

#9 (49), 2019 część 1

Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe
(Warszawa, Polska)

Czasopismo jest zarejestrowane i publikowane w Polsce. W czasopiśmie publikowane są artykuły ze wszystkich dziedzin naukowych. Czasopismo publikowane jest w języku polskim, angielskim, niemieckim i rosyjskim.

Artykuły przyjmowane są do dnia 30 każdego miesiąca.

Częstotliwość: 12 wydań rocznie.

Format - A4, kolorowy druk

Wszystkie artykuły są recenzowane

Każdy autor otrzymuje jeden bezpłatny egzemplarz czasopisma.

Bezpłatny dostęp do wersji elektronicznej czasopisma.

Zespół redakcyjny

Redaktor naczelny - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

Rada naukowa

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

#9 (49), 2019 part 1

East European Scientific Journal
(Warsaw, Poland)

The journal is registered and published in Poland. The journal is registered and published in Poland. Articles in all spheres of sciences are published in the journal. Journal is published in English, German, Polish and Russian.

Articles are accepted till the 30th day of each month.

Periodicity: 12 issues per year.

Format - A4, color printing

All articles are reviewed

Each author receives one free printed copy of the journal

Free access to the electronic version of journal

Editorial

Editor in chief - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

The scientific council

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

Dawid Kowalik (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Peter Clarkwood(University College London)
Igor Dziedzic (Polska Akademia Nauk)
Alexander Klimek (Polska Akademia Nauk)
Alexander Rogowski (Uniwersytet Jagielloński)
Kehan Schreiner(Hebrew University)
Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Anthony Maverick(Bar-Ilan University)
Mikołaj Żukowski (Uniwersytet Warszawski)
Mateusz Marszałek (Uniwersytet Jagielloński)
Szymon Matysiak (Polska Akademia Nauk)
Michał Niewiadomski (Instytut Stosunków Międzynarodowych)
Redaktor naczelny - Adam Barczuk

1000 kopii.

Wydrukowano w «Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warszawa, Polska»

Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe

Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001
Warszawa, Polska

E-mail: info@eesa-journal.com ,
http://eesa-journal.com/

Dawid Kowalik (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Peter Clarkwood(University College London)
Igor Dziedzic (Polska Akademia Nauk)
Alexander Klimek (Polska Akademia Nauk)
Alexander Rogowski (Uniwersytet Jagielloński)
Kehan Schreiner(Hebrew University)
Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Anthony Maverick(Bar-Ilan University)
Mikołaj Żukowski (Uniwersytet Warszawski)
Mateusz Marszałek (Uniwersytet Jagielloński)
Szymon Matysiak (Polska Akademia Nauk)
Michał Niewiadomski (Instytut Stosunków Międzynarodowych)
Editor in chief - Adam Barczuk

1000 copies.

Printed in the "Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw, Poland»

East European Scientific Journal

Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw,
Poland

E-mail: info@eesa-journal.com ,
http://eesa-journal.com/

СОДЕРЖАНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Бородина А.В.

НАКОПЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ И АЛЛОМЕТРИЧЕСКИЙ РОСТ МОЛЛЮСКА *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIÈRE, 1789)4

Иманбаева А.А., Ишмуратова М.Ю., Дүйсенова Н.Т.

АНАЛИЗ ФЛОРЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ МАНГИСТАУСКОЙ ОБЛАСТИ И ВЫБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ИНТРОДУКЦИИ8

ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ

Дуда Ю. В., Шевчик Р. С., Кунєва Л. В.

Вплив *TREPONEMA CUNICULI* НА ПОКАЗНИКИ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІNU ТА СТАН КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ КРОЛІВ13

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

Bykhovets M.

INFORMATION VALUE OF BIOCHEMICAL MARKERS FOR EVALUATION OF LIPID DYSMETABOLISM SECONDARY TO HYPERGLYCAEMIA IN PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS19

Фищенко В. А., Маммадов Л. А., Обейдат Халед Джамал Салех

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭТАПОВ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ26

Авдосьєв Ю. В., Паньків К. М., Устименко О. С.

ПРОГНОЗУВАННЯ ВАЖКОСТІ ПЕРЕБІGU ТА РИЗИК РОЗВИТКУ УСКЛАДНЕНЬ У ПАЦІЕНТІВ З ГОСТРИМ АЛІМЕНТАРНИМ ПАНКРЕАТИТОМ З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА PRSS132

Trofymov A., Starenkiy V., Svytnarenko A.

CONFORMAL RADIATION THERAPY WITH INDIVIDUAL PLANNING OF TARGET VOLUME FOR LOCALLY ADVANCED NON-METASTATIC PROSTATE CANCER: TRANSFORMATION OF CLINICAL SYMPTOMS AND A CHANGE IN THE QUALITY OF LIFE IN PATIENTS AT THE STAGE OF RADIATION TREATMENT38

Bashkirova A.D.

ANALYSIS OF PATHOGENETIC RELATIONS BETWEEN CLINICAL AND METABOLIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE ON THE BACKGROUND OF HYPERTENSION42

Kravets O.V., Chernienko V.V., Burtyn O.V.

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF SUBMENTAL ISLET FLAP AND RADIAL FOREARM FREE FLAP FOR TONGUE RECONSTRUCTION AFTER HEMIGLOSSECTOMY48

Дацковский И. (Модестович В.)

К ВОПРОСУ ОБ УТОЧНЕНИИ ТЕРМИНОВ "СИНДРОМ", "СИМПТОМОКОМПЛЕКС" И ДРУГИХ БАЗОВЫХ ТЕРМИНОВ В ПСИХИАТРИИ54

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Borodina A.V.
Ph.D. degree in Biological Science
IBSS, Russia

THE ACCUMULATION OF CAROTENOIDS AND ALLOMETRIC GROWTH BIVALVES *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIÈRE, 1789)

Бородина А.В.
к.б.н., с.н.с.,
ФИЦ ИнБиоМ РАН, Россия

НАКОПЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ И АЛЛОМЕТРИЧЕСКИЙ РОСТ МОЛЛЮСКА *CERASTODERMA GLAUCUM* (BRUGUIÈRE, 1789)

Summary. For studing allometric indicators and total carotenoids, more than 70 individuals of *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789) mollusks with a shell length of 12 to 30 mm were studied. The values of the exponent in allometric equations linking the mass of a whole mollusk, the mass of soft tissues and shells with the length of the leaf of the animal are given. A weakly positive allometry between the linear growth and height of the mollusk shell and a weakly negative allometry close to the isometry between the shell length and the mass of *C. glaucum* were revealed. The regularity between the accumulation of total carotenoids, the length and mass of the mollusk up to 4 g was shown. The found regularity did not apply to individuals at 2-4 stages of gonad maturity.

Аннотация: Для исследования аллометрических показателей и суммарных каротиноидов было исследовано более 70 экземпляров моллюсков *Cerastoderma glaucum* с длиной раковины от 12 до 30 мм. Приведены значения показателя степени в аллометрических уравнениях, связывающих массу целого моллюска, массу мягких тканей и раковины с длиной створки животного. Выявлена слабо положительная аллометрия между линейным ростом и высотой ракушки моллюска и слабо отрицательная аллометрия близкая к изометрии между длиной ракушки и массой *C. glaucum*. Показана закономерность между накоплением суммарных каротиноидов и длиной, а также массой моллюска до 4 г. Найденная закономерность не распространялась на особи, находящиеся на 2-4 стадии зрелости гонад.

Key words: allometric coefficients, mass-size characteristics, mollusks *Cerastoderma glaucum*, total carotenoids.

Ключевые слова: аллометрические коэффициенты, массово-размерные характеристики, моллюски *Cerastoderma glaucum*, суммарные каротиноиды.

Постановка проблемы.

Моллюски *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789) относятся к семейству Cardiidae, Heterodontia (Subclass) Euheterodontia (Infraclass) Imparidentia (Superorder) классу двустворчатых моллюсков [1]. Они являются одним из коренных представителей черноморской малакофауны, обитающие на рыхлых грунтах крымского побережья [2-4]. По типу питания этот моллюск относится к типичному облигатному сестенофагу, однако при увеличении пищевой конкуренции со стороны других сестенофагов, может питаться из водной толщи [5,6]. Отфильтровывая жабрами пищевые частицы из морской среды, взрослые особи питаются детритом, взвешенным органическим веществом, более молодые особи, в основном, одноклеточными донными водорослями [7]. Спектр питания отражается на накоплении каротиноидов – пигментов, водорослевого происхождения, накапливающихся в последующих трофических звеньях и подвергающихся в них метаболическому преобразованию. Накопление каротиноидов у моллюсков-фильтраторов носит не только видоспецифичный характер, но и подвержено

влиянию различных факторов: смены сезонов года, репродуктивного цикла, антропогенной нагрузке, различного рода пищевых деприваций и состояний гипоскии [8; 9]. Однако накопление каротиноидов в мягких тканях, как было показано на примере другого двустворчатого моллюска-фильтратора *Anadara kagoshimensis*, может коррелировать с ростовыми показателями [10].

