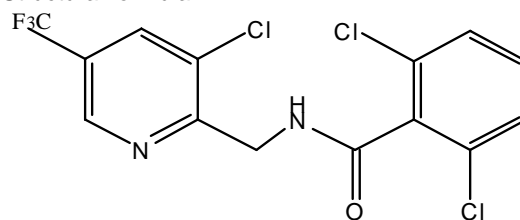
Propamocarb hydrochloride is a crystalline solid absorbent white with a specific odor, melting at 45-55°C, a density of 1.1 g/cm³. The vapor pressure is 8·10⁻⁵ Pa. Solubility in water (25°C): > 700 g/dm³. Solubility in organic solvents (g/dm³) at 25°C: methanol – > 500; ethylene chloride – > 430, isopropanol – > 300; ethyl acetate – 23.0, toluene and hexane – < 0.1. Partition coefficient n-octanol/water – 2,5·10⁻³ [7,8].

Active ingredient common name: fluopicolide, AES638206.

Chemical name: 2,6-dichloro-N-[[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]methyl]benzamide (IUPAC).

CAS registration number: 239110-15-7, purity - 99.3 %.

Structural formula:



Empirical formula: $C_{14}H_8Cl_3F_3N_2O$.

Molecular weight: 383.59.

Chemically pure fluopicolide is a crystalline white powder with a slight phenolic odor, melting point – 150°C, density 1.62 g/cm³ (20°C). Vapor pressure: 3,03·10⁻⁷ Pa (20°C), 8,03·10⁻⁷ Pa (25°C). Solubility in water (25°C) – 2.86 mg/l (pH 1.04). Solubility in organic solvents (20°C)

* To cite this English version: Pelo I.M., Blagaia A.V.. Substantiation of fluopicolide maximum residue levels in vegetables grown with Infinito SC 61,9 fungicide applications // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 67 -70.

g/m³: hexane – 0.2; ethanol – 19.2; toluene – 20.5, ethyl acetate – 37.7; acetone – 120, dimethyl sulfoxide – 180. Partition coefficient n-octanol/water - 2,9 (P_{ow} – 79,4) [7,8].

Physical form of Infinito 61,9 SC is a liquid with a beige color and with the smell of ether, pH 7 (23°C), boiling point - 100°C, density 1.13 g/cm³ at 200C. Vapor pressure: 520-800 mPa at 20°C. Active substances and preparation synthesized by Bayer Crop Science GmbH (Germany). Toxicological evaluation of the preparation and its active ingredients performed according to [7,8].

Sanitary and hygienic studies are performed by us in accordance with the "Methodological guidelines for the hygienic evaluation of new pesticides" [9].

Studies of the fluopicolide and propamocarb hydrochloride content and residues were conducted in field full-scale conditions in the Kiev region, Fastiv district, Borove settl. at the Agrarian Sciences Academy Research Station during the Infinito SC application on tomatoes and cucumbers. Information on the conditions of hygienic research and fluopicolide and propamocarb hydrochloride content and residues dynamics in soil, plants and crops are presented in Tables 2, 3.

Sampling for the studies was carried out according to the "Uniform Rules of agriculture products, food and environmental objects sampling for determination of pesticides residues" [10]. Determination of fluopicolide resi-

dues was performed by gas-liquid chromatography [11,12]. The limit of detection in tomatoes, cucumbers - 0.02 mg/kg soil – 0.04 mg/kg.

Determination of propamocarb hydrochloride residues has been performed by gas-liquid and high performance liquid chromatography [13,14]. The limit of detection in soil - 0.025 mg/kg, cucumbers and tomatoes - 0.025 mg/kg.

Results

Substantiation of fluopicolide MRLs in cucumbers, tomatoes and tomato juice was carried out according to the principles of integrated hygienic regulation [9,15], the main ones are:

- The daily amount of a substance that can get into the body with food, water and air shall not exceed the ADI for humans;

- Toxicological properties of the pesticide and changes in the flavor of the product must be limiting parameters for MRLs establishment [9].

The above mentioned indicates that toxicological study of active ingredient and ADI determination should be the first step in the MRL establishment.

Actually this sequence is the subject of research results presentation.

Toxic effects of the compounds are listed in Table 1.

Table 1.
Toxic effects of Infinito SC and fluopicolide.

Criterion	Animals	Infinito	Fluopicolide
LD ₅₀ per os	rats	>2500 mg/kg Wistar	>5000 mg/kg n.Sprague Dawley
LD ₅₀ dermal	rats	>4000 mg/kg Wistar	>5000 mg/kg Sprague Dawley
LC ₅₀ , inhalation	rats	>3195 mg/m ³ Wistar	>5160 mg/m ³ Sprague Dawley
Irritation/corrosion: -dermal -eyes	New Zealand rabbits	no irritation light irritation	no irritation no irritation
Sensitization	Guinea pigs	not a sensitizer	not a sensitizer

Based on these data, Infinito 61, 9 SC and fluopicolide according to [6] by the parameters of acute toxicity are pertained to the third class of hazard (limiting criterion - inhalation toxicity).

Fluopicolide does not irritate the skin and mucous membranes of the eyes, Infinito 61,9 SC is a weak irritant of mucous membranes according to the Draize's scale [16]. Allergenic activity of substances is not exposed in Magnusson and Kligman test.

The toxic effects of fluopicolide in subchronic (90 days) experiment were determined in mice (C57BL/6jCO strain) at 50, 200, 800 and 3200 ppm; Sprague Dawley rats at doses of 100, 1400 and 20000 ppm; Beagle dogs at doses of 5, 70 and 1000 mg/kg bw. Body weight, hematology parameters, the activity of alkaline phosphatase and cholinesterase, the content of serum albumin, cholesterol, creatinine, bilirubin, potassium and calcium in serum, and histological parameters were studied.

Taking into account the changes in these parameters the No-observed effect levels (NOEL) in subchronic experiments were set: mice – 34.8 mg/kg; rats – 7.4 mg/kg, dogs – 1,000 mg/kg.

NOELs in chronic (24 months) experiments are: mice – 7.9 mg/kg; rats – 8.4 mg/kg.

Long-term effects of fluopicolide (carcinogenic, mutagenic, embryotoxic and teratogenic effects, effects on reproductive function) are not the limiting criteria in the evaluation and substantiation of ADI to humans.

Based on the NOEL limiting magnitude – 7,4 mg/kg (rats; subchronic experiment) and applying a safety factor of 100, a substantiated value of fluopicolide ADI for humans is 0.07 mg/kg of body weight.

Fluopicolide refers to the third class of hazard (moderately dangerous) by the criterion of "persistence in soil" [6]. Tentatively allowable concentration (TAC) in soil is 0.1 mg/kg.

In line with our goal the studies of propamocarb hydrochloride and fluopicolide residue dynamics in cucumbers and tomatoes grown with Infinito 61,9 SC application were carried out.

The results of these studies are presented in Tables 2, 3.

Table 2.
Propamocarb hydrochloride and fluopicolide content in tomatoes

Day (after the last application)	Content, mg/kg **			
	fluopicolide		propamocarb hydrochloride	
	fruits	tops	fruits	tops
3	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.80 ± 0.20
7	0.03 ± 0.006	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.60 ± 0.15
14	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.005	0.21 ± 0.05
20	n.d.*	n.d.	n.d.	0.12 ± 0.03
33 (harvest)	n.d. – tomatoes n.d. - juice	n.d.	n.d. – tomatoes n.d. - juice	0.04 ± 0.006

Footnotes: * – n.d. – not detected,

** – propamocarb hydrochloride and fluopicolide are not detected in check samples.

Analysis of the data in Table 2 showed that fluopicolide and propamocarb hydrochloride residues in tomatoes decreased gradually. Propamocarb hydrochloride residues were not exceeding the MRL (0.05 mg/kg) on the day 14. Fluopicolide residues were 0.21 mg/kg on the day 14. Fluopicolide and propamocarb hydrochloride residues in tomatoes were not detected on the day 20. Fluopicolide and propamocarb hydrochloride residues

were not detected also at the harvest time in tomatoes and in tomato juice made from treated fruits.

We found that the organoleptic properties of tomatoes, cucumbers and tomato juice (smell, color, taste, appearance) were not affected and did not differ from control samples.

The results allow us to substantiate fluopicolide MRL in cucumbers and tomatoes at the level of 0.04 mg/kg (limit of detection of the method - 0.02 mg/kg).

Table 3.
Propamocarb hydrochloride and fluopicolide content in cucumbers and soil

Day (after the last application)	Content, mg/kg **			
	fluopicolide		propamocarb hydrochloride	
	fruits	soil	fruits	soil
1	0.03 ± 0.006	0.053 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.62 ± 0.15
3	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.53 ± 0.13
7	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.20 ± 0.05
10	0.02 ± 0.005	<0.04	0.04 ± 0.006	0.10 ± 0.03
20 (harvest)	n.d.*	n.d.	n.d.	0.06 ± 0.01

Footnotes: * – n.d. – not detected,

** – propamocarb hydrochloride and fluopicolide are not detected in check samples.

We recommend "not allowed" MRL in tomato juice as baby food (limit of detection of the method - 0.03 mg/kg). Pre-harvest intervals equal to 10 days for cucumbers and 14 days for tomatoes are substantiated.

The next stage of the study was to test the safety of our substantiated hygienic standards.

Based on the principles of integrated hygienic regulation, we have determined the total income of fluopicolide to the human body with food (tomatoes, potatoes, cucumbers, and tomato juice), water and atmospheric air, which amounted to 0.0316 mg (0.75 % of ADI).

This indicates to the public safety of vegetable products grown using Infinito 61,9 SC fungicide if the application rates and ways follow the rules (subject to the hygienic regulations, hygienic standards and pre-harvest intervals).

Conclusions

1. Fluopicolide and Infinito 61,9 SC fungicide are pertained to the third class of hazard (moderately hazardous) by the parameters of acute toxicity via different routes of exposure of laboratory animals in accordance with the safety classification of pesticides [15].

2. Fluopicolide is not irritating the skin and mucous membranes, Infinito 61,9 SC is a light irritant of mucous membranes. Allergic properties of the compounds have not been established.

3. Fluopicolide is a polytropic action compound. No-observed effect levels (NOEL) were set in the study of complex parameters (physiological, hematological, biochemical, histological) and were: in subchronic experiment in mice – 34.8 mg/kg, rats – 7.4 mg/kg, dogs 1000 mg/kg; in chronic experiment in mice – 7.9 mg/kg, rats – 8.4 mg/kg.

4. The fluopicolide acceptable daily intake (ADI) was substantiated at the level of 0.07 mg/kg of body weight, based on the lowest NOEL – 7.4 mg/kg and the safety factor 100.

5. The study of fluopicolide residues dynamics in vegetables grown with the application of Infinito 61,9 SC fungicide and taking into account toxicological properties of fluopicolide, we substantiated the values of the maximum residue levels: in cucumbers and tomatoes – 0.04 mg/kg; in tomato juice - fluopicolide content is not allowed. Pre-harvest intervals for cucumbers – 10 days, tomatoes – 14 days.

Literature

1. Lapa O.M., Drozda V.F., Pshech' N.V. Ekologichno-bezpechni intensivni tehnologii viroshhuvannya ta zahistu ovochevii kul'tur. – K.: Kolobig, 2006. – 169s.
2. Lapa O.M., Drozda V.F., Gogolev A.I. Suchasni tehnologii viroshhuvannya ta zahistu ovochevii kul'tur. – K.: Svit, 2004. – 111s.
3. Katalog zasobiv zahistu roslin ta nasinnja (na 2007-2008 rr.). – K.: Vidavnistvo TOV "Singenta", 2007. – 155s.

4. Rezultati viroshhuvannya kul'tur za tehnologiju OptiTeh. – K.: Vidavnistvo TOV "Singenta", 2006. – 31s.
5. Dopustimi dozi, koncentracii, kil'kosti ta rivni vmistu pesticidiv u sil'skogospodars'kij sirovini, harchovih produktah, povitri robochoi zoni, atmosfernomu povitri, vodi vodojmishh, r'runti. DSanPiN 8.8.1.2.3.4-000-2001: Zatv. 20.09.01/MOZ Ukraïni. – K., - 245s.
6. Gigienichna klasifikacija pesticidiv za stupenem nebezpechnosti: DSanPiN 8.8.1.002-98: Zatv. MOZ Ukraïni 28.08.98. – K., 1998. – 20s.
7. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 59/2006, 2-3. – 344p.
8. The Pesticide Manual, Incorporating The Agrochemicals Handbook./Edited by Clive Tomlin. – Tenth edition. – Bath, UK: The Bass Press, - 1994.
9. Metodicheskie ukazaniya po gigienicheskoy ocenke novykh pesticidov, Kiev, 1988, utv. MZSSSR 13.03.1987, # 4263-87.
10. Unificirovannye pravila otbora prob sel's'kohozejajstvennoj produkcii, produktov pitaniya i ob'ektov okruzhajushhej sredy dlja opredeleniya mikrokolichestv pesticidov. Uvt. MZ SSSR 21.08.1997, # 2051-79.
11. Metodichni vkazivki z viznachennja fluopikolidu v grunti metodom gazoridinnoi hromatografii, Zatv. Ministerstvom ohoroni navkolishn'ogo prirodnogo seredovishha Ukraïni #16 vid 22.01.2007r., # 741-2007.
12. Metodichni vkazivki z viznachennja fluopikolidu v ogirkah, kartopli, tomatah, tomatnomu soku metodom gazoridinnoi hromatografii, Zatv. Ministerstvom ohoroni navkolishn'ogo prirodnogo seredovishha Ukraïni #16 vid 22.01.2007r., # 742-2007.
13. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniju propamokarb gidrohlorida (previkura-N) v vode, pochve, kartofele, saharnoj svekle metodami gazozhidkostnoj i tonkoslojnoj hromatografii, # 12-96.// Metodicheskie ukazaniya po opredeleniju mikrokolichestv pesticidov v produktah pitaniya, kormah i vneshnej srede. Kiev, 2000, # 27-S.82-88.
14. Metodichni vkazivki z viznachennja propamokarb gidrohloridu v kartopli, perci, kavunah, baklazhanah, kapusti, ogirkah, tomatah ta tomatnomu sokovi metodom visokoefektivnoi ridinnoi hromatografii, # 343-2002// Metodichni vkazivki z viznachennja mikrokil'kostej pesticidiv v produktah harchuvannya, kormah ta navkolishn'omu seredovishhi. Kiïv, 2004, # 40-S.58-67.
15. Spynu E.I. Sovremennye problemy kompleksnogo reglamentirovaniya pesticidov// Aktual'nye problemy toksikologii. Tezisy dokladov nauchnoj konferencii, posvjashhennoj 75-letiju so dnja rozhdenija Ju.S. Kavana, 7-8 oktyabrya 1999r., 1999. – S.142.
16. Patrich E. and H. Maibach. Dermatotoxicology in Principles and Methods of Toxicology/ Edited by A.W.Hayes – 3rd edition. – New York, USA: Raven Press, Ltd New York, 1994. – P.767-803.
17. Magnusson B. and Kligman A.M. The Identification of Contact Allergens by Animal Assay. The Guinea Pig Maximization Test.// The Journal of Investigative Dermatology/-1968. – Vol.52, Issue 3. – P. 268-277.

Матеріал надійшов до редакції 3.09.2013

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Ляховська Н.В., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П.

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/5

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2,4 ТА БІЛКА КЛІТИН КЛАРА В РОЗВИТКУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДОРОСЛИХ*

Ляховська Н.В., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Генетические аспекты астмы и атопии широко изучаются. Генов-кандидатов и локусов хромосом, вероятно отвечают за возникновения бронхиальной астмы (БА) определено большое количество. Целью нашей работы стало изучение полиморфизмов 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) и 896A/G гена TLR4 (rs4986791), гена белка клеток Клара (A38G), с удельным весом 16 кДа, (CC16) среди взрослого населения. Материалы и методы. Нами было обследовано 45 больных БА в период вне обострения. Диагноз БА и степень тяжести установлено согласно утвержденных критериев. Результаты исследования: В группе больных БА достоверно чаще встречается генотип GA (11,1%) гена TLR2 ($p=0,04$) в сравнении с группой контроля. У пациентов, которые являются носителями мутантной аллели А гена TLR2 в анамнезе чаще отмечались пневмонии ($p=0,046$), а также были признаки кандидоза ($p=0,034$) в сравнении с пациентами без полиморфизма. При изучении полиморфизма гена TLR 4 установлено, что генотип AG статистически вероятнее ($p=0,04$) встречается в группе с БА (15,6%), чем в контрольной группе. У больных с полиморфизмом 896A/G гена TLR4 заболевание начиналось с детства ($p=0,03$), в спектре сенсibilизации были пищевые факторы ($p=0,02$) и имели место проявления другой аллергической патологии ($p=0,045$). Полиморфный вариант 38G гена CC16 достоверно чаще встречается у больных с АБА чем в группе популяционного контроля ($p=0,019$). Особенности клинических проявлений у больных АБА, которые являются носителями аллеля 38G гена CC16 являются: грибковая сенсibilизация, атопический дерматит и туберкулез в анамнезе, необходимость в частом приеме глюкокортикостероидов.