Анализ последних исследований и публикаций

Исследования закономерностей аллометрического роста различных моллюсков, в том числе и представителей семейства Cardiidae проводились на протяжении ряда лет [5, 11, 12, 13]. Наиболее фундаментальная работа известна с 80-х годов прошлого столетия, где были установлены степенные зависимости между ростом, весом и обменными, фильтрационными процессами у пресноводных и некоторых видов морских моллюсков, а также даны объяснения аллометрических коэффициентов этих уравнений [11]. Упоминания о некоторых аллометрических параметрах *C. glaucum* в связи с адаптационными

процессами в Аральском и Азово-черноморском регионах имеются в работах Андреевой С.И.[5, 6].

С другой стороны, взаимосвязь между аллометрическими показателями и обменными процессами[11] и одним из важных биохимических показателей устойчивого развития и размножения моллюсков - процессом накопления каротиноидов (биологически активных веществ, участвующих в защитных, репродуктивных и других функциях организма) является интересным и малоизученным явлением [10, 15].

Выделение нерешенных ранее частей общей проблемы

В последние годы перечень моллюсков, с подробным аллометрическим исследованием массово-размерных характеристик растет и нуждается в расширении этих результатов различными биохимическими показателями для решения прежде всего спорных вопросов таксономии Bivalvia [5, 14]. Одним из таких биохимических показателей может быть накопление суммарных каротиноидов. Подобные исследования в этой области представляют интерес также в прикладном аспекте для развития конхиокультуры, отросли марикультуры.

Формулирование целей

Целью данной работы было провести аллометрические исследования массово-размерных характеристик и накопления суммарных каротиноидов у моллюсков *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789).

Изложение основного материала

Материалы и методы. Исследования проводились в период с 2018 по 2019 годы.

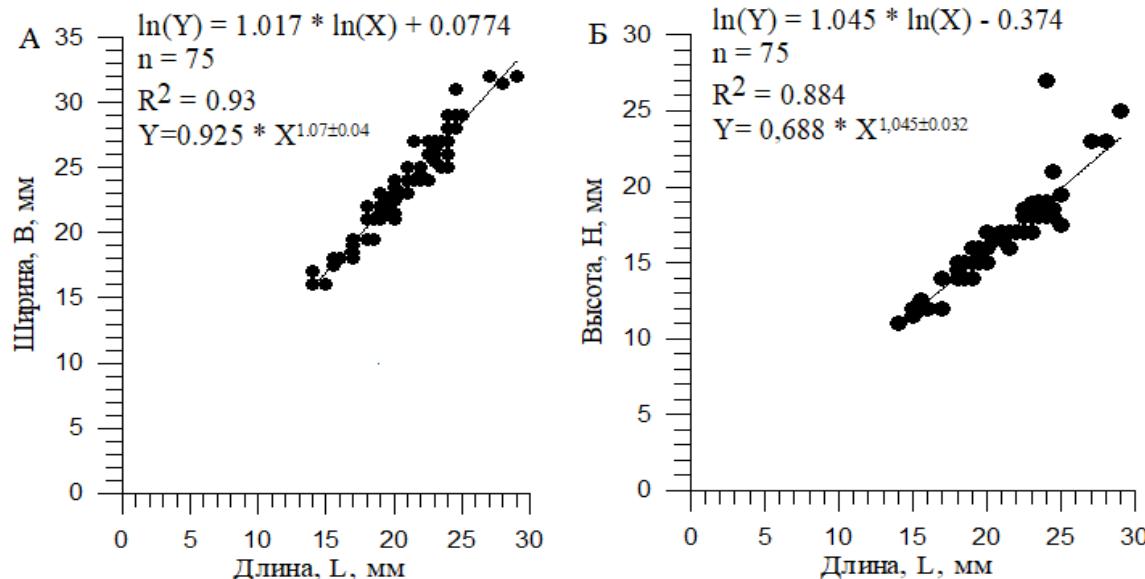


Рис. 1. Степенная зависимость роста ширины B (A) и высоты H (Б) створки от её длины L моллюска *C. glaucum*

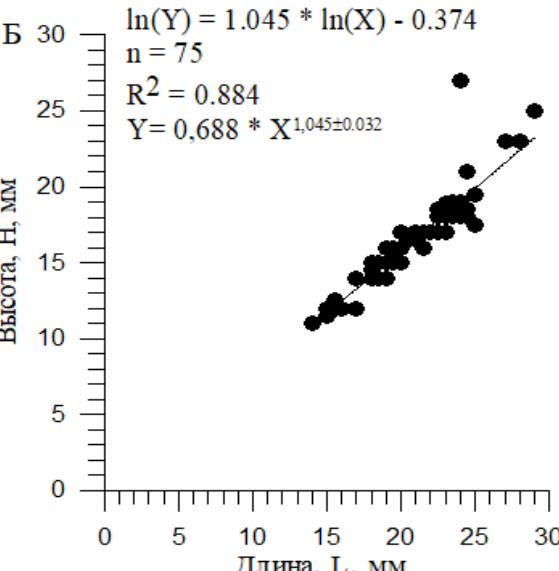
Уравнения регрессии (рис.1) имеют аллометрические коэффициенты $b_4=1.07$; $b_5=1.045$ близкие к изометрии, с положительной аллометрией. В соответствии с этим рост моллюска в длину будет очень близок к росту в ширину, а

объектами исследований являлись моллюски *C. glaucum*, обитающие в Казачьей бухте (г. Севастополя). Отбирали особи с длиной раковин от 12 до 30 мм. Выборка особей составила более 75 экземпляров. Измеряли длину ($30 > L > 12$, мм), высоту (H , мм) и ширину (B мм) раковины, регистрировали массу целого моллюска (M_m , г.), его мягких тканей (M_t , г.), и раковины (M_r , г.). Зависимости между линейными параметрами (L , H , B), линейными параметрами и общим весом моллюсков, весом раковин, весом мягких тканей были рассчитаны и представлены степенными уравнениями: $M_r = a * M_m^{b1}$; $M_r = a * L^{b2}$; $M_m = a * L^{b3}$, $H = a * L^{b4}$ $B = a * L^{b5}$ где a – коэффициент пропорциональности, b – показатель степени (основная искомая аллометрическая постоянная) [10, 11].

Суммарные каротиноиды определяли стандартным методом [15]. Для построения графиков и расчета зависимостей между показателями использовали программу Grapher 3. Достоверность отличия коэффициента b от единицы в размерных соотношениях и от трех масс-размерных зависимостей оценивали по соотношению: $Z = (b - 1)/SE$ – для размерных соотношений,

$Z = (b - 3)/SE$ – для масс-размерной зависимости. Значения в интервале $-1,96 < Z < +1,96$ соответствуют изометрии [16].

Результаты и обсуждения. Анализ взаимосвязи линейных параметров (L , H , B) моллюсков *C. glaucum* показал характер степенных функций, лежащих в их основе (рис.1 А, Б).



высота раковины моллюска будет в 1.67 раза меньше ее длины.

Взаимосвязь массовых показателей роста и длины створок моллюска *C. glaucum* можно выразить через следующие уравнения регрессии

(рис. 2): $Y_1=0.53*X^{0.95 \pm 0.049}$, $Y_2=0.00058*X^{2.94 \pm 0.04}$; аллометрические коэффициенты: $b_1=0.95$; $b_2=2.94$; $Y_3=0.00034*X^{2.80 \pm 0.07}$ где основные $b_3=2.8$, $b_1=b_3/b_2$