Ключевые слова: астма, Толл-рецептор, полиморфизм, белок клеток Клара

Бронхіальна астма (БА) є глобальною проблемою, оскільки в світі нараховується близько 300 млн осіб, що страждають на дану патологію [5]. Ґрунтуючись на стандартизованих методах оцінки поширеності БА у дорослих і дітей, можна стверджувати, що даний показник у різних країнах світу складає від 1 до 18% населення та має стійку тенденцію до зростання. Зокрема, в Росії за останні 20 років поширеність БА зросла майже у 2 рази і складає сьогодні 10-15% населення [18]. Багатофакторний характер формування БА включає генетичну схильність, вплив навколишнього середовища, імунні та нейрогенні ланки неспецифічної і специфічної гіперреактивності, роль вірусно-мікробного чинника вимагає врахування кожного додаткового компоненту, здатного впливати на перебіг астми [1]. Генетичні аспекти астми та атопії широко вивчаються. Генів-кандидатів та локусів хромосом, що вірогідно відповідають за виникнення атопічної БА

велика кількість. Найчастіше в літературних джерелах посилаються на ділянки хромосом 5q23-31,6p21.1-p23, 11q13, 12q14-24.33 і 13q11-32. В цьому плані в останнє десятиріччя викликають великий інтерес роботи пов'язані зі зміною генетичного регулювання об'єктів розпізнавальних рецепторів [8], у першу чергу – Толл-подібних рецепторів (TLR). Результати роботи Е.Галі та співав. [4] не знайшли асоціації між екземою, харчовою алергією та місенс-мутацією TLR2, тоді як інші дослідження підтверджують зв'язок між концентрацією IL4, IgE та порушеннями у вказаному гені [11]. Деякі автори вказують на асоціацію між рівнем секреторного IgE та генами TLR4 [14], інші науковці стверджують, що локуси генів, які пов'язані з БА в певних випадках не мають взаємозв'язку із специфічною сенсibilізацією [7]. За результатами багатьох досліджень можна зробити висновок, що наявність поліморфних варіантів генів TLR4 у дітей хворих на атопі-

* Цитування при атестації кадрів: Ляховська Н.В., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П. Роль поліморфізмів генів Толл-подібних рецепторів 2,4 та білка клітин Клара в розвитку бронхіальної астми у дорослих // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 71 – 75.

чний дерматит може сприяти чутливості до вірусних інфекцій та обтяжувати перебіг захворювання [15]; визначає зміну характеру перебігу та ступеня вираженості клінічних проявів у дітей з БА [13]. Сьогодні проведена обмежена кількість дослідження астми (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Laing et al., 1998; Sengler et al., 2003; Sharma and Ghosh, 2004). Більшість наукових розробок в малих популяційних вибірках підтверджують асоціацію між поліморфізмом CC16 та ризиком виникнення астми (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Mansur et al., 2002; Saadat et al., 2004).

Метою нашої роботи стало вивчення поліморфізмів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) та 896A/G гену TLR4 (rs4986791), гену білку клітин Клара (A38G), питомою вагою 16 кДа, (CC16) серед дорослого населення Полтавської популяції та визначення особливостей імунологічного статусу та клінічного перебігу БА в залежності від змін в геномі.

Матеріали та методи

Нами було обстежено 45 осіб хворих на БА. Діагноз БА та ступінь її тяжкості встановлено відповідно до затверджених критеріїв (міжнародні рекомендації GINA, 2011) на базі алергологічного і пульмонологічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні. Анамнестичні дані зібрані шляхом анкетування з використанням спеціального опитувальника. Усім пацієнтам з БА були проведені загальноклінічні лабораторні, інструментальні та алергологічне обстеження (прик-тест). Обстеження проводили за умови відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних, відсутності гострих інтеркурентних інфекційних захворювань та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження. До групи контролю увійшли зразки ДНК 90 практично здорових осіб, без алергологічного анамнезу з бази ДНК НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Визначення поліморфізмів 2258G/A гену TLR2 та 896A/G гену TLR4, гену CC16 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [12]. Фенотип лімфоцитів аналізували шляхом визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин з використанням моноклональних антитіл CD4, CD25 (виробництво «Сорбент», Росія) та внутрішньо-

клітинного білку FoxP3 («eBioscience», США) методом проточної цитофлюориметрії на проточному цитофлюориметрі EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II TM software. Рівень загального IgE, інтерлейкіну-4,10 (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна) в сироватці крові визначали за допомогою непрямого імуоферментного аналізу.

Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2 . Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Серед обстежених у 5 (11,1%) пацієнтів захворювання мало інтермітуючий характер, у 23 (51,2%) осіб була легка ступінь, у 17 (37,7%) хворих – середня ступінь тяжкості перебігу БА. Генетична детермінованість БА в останній час розглядається, як один з основних факторів в етіопатогенезі даного захворювання [16]. Серед обстежених у 3 (6,6 %) хворих відмічалися алергічні прояви з боку обох батьків, матері – у 16 осіб (35,5%), батька – у 10 осіб (22,2%). Таким чином, передача спадкової схильності до алергічних захворювань частіше відмічена за лінією матері, що узгоджується з літературними даними [17].

Нами була проаналізована частота поліморфних варіантів генів TLR 2, TLR4, гену CC16 серед хворих на БА та в групі популяційного контролю (табл.1). В осіб, що входили до групи контролю, частота генотипу TLR2 GG становила 97,8%; частота гетерозиготного генотипу GA – 2,2%, генотип AA не був виявлений. У хворих на БА відповідні результати були такими: GG – 88,9%, GA – 11,1% та AA також не був виявлений, тобто відмічається статистично значима різниця ($p = 0,04$) між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА. Частота алелі А серед групи контролю складала 1,1%, а серед хворих на БА – 5,6%, що достовірно не відрізнялось ($\chi^2=3,1$; ВШ= 4,59; ДІ 1,007-20,94; $p=0,08$) (табл.1).

Табл 1.
Внутрішньогруповий розподіл частот генотипів та поліморфних алелей генів TLR2, TLR4, CC16

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група контролю	Хворі (n=45)	p^*	Частота алелі	Група контролю (n=90)	Хворі на БА, (n=45)	χ^2 Пірсона, df=1	ВШ* (95% ДІ)	p^{**}
TLR2 2258G/A	GG	97,8 (88)	88,9 (40)	0,04	G	98,9 (178)	94,4 (85)	3,10	4,59 (1,007-20,94)	0,08
	GA	2,2 (2)	11,1 (5)		A	1,1 (2)	5,6 (5)			
	AA	-	-							
TLR4 896A/G	AA	95,6 (86)	84,4 (38)	0,04	A	97,8 (176)	92,2 (83)	3,42	3,52 (1,06-11,66)	0,06
	AG	4,5 (4)	15,6 (7)		G	2,2 (4)	7,8 (7)			
	GG	-	-							
CC 16 A38G	AA	86,9 (40)	64,4 (29)	0,019	A	86	71	6,99	3,84 (1,45-10,12)	0,08
	AG	13 (6)	28,9 (13)		G	6	19			
	GG	-	6,52 (3)							

Примітка: p^{**} - рівень значимості, отриманий тестом χ^2 – для груп контролю та хворих на АБА.
 p - рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера.

При дослідженні поліморфізму 896A/G гену TLR4 в групі контролю частота генотипу AA становила 95,6%, гетерозиготного генотипу AG – 4,5%, генотип GG не

виявлений. У хворих на БА відповідно: AA – 84,4%, AG – 15,6%, GG – не знайдено. Між частотами генотипів у групі популяційного контролю та хворих на БА

виявлена достовірна різниця ($p < 0,05$), що може характеризувати дану патологію, як спадкове порушення імунної відповіді. Частота мутантної алелі G у групі хворих на БА була статистично вища ($\chi^2 = 3,42$; $p = 0,064$) та склала 7,8%, у порівнянні з групою контролю (табл. 1).

В групу контролю для вивчення поліморфізму гену CC16 відібрано 46 зразків ДНК осіб, що не страждали на алергічну патологію. У вказаній групі результати були наступними: частота гомозиготного генотипу AA становила 86,9% (40 осіб) генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 13% (6 осіб). У хворих на АБА відповідні дані були такими: генотип AA – 64,4% (29 осіб), AG – 28,9% (13 осіб), GG у 6,52% хворих (3 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА відмічається достовірна різниця ($p = 0,019$). Частота алелю A у контрольній групі склала 93,4%, у хворих на АБА – 78,9%. Частота алелю G серед хворих на БА склала 7,8%, серед групи контролю – 2,2%, що достовірно не відрізнялось ($\chi^2=3,42$; ВШ= 3,52; ДІ 1,06- 11,66; $p=0,06$) (табл.1).