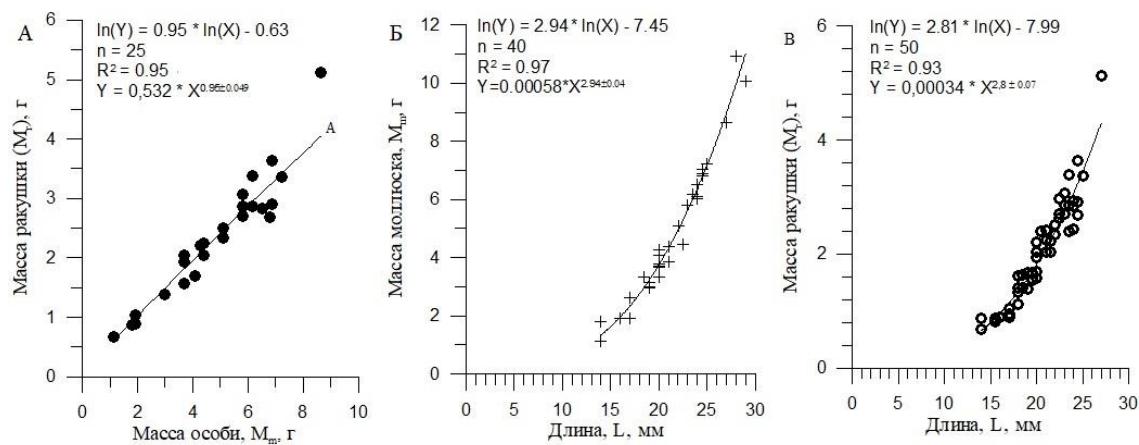


Рис. 2. Степенная зависимость массы особи и ее раковинки (А), длины L от массы моллюска (Б), и массы его раковинки (В) моллюска *C. glaucum*

При изучении продукционных процессов и анализа потоков вещества и энергии в популяциях гидробионтов, а также для ряда практических целей на морских фермах по выращиванию этих моллюсков, значительный интерес представляют данные по изменению удельного веса раковины, мягких тканей и мантийной жидкости у этих моллюсков. Анализ показал, что зависимость массы раковины (M_r) от массы целого моллюска (M_m) описывается степенной функцией (рис. 2, А): $M_r = 0.532 * M_m^{0.95 \pm 0.049}$. Величина 0,95 является показателем слабо отрицательной аллометрии скелета, очень близкой к изометрии (при соответствии $b_1=1$). В целом, масса раковины моллюска составляет около половины его веса.

При увеличении массы и возраста животного аллометрический коэффициент чуть меньше 3-х, т.е. индивидуальная масса моллюсков несколько отстает от скорости роста в длину (рис.2 Б и В). Это можно объяснить тем, что общая масса тела слагается из нескольких параметров – массы раковины, соматической и генеративной ткани, а

также количества мантийной жидкости, которые в свою очередь варьируют в зависимости от ряда экологических факторов: температуры, солености, стадии зрелости гонад, пищевого спектра и др. [5,6]. В связи с этим у многих авторов связь длины с общей массой тела, в зависимости от стадии жизненного цикла, характеризовалась как отрицательной, так и положительной аллометрией [11, 13]. Те же параметры отражаются на накоплении каротиноидов ($C_{\text{кар}}$) у моллюсков. Так у двустворчатого моллюска-фильтратора *Anadara kagoshimensis* созревание гонад значительным образом сказывается на этом показателе [17]. В следствие этого, взаимосвязь между $C_{\text{кар}}$ и массово-размерными характеристиками носит более точную закономерность, если учитывать влияние генеративной ткани [10,17].

При исследовании взаимосвязи длины створок и содержания каротиноидов у *C. glaucum* был также отмечен сильный разброс данных особенно среди моллюсков с ярко выраженным гонадами, находящимися на разной стадии зрелости.

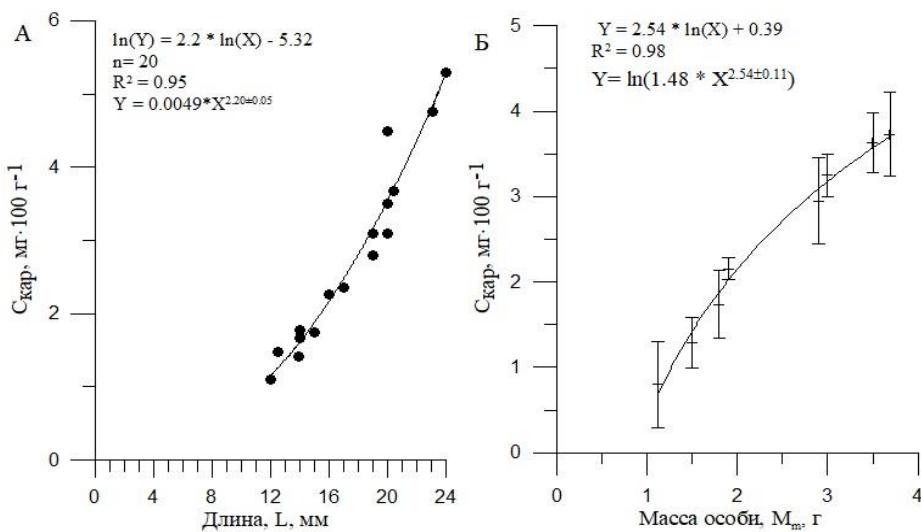


Рис. 3 Взаимосвязь накопления суммарных каротиноидов ($C_{\text{кар}}$) с длиной раковинки и массы моллюска *C. glaucum* до 4 г.

Наиболее четкая закономерность прослеживается у более молодых особей и особей с невыраженной генеративной тканью, что в целом встречалось у моллюсков с длиной раковины до 25 мм и массой до 4 грамм (рис.3).

На рис.3 (А) представлена зависимость $C_{\text{кар}}$ от длины моллюсков в виде степенной функции, где $C_{\text{кар}} = 0.0049 * L^{2.20 \pm 0.05}$. По мере роста раковины до 24 мм, накопление каротиноидов также пропорционально увеличивается. На рис. 3 (Б) зависимость ($C_{\text{кар}}$) от общей массы моллюска до 4 гносит логарифмическую зависимость: $C_{\text{кар}} = \ln(1.48 * M_m^{2.54 \pm 0.11})$. При анализе этих результатов, хорошо заметно, как по мере роста моллюска на определенном этапе происходит замедление накопления $C_{\text{кар}}$, что может быть объяснено увеличением числа особей в выборке, находящихся на 1 или 5 стадии зрелости гонад [18]. В первом случае, организм еще не успел накопить $C_{\text{кар}}$ через пищу, т.к. эта стадия соответствует более холодному времени года и соответствует ограничению в пище, по естественным причинам. Во втором случае, когда моллюски находятся на 5-й стадии зрелости, после нереста, гонады визуально практически не видны, организм истощен затратой энергии на восстановление, что сопровождается снижением общего уровня $C_{\text{кар}}$ в организме.

Выводы из данного исследования и перспективы

Таким образом, в данной работе представлены особенности аллометрического роста и некоторые корреляции массово-размерных характеристик с накоплением суммарных каротиноидов в тканях *C. glaucum*, которые кратко могут быть представлены следующим образом:

1. выявлена слабо положительная аллометрия скорости линейного роста и высоты раковины моллюска *C. glaucum*;
2. показана взаимосвязь длины и массы *C. glaucum*, которая характеризуется слабой отрицательной аллометрией, близкой к изометрии;
3. взаимосвязь суммарных каротиноидов и длины раковины моллюска описывается степенной функцией $C_{\text{кар}} = 0.0049 * L^{2.20 \pm 0.05}$;
4. взаимосвязь суммарных каротиноидов и массы моллюска до 4 г описывается логарифмической функцией $C_{\text{кар}} = \ln(1.48 * M_m^{2.54 \pm 0.11})$.

Подобные работы по аллометрическим параметрам нуждаются в дальнейших исследованиях и дополнениях их различными биохимическими показателями для решения прежде всего спорных вопросов таксономии *Bivalvia*. Перспективой могут быть также применение полученных результатов в прикладном аспекте при обработке и сборе урожая моллюсков, в отросли марикультуры.

Работа выполнена по теме государственного задания ФГБУН ИМБИ РАН "Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим

режимом". Рег. номер НИОКР АААА-А 18-118021490093-4; дата рег. 14.02.2018 г.

1. Андреева К. П. Основы менеджмента. Практическое обозрение терминологии / К. П. Андреева//Менеджмент и Управление. – 2014. – уч.– К-234 с.

Список литературы.