При аналізі внутрішньогрупового розподілу частот всіх вище зазначених генотипів та поліморфних алелей спостерігався нерівномірний розподіл алелей, на що вказує проведений аналіз показника врахування рідкісних алелей ($\mu < 2$) і частки рідкісних алелей ($h > 0$). Для всіх досліджуваних локусів в групах контролю та

хворих на БА розподіли генотипів відповідали очікуванню за рівновагою Харді – Вайнберга. Також виявлено співпадання очікуваної гетерозиготності та гетерозиготності, яка спостерігається, що свідчить про рівновагу генетичної структури даної популяції.

Одиничний нуклеотидний поліморфізм (ОНП) генів Толл-подібних рецепторів впливають на загальний соматичний стан мають клінічні прояви АБА. Гетерозиготний генотип GA гену TLR 2 ($n=5$) спостерігався тільки у жінок (100%). Достовірно частіше у носіїв алелі A ($p = 0,046$) в анамнезі були пневмонії (2 і більше раз за життя), а також відмічались ознаки кандидозу ($p = 0,034$) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму (табл.2). Внаслідок змін в генах TLR2 відбувається порушення розпізнавання інфекційних агентів (в тому числі грибкових), що призводить до дисбалансу функціонування системи вродженого імунітету та розвитку хронічних запальних захворювань. При порівнянні рівнів імунологічних показників серед хворих на БА з різними варіантами гену TLR2 статистично достовірна відмінність спостерігаються лише в концентрації цитокінів. Так, вищий рівень IL-4 ($63,7 \pm 8,7$ пг/л) спостерігався у групі без проявів поліморфізму (критерій Манна-Уїтні $U_{(n1=40; n2=5)} = 2,79$; $p=0,005$), а рівень IL-10 був достовірно підвищений у носіїв гетерозиготного варіанту геному TLR2 (критерій Манна-Уїтні $U_{(n1=40; n2=5)} = 33,0$; $p=0,01$) (табл.3).

Табл.2
Клінічні ознаки в залежності від варіанту генів TLR2, TLR4, CC16

Наявність ознаки		Носії генотипу GG гену TLR2, (n=40)	Носії генотипу GA гену TLR2, (n=5)	p *
Поліморфізм 2258G/A гена TLR2				
В анамнезі часті пневмонії (2 і більше разів за життя)	так ні	12 28	4 1	0,046
В анамнезі ознаки кандидозу та /або грибкового ураження шкіри	так ні	11 29	4 1	0,036
Поліморфізм 896A/G гена TLR4				
		Носії генотипу AA гену TLR4, (n=38)	Носії генотипу AG гену TLR4, (n=7)	p *
Полі сенсibilізація, що включає харчові алергени	так ні	7 31	7 0	0,013
Супутні полі алергічні прояви (риніт, кон'юнктивіт)	так ні	6 32	5 2	0,045
В анамнезі прояви "атопічного маршу"	так ні	7 31	6 1	0,029
Поліморфізм A38G гена CC16				
		Носії генотипу AA гену CC16, (n=29)	Носії алелі G гену CC16, (n=16)	p *
Мають прояви atopічного дерматиту	так ні	4 24	6 10	0,04
Частіше користуються інгаляційними глюкокортикоїдами	так ні	3 26	9 7	0,02
Прояви грибкової сенсibilізації	так ні	3 26	8 8	0,03

ОНП гена TLR4, який кодує позаклітинну структуру ектодомену рецептора, полягає в заміні аспарагінової амінокислоти на гліцинову Asp299Gly 1187 (rs4986790) та на кінцевому етапі пов'язано з пригніченням фосфорилування I κ B- α після стимуляції ЛПС, що, своєю чергою, призводить до зниження транслокації NF κ B в ядро та позначається на пригніченні синтезу відповідних прозапальних цитокінів. Подальше порушення передачі активаційного сигналу NF κ B су-

проводжується дисбалансом синтезу Tx1/Tx2, та визначає ступінь вираженості клінічних проявів захворювання та наявності супутньої патології. Поліморфізм Asp299 Gly TLR4 зі зміною алелю Asp на Gly був виявлений у 7 осіб. У 6 осіб цієї групи ($p=0,03$) прояви АБА починалися в ранньому дитинстві; 4 пацієнти пройшли типові етапи "атопічного маршу". Достовірно частіше ($p=0,02$) у цих хворих у порівнянні з пацієнтами без вказаних генетичних змін визначалась харчові

фактори сенсibiliзації. Клінічною ознакою вказаного ОНП TLR4 також була супутня алергічна патологія (ринокон'юнктивальний синдром та дерматит) ($p=0,045$) та захворювання ШКТ (табл.2). Отже, поліморфізм гену Asp299 Gly TLR4 здебільшого впливає на загальні прояви atopії у хворих на БА, ніж на ознаки бронхо-легеневої дисфункції та ступінь тяжкості да-

ної патології, на відміну від даних отриманих іншими авторами [10]. Відмічені достовірні зміни рівня $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ (критерій Манна-Уїтні $U_{(n=38;n=7)} = 68,0$; $p=0,04$) та IL10 у хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR4 (критерій Манна-Уїтні $U_{(n=38;n=7)} = 60,5$; $p=0,02$) (табл.3).

Табл.3
Імунологічні показники в залежності від генотипу гену

Імунологічні показники	Носії генотипу GG гену TLR2, (n=40)	Носії генотипу GA гену TLR2, (n=5)	p
Поліморфізм 2258G/A гена TLR2			
IL-10, пг/л	0,42±0,02	0,7 ± 0,05	0,013
IL-4, пг/л	63,7±8,7	24,1 ±6,28	0,03
Поліморфізм 896A/G гена TLR4			
	Носії генотипу AA гену TLR4, (n=38)	Носії генотипу AG гену TLR4, (n=7)	p
CD 4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺ , Г/л	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04
IL-10, пг/л	0,45±0,02	0,35 ± 0,03	0,02
Поліморфізм A38G гена CC16			
	Носії генотипу AA гену CC16, (n=29)	Носії алелі G гену CC16, (n=16)	p
IgE, МОд/мл	123,7 ± 12,26	244,9 ± 30,33	0,0013

При розгляді результатів поліморфізму гену CC 16 з'ясовано, що переважна більшість осіб з ОНП вказаного гену мали сенсibiliзацію до двох і більше алергенів, особливістю цих хворих була гіперчутливість до грибкових алергенів (найчастіше до групи Aspergillus), так в групі з гетерозиготою гену CC16 вказані прояви були у 6 осіб, з мутантною гомозиготою у 2 осіб, що є статистично достовірно при порівнянні з генотипом AA гену CC16 (табл. 3). Отримані нами результати співпадають з даними науковців зі США Claire de Burbure та співавторів [3] про пошкоджуючу дію на епітелій легень грибкових алергенів, проте статистично достовірних показників, на відміну від нас, вони не отримали. Серед супутньої патології звертає на себе увагу достовірна різниця за точним методом Фішера (табл.2) по кількості осіб, що мають прояви atopічного дерматиту при порівнянні груп з поліморфізмом гену CC 16. Так, серед носіїв генотипу GG 2 особи, що мають інтермітуючий перебіг хворіють на atopічний дерматит, серед носіїв генотипу AG- 4 особи. Насправді, вплив поліморфізму генів епітеліальних клітин легень (CC16) на ушкодження шкіри має суперечливий характер, але є автори [2], які вказують на прямий взаємозв'язок поліморфізму гену CC16 з atopічним дерматитом у дорослих. При опрацюванні імунологічних даних хворих на АБА з різними варіантами генотипів гену CC16 з'ясовано, що статистично достовірна різниця відмічалась лише за рівнем загального IgE. У хворих, які є носіями гетерозиготи гену CC16 цей показник склав $244,9 \pm 30,33$ МОд/мл, гомозиготи GG $191,7 \pm 13,0$ МОд/мл, гомозиготи за AA склав $123,7 \pm 12,26$ МОд/мл, що є статистично вірогідно (метод Краскала-Уоліса, $p=0,0013$) (табл.3), тобто спостерігається залежність рівня загального IgE від стану генетичного апарату. Можливо це пов'язано з однаковим розташуванням на хромосомі 11q13, як гену білка клітин Клара, так і високоафінного FcεRI-рецептора-β (FcεRI-β) IgE.