1. <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=138999>
2. Киселёва М.И., Ревков П.К., Копытов Ю. П. Современное состояние и многолетние изменения зообентоса Стрелецкой бухты (район Севастополя) / М.И. Киселёва, П.К. Ревков, Ю. П. Копытов// Гидробиологический журнал. – 1997. – Т. 33, № 1. – С. 3 - 13.
3. Савикин А.И., Набоженко М.В. Распространение двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* (Pioret, 1789) (Bivalvia: Cardidae) в Таганрогском заливе Азовского моря / А.И. Савикин, М.В Набоженко// Вестник Южного Научного Центра РАН. – 2010. – Том 6, № 4. – С. 105–107.
4. Михайлова. Т. В. Структура популяций *Cerastoderma glaucum* в некоторых районах северо-западной части Чёрного моря / Т.В. Михайлова// Экология моря. – 1987. – Т. 25. С 50–53.
5. Андреева С.И. Современные *Cerastoderma* (Bivalvia, Cardiidae) Аральского моря: Систематика, изменчивость, эволюция. / С.И. Андреева// Омск: Изд-во Омского государственного педагогического университета. – 2000. – 240 с.
6. Андреева С.И., Андреев Н.И. Эволюционные преобразования двустворчатых моллюсков Аральского моря в условиях экологического кризиса. / С.И. Андреева, Н.И. Андреев// Омск: Изд-во Омского государственного педагогического университета. – 2003. – 382 с.
7. Pierre-Guy Sauriau, Chang-Keun Kang. Stable isotope evidence of benthic microalgae-based growth and secondary production in the suspension feeder *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) in the Marennes-Oleron Bay / Pierre-Guy Sauriau, Chang-Keun Kang // Hydrobiologia. – 2000. – 440. – P. 317–329.
8. Бородина А.В. Солдатов А.А. Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков // Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии / под ред. Шульмана Г. Е., Солдатова А.А. НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. Севастополь. – 2014. – Гл. 3. – С. 87–168.
9. Бородина А.В., Солдатов А.А. Влияние аноксии на содержание и состав каротиноидов в тканях двустворчатого моллюска- вселенца *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906)/ А.В. Бородина, А.А. Солдатов// Российский журнал биологических инвазий. – 2019. - № 3. – С. 2-12.
10. Бородина А.В. Накопление каротиноидов и аллометрический рост моллюска *Anadara*

- kagoshimensis (Tokunaga, 1906) / А.В. Бородина // Вопросы сохранения биоразнообразия водных объектов: материалы Международной научной конференции, 27 ноября 2015 г., г. Ростов-на-Дону, ФГБНУ «АзНИИРХ». - Изд-во: ФГБНУ «АзНИИРХ». - 2015. - С. 53-57.
11. Алимов А.Ф. Функциональная экология пресноводных двустворчатых моллюсков / А.Ф. Алимов// Л.: Наука. - 1981. - 248 с.
12. Жаворонкова А. М., Золотницкий А. П. Характеристика аллометрического роста двустворчатого моллюска анадары (*Anadara inaequivalvis*) Керченского пролива / А. М. Жаворонкова, А. П. Золотницкий// Экосистемы, их оптимизация и охрана. - 2014. - Вып. 10. - С. 128-133.
13. Заика В.Е. Аллометрия раковины двустворчатых моллюсков. / В.Е. Заика// Мор. экол. журн. - 2004. - 3, №1. - С. 47-50.
14. Рижинашвили А. Л. О спорных вопросах таксономии *Bivalvia* (Mollusca): много видов или мало признаков? / А. Л. Рижинашвили// Известия РАН. Серия биологическая. - 2011. - № 3. - С. 370-377.
15. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов / В.Н. Карнаухов// М.: Наука. - 1988. - 240 с.
16. Klingenberg, C. P. (1996). Multivariate Allometry. In Advances in Morphometrics / ed. L.F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G.J.P. Naylor, and D.E. Slice// New York: Plenum Press. - 1996. - P. 23-49.
17. Borodina A.V. Carotenoids in the Gonads of the Bivalved Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) / A.V. Borodina // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. - 2018. - Vol. 54, iss. 4. - P. 267-272.
18. Михайлова. Т. Б. Особенности размножения *Cerastoderma glaucum* (Mollusca, Bivalvia) в Чёрном море / Т.В. Михайлова// Экология моря. - 1986. - Т.24. - С. 64-68.

Imanbayeva A.A.

*Candidate of biological science,
Mangyshlak experimental botanical garden*

Ishmuratova M.Yu.

*Candidate of biological science, associated professor
Mangyshlak experimental botanical garden*

Duysenova N.T.

*Candidate of biological science,
Mangyshlak experimental botanical garden*

ANALYSIS OF FLORA OF THE HERBS OF MANGYSTAU REGION AND SELECTION OF THE PERSPECTIVE OBJECTS FOR INTROFUCTION

Иманбаева А.А.

*Кандидат биологических наук,
Мангышлакский экспериментальный ботанический сад*

Ишмуратова М.Ю.

*Кандидат биологических наук, ассоциированный профессор
Мангышлакский экспериментальный ботанический сад*

Дүйсенова Н.Т.

*Кандидат биологических наук,
Мангышлакский экспериментальный ботанический сад*

АНАЛИЗ ФЛОРЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ МАНГИСТАУСКОЙ ОБЛАСТИ И ВЫБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ИНТРОДУКЦИИ

Summary. The article presents the results of the study of wild medicinal plants in the territory of Mangystau region. The growth of 163 species of herbs from 112 genera and 43 families has been revealed. The identified objects were ranked by the degree of distribution, use in official and folk medicine, as well as by pharmaceutical-therapeutic action. A list of 36 most promising medicinal species for introduction research has been determined

Аннотация. В статье приведены результаты изучения дикорастущих лекарственных растений на территории Мангистауской области. Выявлено произрастание 163 видов лекарственных растений из 112 родов и 43 семейств. Проведено ранжирование выявленных объектов по степени распространения, использованию в официальной и народной медицине, а также по фармако-терапевтическому действию. Определен перечень из 36 наиболее перспективных лекарственных видов для интродукционного исследования.

Введение. Проблема сохранения биоразнообразия – важный компонент биологической безопасности. В Конвенции о

биоразнообразии (1992) [15] предусматривается решение вопросов сохранения, изучения и охраны биологического разнообразия, как гаранта

устойчивости экосистем. При этом рекомендовано разработать региональные и национальные стратегии охраны растений, которые учитывали бы специфику каждого региона.

Актуальной задачей ботаники является всестороннее изучение отдельных групп и видов полезных растений в целях их хозяйственного использования. Поэтому, для каждого сырьевого растения должна быть получена полная ботаническая ресурсная характеристика, включающая детальное исследование ареалов обитания, биоэкологии, геоботаники, анализ продуктивности, оценка возможности интродукции и массового выращивания, разработка рекомендаций по охране, фитохимический состав [2, 12].

В Мангистауской области виды хозяйственно ценных растений изучены недостаточно [9], поэтому этот вопрос актуален для нашего региона.

Целью настоящего исследования – оценка видового состава лекарственных растений Мангистауской области и выбор объектов, перспективных для дальнейшего интродукционного испытания.

Объекты и методика. Объектами исследования являлись как естественно

произрастающие в природе Мангистауской области. Анализ флоры проводили на основе данных гербарного фонда Мангышлакского экспериментального ботанического сада, полевых выездов и литературных источников [1-6]. Определение видов вели согласно флоры Казахстана, т. 1-9 [13], уточнение латинских названий – по сводке С.К. Черепанова [14].

При анализе выявленных растений анализировали их распространение и возможности применения в официальной и народной медицине [1-8, 10, 11].

Результаты и их обсуждение. На первом этапе проведен анализ произрастания лекарственных растений на территории Мангистауской области и составлен полный список лекарственных видов региона.

Так, выявлено, что на территории Мангистау произрастает 163 лекарственных вида из 112 родов и 43 семейств. Преобладающее число видов отнесены к семействам *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Boraginaceae*, *Euphorbiaceae* и *Ranunculaceae* (табл. 1).

Таблица 1

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ 10 КРУПНЕЙШИХ СЕМЕЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ МАНГИСТАУ

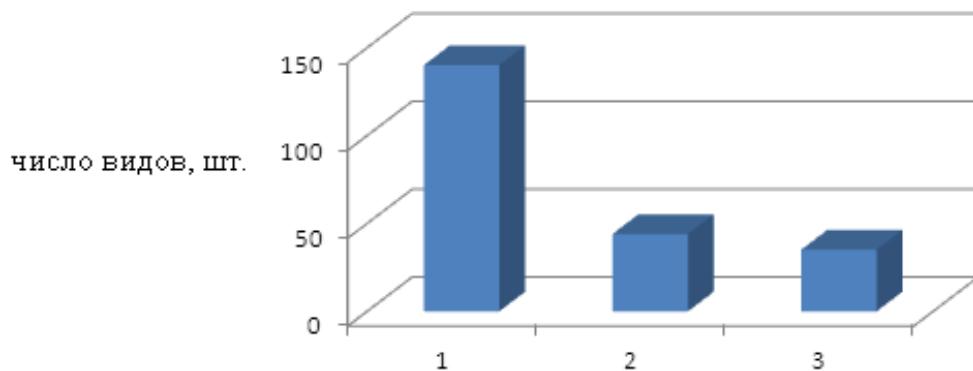
| Семейство | Число родов, шт. | % от общего числа родов | Число видов, шт. | % от общего числа видов |
|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| <i>Asteraceae</i> | 14 | 12,5 | 22 | 13,5 |
| <i>Chenopodiaceae</i> | 12 | 10,7 | 15 | 9,2 |
| <i>Fabaceae</i> | 8 | 7,1 | 14 | 8,6 |
| <i>Brassicaceae</i> | 6 | 5,4 | 9 | 5,5 |
| <i>Lamiaceae</i> | 8 | 7,1 | 8 | 4,9 |
| <i>Apiaceae</i> | 6 | 5,4 | 8 | 4,9 |
| <i>Scrophulariaceae</i> | 3 | 2,7 | 8 | 4,9 |
| <i>Boraginaceae</i> | 6 | 5,4 | 6 | 3,7 |
| <i>Euphorbiaceae</i> | 3 | 2,7 | 6 | 3,7 |
| <i>Ranunculaceae</i> | 4 | 3,6 | 5 | 3,1 |
| Итого: | 70 | 62,6 | 101 | 62,0 |

Виды из этих 10 ведущих семейств составляют 62,0 % от общего числа видов лекарственных растений и 62,6 % от общего числа родов.