Під час аналізування лікарських засобів, що приймали хворі з'ясовано, що особи, які були носіями генотипу AG або GG гену CC 16 частіше використовували глюкокортикоїдні препарати (табл.2). Це можна пояснити, де в чому схожою дією на молекулярному рівні білків клітин Клара та глюкокортикоїдів. Відомо,

що активація гену CC16 інгібує функцію ядерного фактору - κB (NF-κB) шляхом подавлення фосфорилування IκB-β в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що в свою чергу призводить до зменшення запалення в легеневій тканині [9]. Дослідження останніх років свідчать, що глюкокортикоїди взаємодіють не тільки з GRE (glucocorticoid response element), а і з різними факторами транскрипції, такими як AP-1 і NF-κB та інші. Кортикостероїди впливають на транскрипційну активацію цитоплазматичного інгібітора NF-κB – IκBα. Ще однією особливістю носіїв мутантного гомозиготного генотипу (GG) є перенесений активний туберкульоз у 2 пацієнтів (8 та 18 років до моменту нашого обстеження); при порівнянні з носіями генотипу AA є статистично вірогідна різниця ($p=0,047$) (табл.2). Відомо, що туберкульоз є інфекційним захворюванням, сприйнятливості до якого залежить від багатьох факторів серед них, можливо, і зміни в гені CC16. Проте є дані, що активація TLR2 призводить до внутрішньоклітинного кілінгу M. tuberculosis макрофагами [6]. Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів. Для проведення статистичної обробки отриманих даних відібрано 46 зразків ДНК з вказаної вище контрольної групи по TLR-рецепторам. Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип GGAAAA, як в групі контролю, так і у хворих АБА (табл.4). В нашому дослідженні виявлено, що 1 особа з генотипом GG гену CC16 (гаплотип- GAAAGG) та 1 особа з генотипом AA (гаплотип GAAAAA) гену CC16 мали гетерозиготний варіант (GA) гену TLR2 і мали в анамнезі прояви активного туберкульозу. При аналізі гаплотипів генів TLR4 та CC16 з'ясовано, що 3 особи з гетерозиготним генотипом гену CC16 (гаплотип GGAGAG) та 1 особа з гомозиготою (гаплотип GGAGGG) мали гетерозиготний варіант гену TLR4, у всіх цих хворих відмічались часті прояви ГПБІ, що мали затяжний характер та потребували використання антибактеріальних препаратів. При аналізі імунологічних показників серед носіїв гаплотипів виявлено, що на рівні статистичної тенденції ($p \leq 0,06$) відрізняється рівень $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ у носіїв гаплотипів з мутантним алелем. Вивчення поліморфних гаплотипів генів CC16,

TLR2 та TLR4 є важливим аспектом у розумінні клінічних проявів БА.

Табл. 4

Внутрішньогруповий розподіл гаплотипів генів TLR2, TLR4, CC16

CC 16 TL R 4 TL R 2	GG AA AA	GA AA AA	AA AA AA	GG AA AG	GA AA AG	AA AA AG	GG AA GG	GA AA GG	AA AA GG	GG AG AA	GA AG AA	AA AG AA	GG AG AG	GA AG AG	AA AG AG	GG AG GG	GA AG GG	AA AG GG	GG GG AA	GA GG AA	AA GG AA	GG GG AG	GA GG GA	AA GG AG	GG GG AA	GA GG GG	AA GG GG
Група кон- тролю (n= 46)	63,0 (29)	4,3 (2)	0	23,9 (11)	0	0	0	0	0	4,3 (2)	0	0	4,3 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Хворі на АБА (n= 45)	51,1 (23)	6,7(3)	0	20,0 (9)	2,2 (1)	0	2,2 (1)	2,2 (1)	0	6,7 (3)	0	0	6,7 (3)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Висновки:

1. В групі хворих на БА достовірно частіше зустрічається генотип GA (11,1%) гену TLR2 ($p=0,04$) в порівнянні з групою контролю. У пацієнтів, які є носіями мутантної алелі A гену TLR2 в анамнезі частіше відмічались пневмонії ($p = 0,046$), а також були ознаки кандидозу ($p = 0,034$) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму.

2. При вивченні поліморфізму гену TLR 4 з'ясовано, що генотип AG статистично вірогідніше ($p = 0,04$) зустрічається в групі з БА (15,6%) ніж в контрольній групі. У хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR4 захворювання починалось з дитинства ($p=0,03$), в спектрі сенсibiliзації були харчові чинники ($p=0,02$) та мали місце прояви іншої алергічної патології ($p=0,045$).

3. Поліморфний варіант 38G гену CC16 достовірно частіше зустрічається у хворих з БА ніж в групі популяційного контролю ($p = 0,019$). Особливостями клінічних проявів БА у хворих, які є носіями алелі 38G гену CC16 є: грибкова сенсibiliзація, atopічний дерматит та туберкульоз в анамнезі, необхідність в частішому прийомі глюкокортикостероїдів.

Отже, дослідження поліморфізмів 896A/G гену TLR4 та 2258G/A гену TLR2, A38G гену CC16 має важливе значення, як в діагностиці так і в лікуванні та профілактиці БА.

Література

- Anne L. Wright Анализ эпидемиологических исследований: факты и артефакты // Аллергология. — 2003. — № 2. — P.26-28
- Candelaria P.V. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes./ P.V. Candelaria, Backer V, et al // Immunogenetics. -- 2005.-- №57 -- P.25-32.
- Claire de Burbure. Uteroglobin-Related Protein 1 and Clara Cell Protein in Induced Sputum of Patients With Asthma and Rhinitis/ Claire de Burbure, Patrizia Pignatti, Massimo Corradi // Chest.—2007.-- №131.—P.172-179.
- Galli E., Ciucci A., Cersosimo S. Et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms. J. Immunopathol. 2010- №2- P. 671- 675.
- Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R. Going from evidence to recommendation.// BMJ- 2008.- P. 336
- Long Xiao-Bo. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF- κ B Activity in Airway Epithelial Cells./ Xiao-Bo Long// April 2012.-- Volume 7.-- режим доступу: www.plosone.org
- Michael S. D. Kormann, PhD. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. J. Allergy and clinical immunology. 2008; Vol.122: 86-92.
- Postma D., Koppelman G. Genetics of asthma: where are we and where do we go? The Proceedings of the American Thoracic Society. 2009; V. 6: 283-287.
- Thoma-Uszynski S. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptor/ S. Thoma-Uszynski // Science.- 2001. — Vol 291. — P. 1544 – 1547.
- Yang I.A. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics/ IA Yang1, SJ Barton1, S Rorke1 and other// Genes and Immunity.-2004.- V5.-P. 41–45
- Yoshika M., Fukuishi N., Iriguchi S., et al. Lipoteichoic acid downregulates Fc γ RI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. J. Allergy. Clin. Immunol. 2007.- V. 120.-P. 452-461.
- Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О. та ін. Роль поліморфізму Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом / Проблеми екол. та мед. — 2009. — Т.13, № 5-6. — С. 3-6.
- Крючко Т.О., Кайдашев І.П., Вовк Ю.О. и др. Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою / Клін. імунол. Алергол. Інфектол. — 2011. — № 5. — С. 52-54.
- Куценко Н.Л. Ассоциация полиморфизма Toll-подобного рецептора 4 Asp299Gly с повышенным уровнем продукции аллергенспецифических иммуноглобулинов Е у пациентов с аллергическими заболеваниями./ Н.Л Куценко., О.В Измайлова., Л.Э. Веснина [та ін.]// Иммунология. —2011.-- №6 -- С. 310-313.
- Левченко Л. Ю. Поліморфізм 896 A/G гену TLR4, а не гену 1196 C/T гену TLR4 та 2258 G/A гену TLR2, визначає тяжкий перебіг atopічного дерматиту у дітей. / Л. Ю. Левченко, О.В. Ізмайлова, О. А. Шликова [та ін.]// Цитологія і генетика. — 2013-- №1.—С. 41-45.
- Охотникова Е.Н. Аллергический «марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей (лекция) // Современ. педиатрия. - 2008. - №4(21). - С.190-197.
- Черкашина И.И., Никулина С.Ю. Клинико-генетические особенности больных бронхиальной астмой и их родственников // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. — №9. — С. 47-50.
- Чучалин А.Г. Бронхиальная астма и астма подобные состояния // Пульмонология. — 2007. — №11. — С. 1-9

English version: THE ROLE OF GENES POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2,4 AND CLARA CELL PROTEIN IN THE DEVELOPMENT OF ASTHMA IN ADULTS*

Lyahovskaya N.V., Izmailova O.V., Shlykova O.A., Kaydashev I.P.

Research Institute for Genetic and immunological bases for the development of pathology and pharmacogenetics Supreme State educational institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava.