Самое большое число видов и родов отмечено сем. *Asteraceae* – 22 вида и 14 родов. Второе место занимает сем. *Chenopodiaceae* – 15 видов из 12 родов. На третьей позиции сем. *Fabaceae* – 14 видов из 8 родов. На четвертом месте находится сем. *Brassicaceae* – 9 видов из 6 родов. В семействах *Lamiaceae*, *Apiaceae* и *Scrophulariaceae* обнаружено по 8 видов из 8, 6 и 3 родов соответственно. Шестое

место занимает сем. *Euphorbiaceae* с 6 видами из 3 родов, седьмое – сем. *Ranunculaceae* с 5 видами из 4 родов.

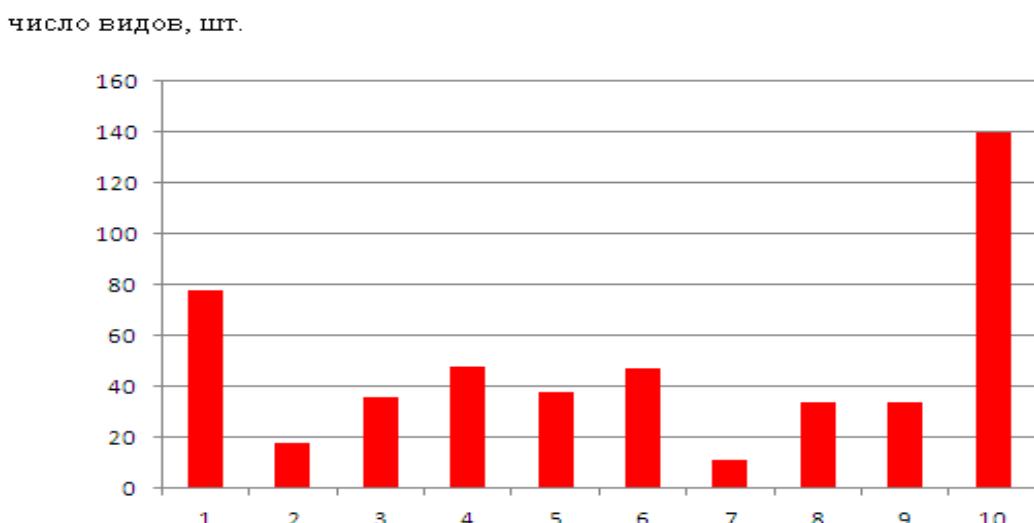
Из 163 выявленных видов лекарственных растений наибольшая часть принадлежит видам, используемым в народной медицине - 140 видов (рис. 1). Несколько меньше число видов, для которых обнаружены какие-либо фармакологические свойства, - 44 вида. Незначительное количество видов (35) используются в официальной медицине.



1 – виды, используемые в народной медицине,
2 – виды с научно-доказанными лечебными свойствами,
3 – фармакопейные виды
Рисунок 1. Ранжирование лекарственных растений
Мангистау по использованию в официальной и народной медицине

Лекарственные растения имеют широкий спектр фармакологической активности. Однако, разные свойства присущи разному количеству

видов. Нами проведен анализ возможности использования лекарственных растений Мангистау для лечения различных заболеваний (рис. 2).



использование лекарственных растений при лечении заболеваний: 1 – желудочно-кишечного тракта, 2 – ротовой полости, 3 – почек и мочевыводящих путей, 4 - дыхательных путей, 5 – жаропонижающее и противовоспалительное, 6 – сердечно-сосудистой системы, 7 – сахарного диабета, 8 – обезболивающее и ранозаживляющее, 9 – органов кожи, 10 – прочих заболеваний

Рисунок 3 – Ранжирование лекарственных растений Мангистау по фармако-терапевтическому действию

Так, для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта можно использовать 78 видов лекарственных растений, как резак обыкновенный, ферула вонючая, спаржа Брестлера, девясил британский, коельпиния и др. Для лечения заболеваний ротовой полости можно применять 18 видов: ферула (шумания) Карелина, цикорий обыкновенный, марь белая, кермек Гмелина, каперцы травянистые и др. Против заболеваний почек и мочевыводящих путей рекомендуется применение 36 видов: ширица запрокинутая,

синеголовник плосколистный, сердечница крупковая, мордовник обыкновенный и прочие.

Для лечения заболеваний дыхательных путей используются 48 видов растений, например, крапива двудомная, дубровник белый, марь душистая и др. В качестве растений, проявляющих противовоспалительное и жаропонижающее действие, используют 38 видов: полынь сантолинная, полынь метельчатая, чернокорень лекарственный и другие. Для лечения сердечно-сосудистой системы рекомендуется применять 47 видов: зизифора тонкая, молочай серповидный,

ирик узколистный, зюзник европейский и др. Глистононным свойством обладают 11 видов: ферула каспийская, полынь Лерховская, полынь лессинговидная. Для лечения гинекологических заболеваний рекомендованы 19 видов: ширица запрокинутая, полынь австрийская, гулявник Лозеля и др. Как противодиабетические добавки можно применять 11 видов: цикорий обыкновенный, солодка голая, солодка шиповатая, солодка Коржинского и другие.

Ранозаживляющими и обезболивающими свойствами обладают 34 вида, среди которых марь белая, эфедра золотистая, эфедра двуколосковая и другие.

Кожные заболевания можно лечить 34 видами: ферула вонючая, горчак ползучий, ежовник безлистный, камфоросма Лессинга и другие. Прочие фармакологические свойства отмечены для 104 видов.

Вида, произрастающие на территории Мангистауской области не являются равнозначными по распространенности, площадях и плотности произрастания, образуемым сырьевым запасам. В связи с этим одни виды могут в значительных объемах браться из природы и использоваться человеком, другие – в ограниченных объем, трети – не подлежат изъятию из природы по каким-либо причинам.

В связи с этим по результатам полевых исследований все выявленные дикорастущие лекарственные растения были разделены на 4 категории по степени распространенности и образуемым сырьевым запасам:

1 Виды, имеющие широкий ареал обитания (запасы сырья свыше 5 тонн), формирующие значительные природные заросли и пригодные для промышленной заготовки сырья. Это: ферула вонючая, полынь Лерховская, п.белоземельная, ежовник безлистный, е.солончаковый, солерос европейский, верблюжья колючка персидская, в.к.обыкновенная, гармала обыкновенная, ревень татарский (всего 10 видов).

2 Виды, имеющие широкий ареал обитания, формирующие незначительные природные заросли и пригодные для заготовки сырья для нужд местной аптечной сети (запасы сырья от 1 до 5 тонн). Это: спаржа Брестлера, ферула Карелина, полынь Лессинговская, п.сантолинная, п.метельчатая, хондрилла ситниковая, бодяк обыкновенный, мордовник обыкновенный, дурнишник обыкновенный, дескурайния Софии, клоповник толстолистный, к.широколистный, к.сорный, сирения сидячеветковая, каперцы травянистые, качим метельчатый и другие. Итого – 50 видов.

3 Виды, имеющие широкий ареал обитания, однако, произрастающие спорадично и не образующие природных зарослей, пригодных для сбора сырья. Среди них: ширица жминовидная, ш.запрокинутая, синеголовник плосколистный, резак обыкновенный, ферула каспийская, скандикс звездчатый, зозима восточная, горчак ползучий, полынь австрийская, полынь Сиверса,

п.джунгарская, сафлор шерстистый, цикорий обыкновенный, девясил британский, коельпиния линейная, латук компасный, мелкоголовка пластинчатая, татарник колючий, триполиум обыкновенный, аргузия сибирская, арнебия простертая, асперugo простертное, бугросоидес полевой, чернокорень лекарственный, риндера четырехцветковая, сердечница крупковая и другие. Итого 83 вида.

4 Виды, имеющие охранный статус, то есть редких, исчезающие, эндемичные виды растений: жимолость татарская, солянка Рихтера, папоротник мужской, лох узколистный, тут белый, мак павлиний, ломонос восточный, репейничек азиатский, шиповник рыхлый, боярышник сомнительный, зизифора тонкая.

Данные виды либо включены в список редких и исчезающих видов, либо ареалы их в последнее время сильно сокращаются, а сами таксоны необходимо сохранять в природе и культуре.

Исходя из анализ видового состава и хозяйственных свойств перспективными для интродукции определены 36 видов, среди которых - жимолость татарская, репейничек азиатский, шиповник рыхлый, боярышник сомнительный, зизифора тонкая, ферула вонючая, мята длиннолистная, котовник кошачий, пижма сантолинная, дубровник белый, чернокорень лекарственный, цикорий обыкновенный, солодка шероховатая, полынь эстрагон, каперцы колючие, сирения сидячеветковая и другие.

Заключение. Таким образом, на территории Мангистауской области выявлено произрастание 163 видов лекарственных растений из 112 родов и 43 семейств. Проведено ранжирование выявленных объектов по степени распространения, использованию в официальной и народной медицине, а также по фармако-терапевтическому действию. Определен перечень из 36 наиболее перспективных лекарственных видов для интродукционного исследования.

Исследования выполнены в рамках ПЦФ «Разработка научно-практических и компьютерно-информационных основ создания ландшафтно-коллекционных и садово-парковых насаждений в пустынной зоне Мангистау для сохранения и рационального использования биоразнообразия растений».

Список литературы:

1. Абышева Л.Н., Беленовская Л.М., Бобылева Н.С. Дикорастущие полезные растения России. СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. 663 с.
2. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений Казахстана. – Алматы: Гылым, 1994. 168 с.
3. Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С. Дикорастущие полезные растения. Москва: Изд-во МГУ, 1987. 160 с.
4. Дауранов И.Г. Лекарственные растения и витамины. Алма-Ата: Знание, 1991. 56 с.

5. Журба О.В., Дмитриев М.Я. Лекарственные, ядовитые и вредные растения. Москва: Колос, 2008. 512 с.
6. Мухитдинов Н.М., Паршина Г.Н. Лекарственные растения. Алматы: Қазақ университеті, 2002. 313 с.
7. Павлов Н.В. Растительное сырье Казахстана. Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1947. 552 с.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. ТТ. 1-9. Санкт-Петербург, 1982-1995.
9. Сафронова И.Н. Пустыни Мангышлака (Очерк растительности) // Труды Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Вып. 18. Санкт-Петербург, 1996. 212 с.
10. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. Москва: Мед.информ. агентство, 2000. 953 с.
11. Ушбаев К.У., Курамысова И.И., Аксенова В.Ф. Целебные травы. Алма-Ата: Кайнар, 1975. 200 с.
12. Фармацевтический рынок Казахстана: история, основные направления развития и текущее состояние. Алматы: AEQUITAS, 2015. 36 с.
13. Флора Казахстана. ТТ. 1-9. Алма-Ата: Изд-во Наука, 1956-1966.
14. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Санкт-Петербург, 1995. 990 с.
15. Convention on Biological Diversity and the Nagoya Protocol: Intellectual Property Implications. United Nations: UNCTAD, 2014. 215 pages.

ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ

Duda Y.V.

candidate of veterinary sciences,
associate professor of the department of parasitology
and veterinary-sanitary examination,
Dnipro State Agrarian and Economic University

Shevchik R.S.

candidate of veterinary sciences,
associate professor of the department of parasitology
and veterinary-sanitary examination,
Dnipro State Agrarian and Economic University

Kuneva L.V.

senior lecturer of the department of normal
and pathological anatomy of farm animals,
Dnipro State Agrarian and Economic University

THE EFFECT OF *TREPONEMA CUNICULI* ON THE PROTEIN METABOLISM INDICATORS AND CELLULAR IMMUNITY STATE OF RABBITS

Дуда Юлія Вікторівна

кандидат ветеринарний наук,

доцент кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи,
Дніпровський державний аграрно-економічний університет

Шевчик Римма Святославівна

кандидат ветеринарний наук,

доцент кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної експертизи,
Дніпровський державний аграрно-економічний університет

Кунєва Лариса Володимиривна

старший викладач кафедри

нормальної і патологічної анатомії сільськогосподарських тварин

ВПЛИВ *TREPONEMA CUNICULI* НА ПОКАЗНИКИ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІНУ ТА СТАН КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ КРОЛІВ

Summary. The spirochetosis of rabbits is widespread and affects animals in size of from 3-5% to 30%, and sometimes even 90% in individual rabbit breeding farms.

The experimental part of the work was performed in LLC "Albest" of the Dnepropetrovsk region during 2016-2019. The study was conducted on male rabbits of California breed of 3-4 months of age, selected on the basis of analogs. In order to determine the level of infection of rabbits by *Treponema cuniculi*, their excrement was investigated by the MacMaster method and divided into two groups: healthy animals (control group) and sick animals (research group). The count of T-and B-lymphocytes was determined by the method of spontaneous rosette-formation with sheep erythrocytes.

We found that during spirochaetosis of rabbits it was: low total protein content of 14,76% ($p<0.001$), albumin – by 8.15% ($p<0.01$), creatinine – by 13,08% ($p<0,01$); increasing of the concentration of α_1 - globulins by 4.31% ($p<0.01$), γ -globulins – by 6.14% ($p<0.05$), urea – by 1.86 times ($p<0,01$), uric acid – by 1.56 times ($p<0.05$). We revealed characteristic changes in the protein metabolism of rabbits associated with the negative effect of the causative agent and its toxins on organism of the animal.

Spirochetosis in male rabbits caused significant changes in the count of T- and B-lymphocytes. It was established that an increase in the number of lymphocytes was observed in the blood of rabbits with spirochetosis, mainly because of a possible increase in B-lymphocytes by 30.57% ($p<0.001$). In the blood of animals of the experimental groups, there was an increase in the number of T-lymphocytes by 35.42% ($p<0.01$) due to T-helpers, which increased by 1.82 times, which indicates the activation of the immune system of rabbits. In effected animals showed a significant decrease in O-lymphocytes to 8.07% ($p<0.001$) and the percentage of T-suppressors – up to 15.00% ($p<0.01$), compared with healthy ones. This redistribution in the population of T-cells led to an increasing of the immunoregulatory index in rabbits of the experimental group by 4 times than in healthy ones. Sick animals have T-active blood lymphocytes more 23.85% than in the control one.

In general, the results of studies showed that effect of the pathogen *Treponema cuniculi* in the blood of rabbits led to an increase in T-and B-lymphocytes, T-helper cells and T-active, against the background of a decrease in B-lymphocytes and T-suppressors. Such redistribution of lymphocyte populations suggests an immune response to parasitism of spirochaeta.

Анотація. Спірохетоз кролів поширений повсюдно та вражає в окремих кролівничих господарствах від 3-5% до 30%, а іноді навіть 90% тварин.

Експериментальна частина роботи виконана в ТОВ «Олбест» Дніпропетровської області впродовж 2016–2019 рр. Дослідження проведено на кролях-самцях 3-4 місячного віку, каліфорнійської породи відібраних за принципом аналогів. З метою визначення рівня ураженості *Treponema cuniculi* кролів, їх екскременти досліджували за методом Мак-Мастера та поділили на дві групи: здорові тварини (контрольна група) та хворі тварини (дослідна група). Кількість Т- і В-лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барабана.

Встановлено, що збудник спірохетозу кролів викликає зміни в протеїновому обміні речовин. В крові хворих на спірохетоз кролів у порівнянні зі здоровими виявили: знижений вміст загального протеїну на 14,76% ($p<0,001$), альбуміну – на 8,15% ($p<0,01$), креатиніну – на 13,08% ($p<0,01$); і навпаки високу концентрацію α_1 - глобулінів – на 4,31% ($p<0,01$), γ -глобулінів – 6,14% ($p<0,05$), сечовини – в 1,86 рази ($p<0,01$) та сечової кислоти – 1,56 рази ($p<0,05$). Зміни в протеїновому обміні у хворих кролів пов’язані з негативним впливом збудника і його токсинів на організм тварин.