Genetic aspects of asthma and atopy have been widely studied. Candidate genes and loci of chromosomes probably responsible for the occurrence of bronchial asthma (BA) is defined by a large amount. The aim of our work was to study polymorphisms 2258G / A gene TLR2 (rs5743708) and 896A / G gene TLR4 (rs4986791), Clara cell protein gene (A38G), with a specific weight of 16 kDa (CC16) in the adult population. Materials and Methods. We examined 45 patients with asthma in the period without exacerbation. Diagnosis of asthma severity and installed in accordance with the approved criteria. Results: Patients with BA significantly more common had genotype GA (11,1%) gene TLR2 ($p = 0.04$) compared with the control group. In patients who are carriers of a mutant allele of a gene TLR2 A history pneumonia frequently observed ($p = 0.046$) and there were signs of candidiasis ($p = 0.034$) compared with patients with no polymorphism. In the study of polymorphism of TLR 4 found that genotype AG statistically more likely ($p = 0.04$) is found in the BA group (15.6%) than in the control group. Patients with polymorphism 896A / G TLR4 gene disease begins in childhood ($p = 0.03$) in the spectrum of sensitization were dietary factors ($p = 0.02$) and there were other manifestations of allergic diseases ($p = 0.045$). Polymorphic variant gene 38G CC16 significantly more common in patients with BA than in the control population ($p = 0.019$). Clinical manifestations in patients with BA who are carriers of the gene allele 38G CC16 are fungal sensitization, atopic dermatitis and history of tuberculosis, the need for frequent doses of glucocorticoids.

Key words: asthma, Toll Like receptor, polymorphism, Clara cell protein.

Bronchial asthma (BA) is a global problem [5]. Based on standardized methods for estimating the prevalence of asthma in adults and children, it can be argued that this figure in different countries ranges from 1 to 18% of the population has steadily increased. In particular, in Russia for the last 20 years, the prevalence of asthma increased by almost a factor of 2 and is now 10-15% of the population [18]. Multifactorial nature of the formation of asthma include genetic predisposition, environmental influences, immune and neurogenic level of nonspecific and specific hyperreactivity, the role of viral and microbial factor requires consideration of each additional component, capable of influencing the course of asthma [1]. Genetic aspects of asthma and atopy have been widely studied. Candidate genes and loci of chromosomes probably responsible for the occurrence of BA has defined a large number. Most often in the literature refer about the regions of chromosomes 5q23-31, 6p21.1-p23, 11q13, 12q14-24.33 and 13q11-32. In this regard, in the last decade of great interest associated with a change of the genetic regulation of Toll-like receptors (TLR) [8]. E.Gali et al. [4] found no association between eczema and food allergy mix-mutation TLR2, whereas other studies confirm the correlation between the concentration of IL4, IgE and violations in this gene [11]. Some authors point to a relationship between the level of IgE and genes TLR4 [14], other scholars argue that in some cases do not have the relationship with specific sensitization [7]. We can conclude that the presence of TLR4 gene polymorphisms in children with atopic dermatitis can promote hypersensitivity to viral infections and burden of the disease [15] define the changing nature of the course and severity of clinical manifestations of asthma in children. [13].

Currently, a limited number of studies conducted on the impact of genetic variants on the development of BA CC16, their results have been mixed (Baldini et al., 1998; Gui et al., 2003; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998a; Laing et al., 1998; Sengler et al., 2003; Sharma and Ghosh, 2004). Most scientific research in small population group confirm the association between the polymorphism of CC16 and risk asthma (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Mansur et al., 2002; Saadat et al., 2004).

The aim of our work was to study polymorphisms 2258G / A gene TLR2 (rs5743708) and 896A / G gene TLR4 (rs4986791), Clara cell protein gene (A38G), with a specific weight of 16 kDa (SS16) in the adult population of Poltava regions and determine the clinical course BA based on changes in the genome.

Materials and Methods. We examined 45 patients with the BA. Diagnosis of asthma and its severity will establish the approved criteria (international recommendations GINA, 2011) on the basis of Allergy and Pulmonology Poltava Regional Hospital. All patients with BA were held general clinical laboratory and instrumental examination of allergy (skin prick test). The survey was carried out in the absence of the patient's worsening primary or concomitant chronic, non-acute intercurrent infectious diseases and severe comorbidity, which could affect the results of the study. The control group included 90 DNA samples from healthy individuals without allergic history of DNA base CRI genetic and immunological bases for the development of pathology and pharmacogenetics of Ukrainian Medical Dental Academy. Identification of polymorphisms 2258G / A gene TLR2 and 896A / G gene TLR4, gene CC16 conducted by polymerase chain reac-

* To cite this English version: Lyahovskaya N.V., Izmailova O.V., Shlykova O.A., Kaydashev I.P.. The Role of Genes Polymorphism of Toll-like Receptors 2,4 and Clara Cell Protein in the Development of Asthma in Adults // Problemy ekologii ta medytyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 76 -80.

tion [12]. The phenotype of the lymphocytes was assessed by determining the expression levels of cell surface antigens using the monoclonal antibodies CD4 +, CD25 ("Sorbent", Russia), and Intracellular protein FoxP3 ("eBioscience", USA) on a flow cytometry EPIC LX-MCL (Beckman Coulter, USA) using a program System II TM software. Serum total IgE, IL-4, 10 (OOO "Ukrmed Don", Ukraine) in serum was determined by indirect IFA analysis.

Mathematical processing of the data was performed using the program «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). The distribution of genotypes of polymorphic loci with the test checked for compliance with Hardy-Weinberg equilibrium using the criterion χ^2 . Comparison of genotype frequencies between the study groups was performed by analysis of contingency tables using Fisher's exact test. To compare the allele frequencies used criterion χ^2 . To assess the significance of differences between groups using two-tailed Fisher's exact (for small groups). For all types of analysis were considered statistically significant differences at $p < 0.05$.

Results and discussion. Genetic determinism of BA recently regarded as one of the main factors in the etiopathogenesis of this disease [16]. Among surveyed in 3 (6.6%) patients had allergic reactions on the part of both parents, mother - in 16 people (35.5%), father - in 10 people (22.2%). Thus, the transmission of hereditary predisposition to allergic diseases often marked on the mother, which is consistent with literature data [17].

We analyzed the frequency of polymorphic variants of genes TLR 2, TLR4, CC16 gene among patients with BA and population control group (Table 1). Individuals who belonged to the control group, the frequency of TLR2 GG genotype was 97.8%, the frequency of heterozygous genotype GA - 2.2%, AA genotype was detected. Pa-

tients with BA results were : GG - 88.9%, GA - 11.1% and AA also was not identified, there was a statistically significant difference ($p = 0.04$) between the frequencies of genotypes in the control group and patients BA. Frequency of allele A of the control group was 1.1%, and among patients BA - 5.6%, which did not differ significantly ($p = 0.08$) (Table 1).

In the study of polymorphism 896A / G TLR4 gene in the control group, the frequency of AA genotype was 95.6%, heterozygous genotype AG - 4.5%, GG genotype was not found. Patients BA respectively: AA - 84.4%, AG - 15.6%, GG - not found. Between the frequencies of genotypes in the population control group and patients with BA was significant difference ($p < 0.05$), which can characterize this pathology is an inherited disorder of the immune response. The frequency of the mutant G allele in patients with BA was statistically higher ($p = 0.064$) and was 7.8%, compared with the control group (Table 1).

The control group for the study of gene polymorphism CC16 was selected 46 DNA samples from people who are not suffering from an allergic pathology. Within this group the results were as follows: the frequency of the homozygous AA genotype was 86.9% (40 people), GG genotype was not detected, the frequency of the heterozygous genotype AG was 13% (6 people). Patients BA relevant data were as follows: genotype AA - 64.4% (29 people), AG - 28.9% (13 people), GG 6.52% of patients (3 people), that is, between the frequencies of genotypes in the group control and patients BA noted a significant difference ($p = 0.019$). Frequency of allele A in the control group was 93.4% in patients with AAA - 78.9%. G allele frequency among patients with BA was 7.8% in the control group - 2.2%, which did not differ significantly ($p = 0.06$) (Table 1).

Table 1.
The Frequency Distribution of Genotypes and Alleles gene's TLR2, TLR4, CC16

Gene, polymorphism	Genotypes	Control group	Patients with asthma (n=45)	p^*	Alleles	Control group	Patients with asthma (n=45)	χ^2 , df=1	p^{**}
TLR2 2258G/A	GG	97,8 (88)	88,9 (40)	0,04	G	98,9 (178)	94,4 (85)	3,10	0,08
	GA	2,2 (2)	11,1 (5)		A	1,1 (2)	5,6 (5)		
	AA	-	-						
TLR4 896A/G	AA	95,6 (86)	84,4 (38)	0,04	A	97,8 (176)	92,2 (83)	3,42	0,06
	AG	4,5 (4)	15,6 (7)		G	2,2 (4)	7,8 (7)		
	GG	-	-						
CC 16 A38G	AA	86,9 (40)	64,4 (29)	0,019	A	86	71	6,99	0,008
	AG	13 (6)	28,9 (13)		G	6	19		
	GG	-	6,52 (3)						

* $p \leq 0,05$ in comparison with the control group

In the analysis of intra-frequency distribution of all the above genotypes and alleles observed uneven distribution of alleles, as indicated by the analysis of index excluding rare alleles ($a < 2$) and the proportion of rare alleles ($h > 0$). For all the studied loci in the control groups and patients ABA genotype distributions were as expected for the equilibrium of Hardy - Weinberg. Also found a match expected heterozygosity and heterozygosity, which is observed, indicating that the equilibrium genetic structure of the population. Heterozygous genotype GA gene TLR 2 ($n = 5$) was observed only in women (100%). Significantly more often carriers of allele A ($p = 0.046$) had a history of pneumonia (2 or more times during his life), and there were signs of candidiasis ($p = 0.034$) compared with patients without the polymorphism

(Table 2). Due to changes in the TLR2 gene detection is a disturbance of infectious agents (including fungal), which leads to an imbalance of the innate immune system functioning and development of chronic inflammatory diseases. When comparing the levels of immunological parameters in patients with different BA TLR2 gene variants statistically significant difference was observed only in the concentrations of cytokines. Thus, high levels of IL-4 ($63,7 \pm 8,7$, pg /L) were observed in the group without exhibiting polymorphism (Mann-Whitney U ($n_1 = 40$; $n_2 = 5$) 2.79, $p = 0.005$) and IL-10 levels were significantly elevated in carriers of heterozygous genomic embodiment TLR2 (Mann-Whitney U ($n_1 = 40$; $n_2 = 5$) 33.0, $p = 0.01$) (Table 3).