Спірохетоз у кролів-самців спричинив істотні зміни кількості популяції Т- і В-лімфоцитів. Встановлено, що у крові кролів, хворих на трепонемоз, відмічалось кількісне збільшення лімфоцитів, в основному за рахунок вірогідного збільшення В-лімфоцитів до 30,57% ($p<0,001$). У крові тварин дослідних груп відмічалась кількісне збільшення Т-лімфоцитів на 35,42% ($p<0,01$) за рахунок Т-хелперів, які зросли в 1,82 рази, що вказує на активізацію імунної системи організму кролів. Крім цього, у заражених тварин спостерігалась достовірне зменшення О-лімфоцитів до 8,07% ($p<0,001$) та відсотка Т-супресорів – до 15,00% ($p<0,01$), порівняно зі здоровими. Такий перерозподіл у популяції Т-клітин зумовив зростання імунорегуляторного індексу у кролів дослідної групи в 4 рази, ніж у здорових. У хворих тварин загальна кількість Т-активних лімфоцитів крові була на 23,85% більшою, ніж у контроля.

В цілому отримані результати дослідження показали, що за впливу збудника *Treponema cuniculi* у крові кролів призвело до збільшення Т- і В-лімфоцитів, Т-хелперів і Т-активних, на фоні зниження О-лімфоцитів і Т-супресорів. Такий перерозподіл популяції лімфоцитів, свідчать про імунну відповідь за паразитування спірохет.

Key words: spirochaetosis, *Treponema cuniculi*, protein metabolism, globulin fractions, T-, B- and O-lymphocytes, T-helpers, T-suppressors, T-active.

Ключові слова: спірохетоз, *Treponema cuniculi*, протеїновий обмін, глобулінові фракції, Т-, В- і О-лімфоцити, Т-хелпери, Т-супресори, Т-активні.

Постановка проблеми. Фактор, що стимує інтенсивний розвиток кролівництва в Україні, це низький рівень виходу кроленят і їх збереженість. Схильність до захворювань, особливо маточного поголів’я, зумовлена в першу чергу зниженою резистентністю організму кролів, яка залежить від кількості окролів на рік, умов утримання, годівлі та складу раціону. Спірохетоз реєструється у ряді кролівницьких господарств європейських держав, Америки та Азії, де спостерігалися епізоотії з великим відсотком захворюваності (до 90%) [1]. До завезення кролів з закордону ця хвороба на території України не реєструвалась, спалах спірохетозу у кролегосподарствах країни, за нашими даними, відбувся впродовж 2016-2018 років [2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Вперше спірохетоз у кролів був описаний в 1912 році. Збудник – спірохета *Treponema cuniculi* (*Spirochaeta cuniculi*), клас *Spirochaetae*. В різних статтях це захворювання представляється під різними назвами, як: «сифіліс кролів», «спонтанний спірохетоз кролів», «заразна статева хвороба кролів». Збудник зовні дуже схожий на *Treponema pallida* (збудника сифілісу людини), однак вона патогенна тільки для кролів і зайців. *Spirochaeta cuniculi* це спіралеподібний паразит завдовжки від 7 до 30 мкм [3]. Спірохета найчастіше паразитує на слизовій оболонці статевих органів та дистальній частині прямої кишки гризунів, призводить до

запалення, яке триває декілька місяців. Хворі тварини в цей час є не придатними для відтворення, що призводить до економічних збитків у господарствах [4].

Хвороба зазвичай починається з легкої гіперемії і набрякlosti препуція або великих соромітних губ, рідше слизової оболонки кінцевої частини прямої кишки. З уражених органів виділяється серозно-слизовий ексудат, що містить спірохети. Надалі на запалених ділянках утворюються дрібні вузлики величиною від макового до просяного зерна, які в подальшому перетворюються в легко кровоточать виразки. Зливаючись, вони утворюють великі виразки, покриті бурими корками. При подальшому розвитку хвороби у кролів ураження часто поширяються на прилеглі ділянки шкіри, запалені ділянки набувають червонувато-синюватого забарвлення, стають набряклими і утворюються великі товсті кірки.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Проблема спірохетозу вивчалась, як закордонними вченими [5-8], так і вітчизняними [2], але питання стану клітинного імунітету та деяких показників протеїнового обміну не вирішено. Отже, дослідження як клітинного імунітету так і деяких показників протеїнового обміну кролів за впливу *Treponema cuniculi* є актуальним.

У зв'язку з цим **метою** наших досліджень було вивчити вплив збудника спірохетозу на показники протеїнового обміну та стан клітинного імунітету кролів.

Матеріали та методи. Робота виконувалась впродовж 2016–2019 рр. Експериментальна частина роботи виконана в ТОВ «Олбест» Дніпропетровської області та ТОВ «Кроликоф Плюс» Черкаської області, в яких використовують кліткове утримання тварин з додержанням всіх зоогігієчних вимог і збалансованим раціоном годівлі. Лабораторні дослідження проводили в лабораторії кафедри паразитології та ветсанекспертизи Дніпровського державного агроекономічного університету. Для дослідів були відібрані аналогові групи кролів-самців 3-4 місячного віку каліфорнійської породи. З метою визначення рівня ураженості *Treponema cuniculi* кролів, їх екскременти досліджували за методом Мак-Мастера та поділили на дві групи: здорові тварини (контрольна група) та хворі тварини (дослідна група).

Кров у кролів відбирали вранці, у стані спокою, з яремної вени у пробірки з антикоагулянтом. Місце проколу обробляли спиртом. Біохімічні дослідження крові проводили з використанням наборів реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна, м. Дніпро). Спектрофотометричним методом у крові тварин визначали: вміст загального протеїну біуретовим методом, альбумінів – з індикатором бромкрезоловим зеленим, глобулінів (розрахунковий показник) дорівнює різниці загального протеїну та альбумінів, глобулінові фракції – методом осадження, протеїновий коефіцієнт (розрахунковий показник) обчислювали, як співвідношення альбумінів до глобулінів; сечовину – діацетилмонооксимним методом, сечову кислоту – фосфорновольфрамовим методом, креатинін – методом Яффе-Поппера [9].

Загальну кількість Т-лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана [10, 11]. Число Т-клітин з переважно супресорною активністю (ТФЧ) – шляхом віднімання числа теофілінрезистентних Т-клітин (ТФР) від загального числа Т-лімфоцитів. Імунорегуляторний індекс (IPI) розраховували як співвідношення теофілінрезистентних Т-клітин до теофілінчутливих. Визначення кількості В-лімфоцитів проводили методом комплементарного розеткоутворення [9, 11]. Число О-клітин підраховували відніманням від 100%-вої суми загальної кількості Т-лімфоцитів та В-лімфоцитів. На початку досліду готували індикаторну (маркерну) систему для реакцій Е-РУК та ЕАС-РУК. Для цього використовували еритроцити барана. Еритроцитарну масу взятої крові (2 мл) тричі відмивали 0,9%-вим розчином NaCl і центрифугували в режимі – 1500 об/хв. впродовж 15 хвилин. Для індикаторної системи Е-РУК готували 1%-ву суспензію еритроцитів барана (до

0,1 мл еритроцитів додавали до 10 мл трис-буферу), а для ЕАС-РУК 2,5%-ву еритроцитарну суспензію (до 0,25 мл еритроцитів додавали до 10 мл трис-буферу), яку обробляли гемолітичною сироваткою, яка була попередньо розведена (0,02 мл гемолітичної сироватки у титрі 1:1200 додаючи до 8 мл трис-буферу), у співвідношенні 2:2 і в подальшому інкубували 30 хвилин у термостаті при 37°C. Після інкубації гемсистему двічі відмивали трис-буфером. Потім додавали до суспензії еритроцитів комплемент морської свинки після його попереднього розрідження 2 мл фізіологічного розчину та 20-хвилинної експозиційної витримки при кімнатній температурі; в подальшому інкубували 30 хвилин у термостаті при 37°C. Після інкубації гемсистему тричі відмивали трис-буфером і доводили ним до 10 мл.

Проби крові (по 4,5 мл) відбирали від дослідних тварин і стабілізували 5%-вим розчином трилону Б на фіброзчині у розрахунку 1:9. Виділення фракції лімфоцитів проводили шляхом центрифугування крові, попередньо розведеної 1:1 і нашарованої на градієнт щільноті верографіну (1,077). Центрифугування проводили впродовж 30 хвилин в режимі 1500 об/хв. Після цього проходило розшарування крові з утворенням червоного осаду (еритроцитів та гранулоцитів), білого кільця на межі середовищ (суспензії лімфоцитів) та надосадової рідини (верографіну). Розшаровану суспензію лімфоцитів відбирали пастерівською піпеткою і ресуспендували в 5 мл трис-буферу, після чого двічі відмивали у центрифужному режимі 1500 об/хв впродовж 10 хвилин. Після оцінки життезадатності відмітих лімфоцитів (фарбування 0,1%-вим еозином) їх стандартизували до концентрації 2×10^6 в 1 мл.