Table 2
The Clinical Features of Asthma Depend on Genes Variants TLR2, TLR4, CC16

Attribute		Genotypes GG gene TLR2, (n=40)	Genotypes GA gene TLR2, (n=5)	p [*]
Polymorphism 2258G/A gene TLR2				
Frequent pneumonia (more than 2 time a life)	yes	12	4	0,046
	no	28	1	
Symptoms of candidiasis and \ or fungal skin lesions	yes	11	4	0,036
	no	29	1	
Polymorphism 896A/G gene TLR4				
		Genotypes AA gene TLR4, (n=38)	Genotypes AG gene TLR4, (n=7)	p [*]
Polysensibilisation that including food alergens	yes	7	7	0,013
	no	31	0	
Comorbidities (rhinitis, conjunctivitis)	yes	6	5	0,045
	no	32	2	
"Atopic march" in the history of deases	yes	7	6	0,029
	no	31	1	
Polymorphism A38G gene CC16				
		Genotypes AA gene CC16, (n=29)	Genotypes AG gene CC16, (n=16)	p [*]
Comorbidities atopic dermatitis	yes	4	6	0,04
	no	24	10	
More likely to use inhaled glucocorticoids	yes	3	9	0,02
	no	26	7	
Funginal sensibilisation	yes	3	8	0,03
	no	26	8	

Gene SNP TLR4, which encodes the extracellular structure ektodomenu receptor is replaced by a glycine amino acid aspartic Asp299Gly 1187 (rs4986790) and the final stage is connected with a suppressed phosphorylation of I κ B- α following stimulation with LPS, which in turn leads to a decrease in translocation of NF κ B nucleus and affects the synthesis of the corresponding inhibition of proinflammatory cytokines. Further disruption of NF κ B activation signal is accompanied by an imbalance of Th1/Th2 synthesis and determines the severity of the clinical manifestations of the disease and the presence of comorbidity. Asp299 Gly TLR4 polymorphism with change of Asp to Gly allele was detected in 7 patients. In 6 persons in this group ($p = 0.03$) manifestations BA began in early childhood, and 4 patients underwent standard steps "atopic march." Significantly more often ($p = 0.02$) in these patients compared with patients without these genetic changes determined dietary factors sensitization. Clinical sign of the TLR4 SNP was also associated with allergic pathology ($p = 0.045$) and gastrointestinal diseases (Table 2). Thus, gene polymorphism Asp299 Gly TLR4 mainly affects the common manifestations of atopy patients with BA than signs bronchopulmonary difunktsii and severity of this disease, in contrast to the data obtained by other authors [10] showed a significant change in the level of CD4⁺ / 25⁺ / Foxp3⁺

(Mann-Whitney U ($n = 38$; $n = 7$) = 68,0; $p = 0,04$) and IL10 patients with polymorphism 896A / G gene TLR4 (Mann-Whitney U ($n = 38$; $n = 7$) = 60,5; $p = 0,02$) (Table 3). In reviewing the results of gene polymorphism CC 16 found that the vast majority of individuals had sensitization to two or more allergens feature of these patients had hypersensitivity to fungal allergens (often group Aspergillus), so in the group with heterozygotes gene CC16 these manifestations were 6 people mutant homozygotes in 2 people, which is statistically significant when compared with the AA genotype CC16 gene (Table 3). Our results coincide with the scientific data [3] on the importance pathogenetic damaging effects on lung epithelium fungal allergens, but statistically significant indicators, unlike us, they have not received. Among comorbidities noteworthy significant difference on Fisher's exact test (Table 2) by the number of individuals with atopic dermatitis in comparison with groups polymorphism CC16. Thus, among the genotype GG2 persons who suffer from intermittent for atopic dermatitis among genotype AG - 4 people. In fact, the effect of the polymorphism of lung epithelial cells (CC16) on the skin damage is contradictory character, but there are authors [2], which indicate a direct relationship between gene polymorphism CC16 patients with atopic dermatitis in adults.

Table 3
Immunological parameters Dependency Genotypes

Immunological parameters	Genotypes GG gene TLR2, (n=40)	Genotypes GA gene TLR2, (n=5)	p
Polymorphism 2258G/A gene TLR2			
IL-10, pg/l	0,42±0,02	0,7 ± 0,05	0,013
IL-4, pg/l	63,7±8,7	24,1 ±6,28	0,03
Polymorphism 896A/G gene TLR4			
	Genotypes AA gene TLR4, (n=38)	Genotypes AG gene TLR4, (n=7)	p
CD 4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺ , G/l	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04
IL-10, pg/l	0,45±0,02	0,35 ± 0,03	0,02
Polymorphism A38G gene CC16			
	Genotypes AA gene CC16, (n=29)	Genotypes AG gene CC16, (n=16)	p
IgE, MOd/ml	123,7 ± 12,26	244,9 ± 30,33	0,0013

In the analysis of immunological data of patients with different variants of the BA genotypes CC16 found that a statistically significant difference was observed only at the level of total IgE. The carriers of the heterozygous gene CC16 figure was 244,9 ± 30,33 MOD / ml, homozygote GG 191,7 ± 13,0 MOD / ml, homozygote AA - 123,7 ± 12,26 MOD / ml, which is significantly (Kruskal-Wolisa method, p = 0.0013) (Table 3). The data on total IgE levels depending on the state of the genetic apparatus CC16. Perhaps this is due to located on chromosome 11q13, as Clara cell protein gene and FcεRI-receptor - b (FcεRI-b) IgE.

In the analysis of drug treatment found that genotype AG or GG CC 16 gene significantly increased the use of glucocorticoids (Table 2). Low sensitivity to these agents can be explained by similar mechanism of action of Clara cell protein and glucocorticoids [9].

Another feature of the carriers of the mutant homozygous genotype (GG) is transferred active tuberculosis in 2 of 3 patients (8 and 18 years prior to our survey). It is known that tuberculosis is an infectious disease whose activity depends on many factors, among them, possibly, changes in gene SS16. However, there is evidence that activation of TLR2 leads to intracellular killing M. tubercu-

losis macrophages [6]. To determine the possible combinations of different genotypes of all genes, which are determined by an analysis of haplotypes. For carrying out statistical processing of the data 46 DNA samples selected from the above control group TLR-receptors. Revealed that most often occurring haplotype GGAAAA as in the control group, and patients BA (Table 4). In our study revealed that one person with the GG genotype SS16 gene (haplotype - GAAAGG) and 1 man with the AA genotype (haplotype GAAAAA) SS16 gene variant were heterozygous (GA) TLR2 gene and had a history of manifestations of active TB. In the analysis of haplotypes and gene TLR4 CC16 found that 3 people from the heterozygous genotype SS16 gene (haplotype GGAGAG) and 1 person from homozygotes (haplotype GGAGGG) were heterozygous gene variant Tlr4, all these patients had frequent manifestation of SARS that were protracted and require the use of antimicrobials. In the analysis of immunological parameters of carrier haplotypes revealed that the level of a statistical trend (r ≤ 0,06) different levels of CD4⁺ / 25⁺ / Foxp3⁺ carriers haplotypes with mutant allele. Study of polymorphic gene haplotypes CC16, TLR2 and TLR4 is an important aspect in understanding the clinical manifestations of the BA.

Table 4
Gaptypes of genes TLR2, TLR4, CC16

CC 16 TLR 4 TLR 2	GG AA AA	GA AA AA	AA AA AA	GG AA AG	GA AA AG	AA AA AG	GG AA GG	GA AA GG	AA AA GG	GG AG AA	GA AG AA	AA AG AA	GG AG AG	GA AG AG	AA AG AG	GG AG GG	GA AG GG	AA AG GG	GG GG AA	GA GG AA	AA GG AA	GG GG AG	GA GG GA	AA GG AG	GG GG AA	GA GG GG	AA GG GG
Control group (n= 46)	63,0 (29)	4,3 (2)	0	23,9 (11)	0	0	0	0	0	4,3 (2)	0	0	4,3 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Patients with asthma (n=45)	51,1 (23)	6,7(3)	0	20,0 (9)	2,2 (1)	0	2,2 (1)	2,2 (1)	0	6,7 (3)	0	0	6,7 (3)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Conclusions:

Patients with BA significantly more common had genotype GA (11,1%) gene TLR2 (p = 0.04) compared with the control group. In patients who are carriers of a mutant allele of a gene TLR2 A history pneumonia frequently observed (p = 0.046) and there were signs of candidiasis (p = 0.034) compared with patients with no polymorphism.

In the study of polymorphism of TLR 4 found that genotype AG statistically more likely (p = 0.04) is found in the BA group (15.6%) than in the control group. Patients with polymorphism 896A / G TLR4 gene disease begins in childhood (p = 0.03) in the spectrum of sensitization were dietary factors (p = 0.02) and there were other manifestations of allergic diseases (p = 0.045).

Polymorphic variant gene 38G CC16 significantly more common in patients with BA than in the control population (p = 0.019). Clinical manifestations in patients

with AAA who are carriers of the gene allele 38G CC16 are fungal sensitization, atopic dermatitis and history of tuberculosis, the need for frequent doses of glucocorticoids.

Thus, the study of polymorphisms 896A / G TLR4 gene and 2258G / A gene TLR2, A38G CC16 gene is important in the diagnosis and treatment and prevention of the BA.

literature

1. Anne L. Wright Анализ эпидемиологических исследований: факты и артефакты // Аллергология. — 2003. — № 2.—P.26-28
2. Candelaria P.V. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes./ P.V. Candelaria, Backer V, et al // Immunogenetics. -- 2005.-- №57 -- P.25-32.
3. Claire de Burbure. Uteroglobin-Related Protein 1 and Clara Cell Protein in Induced Sputum of Patients With Asthma and Rhinitis/ Claire de Burbure, Patrizia Pignatti, Massimo Corradi // Chest.—2007.-- №131.—P.172-179.
4. Galli E., Ciucci A., Cersosimo S. Et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms. J. Immunopathol. 2010- №2- P. 671- 675.
5. Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R. Going from evidence to recommendation.// BMJ- 2008.- P. 336
6. Long Xiao-Bo. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF-kB Activity in Airway Epithelial Cells./ Xiao-Bo Long// April 2012.-- Volume 7.-- режим доступу: www.plosone.org
7. Michael S. D. Kormann, PhD. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. J. Allergy and clinical immunology. 2008; Vol.122: 86-92.
8. Postma D., Koppelman G. Genetics of asthma: where are we and where do we go? The Proceedings of the American Thoracic Society. 2009; V. 6: 283-287.
9. Thoma-Uszynski S. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptor/ S. Thoma-Uszynski // Science.- 2001. – Vol 291. – P. 1544 – 1547.
10. Yang I.A. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics/ IA Yang1, SJ Barton1, S Rorke1 and other// Genes and Immunity.-2004.- V5.-P. 41–45
11. Yoshika M., Fukuishi N., Iriguchi S., et al. Lipoteichoic acid downregulates FcεRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. J. Allergy. Clin. Immunol. 2007.- V. 120.-P. 452-461.
12. Izmaylova O.V., Shlikova O.A., Bobrova N.O. та in. Rol' polimorfizmu Toll-podibnogo receptora 4 Asp299Gly u rozvitku bakterial'nich infekziy, schope-redayut'sya statevim shlyachom / Problemi ekol. ta med. – 2009. – T.13, № 5-6. – S. 3-6.
13. Kryuchko T.O., Kaydashev I.P., Vovk Yu.O. i dr. Genetich-niy polimorfizm Toll-podibnogo receptora 4 u ditey z atopichnoyu bronchial'noyu astmoyu / Klin. imunol. Alergol. Infektol. – 2011. – № 5. – S. 52-54.
14. Kuzenko N.L. Assoziatsiya polimorfizma Toll-podobnogo receptora 4 Asp299Gly s povyshennym uro-vnem produkzii allergenspezificheskikh immunoglo-bulinov E u pazientov s allergicheskimi zabolevani-yami./ N.L. Kuzenko., O.V. Izmaylova., L.E. Vesnina [ta in.] // Immunologiya. –2011.-- №6 -- S. 310-313.
15. Levchenko L. Yu. Polimorfizm 896 A/G genu TLR4, a ne genu 1196 S/T genu TLR4 ta 2258 G/A genu TLR2, viznachae tyazhkiy perebig atopichnogo dermatitu u ditey. / L. Yu. Levchenko, O.V. Izmaylova, O. A. Shlikova [ta in.].// Zitologiya i genetika. – 2013-- №1.—C. 41-45.
16. Ochotnikova E.N. Allergicheskii «marsh»: svyaz' pokoleniy i eskalaziya allergii u detey (lekziya) // Sovre-men. pediatriya. - 2008. - №4(21). - S.190-197.
17. Cherkashina I.I., Nikulina S.Yu. Kliniko-geneticheskie osobennosti bol'nykh bronchial'noy astmoy i ich rodst-vennikov // Problemy tuberkuleza i bolezney leg-kich. - 2008. – №9. – S. 47-50.
18. Chuchalin A.G. Bronchial'naya astma i astma podobnye sostoyaniya // Pul'monologiya. – 2007. – №11. – S. 1-9.

Матеріал надійшов до редакції 3.12.2013.

Інформація для авторів

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

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

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

На першій сторінці зазначаються: шифр УДК; прізвища авторів, ініціали, наукові ступені та звання; назва статті; установи, де працюють автори, місто; ключові слова – від 5 до 10 слів або словосполучень, що розкривають зміст статті. Назва статті російською, українською та англійською мовами повинна бути стислою і не перевищувати 120 символів. Підзаголовок є прийнятним. Текст статті повинен бути структурований наступним чином: вступ, мета, матеріал і методи, результати та висновок. На останній сторінці тексту власноручні підписи всіх авторів: прізвище, ім’я та по-батькові, поштова адреса, номери телефонів (службовий, домашній), за якими редакція буде контактувати із авторами. Подаючи статтю до редакції, автори тим самим підтверджують оригінальність роботи. Це означає, що авторські права або будь-які інші права власності третіх осіб не порушуються. Підписами автори засвідчують, що жодна частина рукопису не була опублікована і не прийнята до друку іншими виданнями. Текст друкується шрифтом не менше 2,8 мм на білому папері через два інтервали, на аркушах формату A4 (210x297 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. Автори подаються за абеткою, спочатку джерела кирилицею, потім латиницею. Посилання у тексті позначаються цифрами у [квадратних] дужках. Порядок оформлення списку літератури: для монографій – Прізвище, ініціали. Назва книги. Місце видання: видавництво, рік видання. Кількість сторінок; для журналів – Прізвище, ініціали. Назва статті. Назва журналу. Том, номер. Рік: сторінки, на яких вміщено статтю.

Одночасно, автори надають повний переклад тексту, підписуночних 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 остаточною 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). Автори повинні підтвердити відповідність нормативам утримання та годування тварин (Європейська конвенція по захисту хребтових тварин, що використовуються з експериментальною або іншою метою. – Страсбург, 1986), наявність сертифікату якості, а також повідомити джерело набуття тварин. Необхідно описати всі процедури, які виконуються на тварині, дози препаратів, що вводилися, хірургічні втручання та інші дії, а також відмітити використання при цьому методів анестезії (див. інформацію про Права Людини і Тварини).

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

Information for authors

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

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

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

The first page contains UDC code, author's record (name, initials, scholar degrees, title, the title of the article, institution, city) and keywords – from 5 to 10 words or phrases revealing the content of the article. Title of the paper in Russian, Ukrainian and English should be concise, it must not exceed 120 characters. A subtitle is acceptable. The text of original papers must be divided into paragraphs, including introduction, the aim of the research, materials and methods, results and conclusions. The last page must be manually signed by author(s) of the article, featuring first name, last name and patronymic, address, telephone numbers (office, home) for Editorial office to keep contact with. By submitting a paper to the editor, authors thereby confirm the original form of the articles, which means that the copyright or any other property rights of the third parties are not violated. The author(s) sign the article thereby certifying that neither part of the suggested research has been published or accepted for publication in other journals. The text of the manuscript must be in printing type no less than 2,8 mm, double-spaced, on A4-size sheets (210x297 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.