Реакцію спонтанного розеткоутворення (Е-акт-РУК) ставили шляхом змішування 0,1 мл лімфоцитарної маси з 0,1 мл 1%-вою суспензією еритроцитів з наступним центрифугуванням (5 хвилин при 1000 об/хв). Реакцію Е-РУК проводили шляхом 10 хвилинної витримки (при 37°C) 0,1 мл лімфоцитарної маси в суміші з 0,1 мл 1%-вою суспензією еритроцитів та 0,1 мл трис-буферу, яку після центрифугування (5 хвилин при 1000 об/хв) інкубували у холодильнику при 4°C впродовж 1 години. Реакція ЕАС-РУК проходила в умовах 30 хвилинної інкубації в термостаті (при 37°C), з наступним 5 хвилинним центрифугуванням (1000 об/хв). Реакція Е-РУК з теофіліном проходила в умовах ступінчастої інкубації в термостаті — 30 хвилин при 37°C, з наступним центрифугуванням (5 хвилин при 1000 об/хв) і додаванням 0,1 мл 1%-вої суспензії еритроцитів (10 хвилин при 37°C), а потім після центрифугування (5 хвилин при 1000 об/хв) інкубували у холодильнику при 4°C 1 годину.

Розетки, які утворилися в процесі реакцій, фіксували 0,06%-вим глютаровим альдегідом (20-30 хвилин), а потім на предметних скельцях готували мазки. Готові мікропрепарати фіксували етанолом (10 хвилин) та фарбували за Романовським-Гімзою (5-7 хвилин).

Результати реакцій оцінювали шляхом підрахунку під мікроскопом 200 лімфоцитів. За розетку рахували лімфоцит, що приєднав 3 і більше еритроцитів.

При роботі з тваринами дотримувалися вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.1986р.). Статистичну обробку експериментальних результатів для визначення біометричних показників (середні значення та їх похибки, порівняння середніх значень за критерієм Стьюдента) здійснювали з використанням програми Microsoft Excel-07.

Результати роботи. Дослідженнями встановлено, що інтенсивність інвазії у кролів, хворих на спірохетоз, склала $1960,00 \pm 247,81$ збудників в 1 г фекалій.

У крові хворих тварин вміст загального протеїну, який представлений в таблиці 1, достовірно знизився до $60,18 \pm 3,58$ ($p < 0,001$). Альбумінова фракція знизилась на $8,15\%$ ($p < 0,01$) в порівнянні зі здоровими тваринами. Це викликало зниження альбумін-глобулинового співвідношення ($p < 0,01$), яке у хворих тварин склало $1,15 \pm 0,14$ в порівнянні зі здоровими – $1,68 \pm 0,17$. Низький вміст альбуміну на тлі зростання глобуліну в крові хворих кролів може вказувати на порушення білокутворюючої функції печінки через пошкодження її паренхіми. Гепатоцити печінки ймовірно пошкоджуються токсинами, що виділяються в результаті життєдіяльності *Treponema cuniculi*, і продуктами запалення, які утворюються як в статевих органах, так і дистальному кінці прямої кишки.

Таблиця 1

**ПОКАЗНИКИ ПРОТЕЇНОВОГО ОБМІНУ КРОВІ КРОЛІВ ЗА ВПЛИВУ ЗБУДНИКА
TREPONEMA CUNICULI (M ± M)**
**PROTEIN METABOLISM PARAMETERS OF RABBITS UNDER THE INFLUENCE OF
TREPONEMA CUNICULI (M ± M)**

| Показники Parameters | | Групи тварин Animal Groups | |
|--|--------------|---|---|
| | | Здорові (контроль) Healthy (control), n=37 | Хворі (дослід) Sick (experiment), n=35 |
| Загальний білок, г/л Total protein, g / l | | $70,60 \pm 1,48$ | $60,18 \pm 3,58^{***}$ |
| Альбуміни Albumins | г/л g / l | $36,87 \pm 1,18$ | $32,15 \pm 0,80^{**}$ |
| | % | $64,16 \pm 1,70$ | $55,02 \pm 2,30^*$ |
| Глобуліни Globulins | г/л g / l | $21,90 \pm 1,65$ | $28,03 \pm 2,88$ |
| | % | $35,84 \pm 1,70$ | $44,98 \pm 2,30^*$ |
| Глобулінові фракції Globulin fractions | α_1 | г/л g / l | $1,35 \pm 0,15$ |
| | | % | $2,58 \pm 0,27$ |
| | α_2 | г/л g / l | $2,66 \pm 0,43$ |
| | | % | $4,85 \pm 0,66$ |
| | β | г/л g / l | $2,53 \pm 0,35$ |
| | | % | $4,54 \pm 0,49$ |
| | γ | г/л g / l | $10,90 \pm 1,28$ |
| | | % | $19,20 \pm 1,42$ |
| Протеїновий коефіцієнт Protein ratio | | $1,68 \pm 0,17$ | $1,15 \pm 0,14^{**}$ |
| Сечовина, ммоль/л Urea, mmol / l | | $3,78 \pm 0,66$ | $7,03 \pm 0,61^{**}$ |
| Сечова кислота, мкмоль/л Uric acid, μ mol / l | | $81,40 \pm 8,75$ | $127,20 \pm 14,02^*$ |
| Креатинін, мкмоль/л Creatinine, μ mol / L | | $156,30 \pm 5,12$ | $135,86 \pm 4,56^{**}$ |

Примітка: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$ - порівняно із здоровими тваринами

Note: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$ - compared to healthy animals

Між глобуліновими фракціями встановлено достовірне збільшення концентрації α_1 - і γ -

глобулінів відповідно на $4,31\%$ ($p < 0,01$) і $6,14\%$ ($p < 0,05$) у хворих кролів, в той час як рівень α_2 - і β -

глобулінів у здорових – істотно не змінився. Підвищення а₁-глобулінів ймовірно пов'язано з гострим запальним процесом в статевих шляхах і патологією печінки. Оскільки до складу γ-глобулінів переважно входять імуноглобуліни, підвищення їх вмісту в сироватці крові можна пояснити стимулюванням синтезу факторів неспецифічної резистентності і біосинтезу протеїна в периферичних тканинах організму.

Водночас у кролів, хворих на спірохетоз, відбулися зміни і інших показників протеїнового обміну: сечова кислота, сечовина та креатинін. Відомо, що на вміст в крові сечовини впливають такі фактори як працездатність печінки і нирок, а також рівень вмісту в організмі амінокислот, що беруть участь в протеїновому обміні. Так, вміст сечовини та сечової кислоти у дослідній групі вірогідно буввищим в 1,86 рази ($p<0,01$) та 1,56 рази ($p<0,05$) відповідно, порівняно з контролем, що може вказувати, як на порушення зі сторони

нирок, так і на загальну інтоксикацію організму, які відбуваються під дією механічного, токсичного впливу *Treponema cuniculi*. Одним із біохімічних показників крові, який характеризує функціональний стан нирок є і креатинін. У хворих тварин ця речовина вірогідно нижча на 13,08% ($p<0,01$), ніж у здорових, що вказує на тривалий вплив токсичних речовин на організм.

Таким чином, дослідження показали, що в крові тварин, спонтанно заражених кролів відбулися значні зміни в протеїнограмі, що свідчать, на нашу думку, про запальні процеси в печінці та нирках за впливу збудника *Treponema cuniculi*.

Показники клітинного імунітету кролів під впливом збудника *Treponema cuniculi* змінюються. Зокрема, виявлені істотні зміни кількості популяцій Т- і В-лімфоцитів, як у відсотковому, так і кількісному значенні (таблиця 2).

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ КРОЛІВ ЗА ВПЛИВУ ЗБУДНИКА *TREPONEMA CUNICULI* (M±M) CELLULAR IMMUNITY PARAMETERS OF RABBITS UNDER THE INFLUENCE OF *TREPONEMA CUNICULI* (M±M)

| Показники Parameters | | Групи тварин Animal Groups | |
|------------------------------|------------|---|---|
| | | Здорові (контроль) Healthy (control), n=37 | Хворі (дослід) Sick (experiment), n=35 |
| Т-лімфоцити T-lymphocytes | T/л T/l | 1,66±0,16 | 2,36±0,48** |
| | % | 58,00±1,98 | 61,36±1,40 |
| В-лімфоцити B-lymphocytes | T/л T/l | 0,46±0,05 | 1,21±0,11*** |
| | % | 15,52±0,32 | 30,57±0,92*** |
| Т-хелпери T-helperies | T/л T/l | 0,93±0,09 | 1,77±0,09*** |
| | % | 32,19±1,04 | 47,18±1,81*** |
| Т-супресори T-suppressors | T/л T/l | 0,74±0,08 | 0,63±0,07 |
| | % | 25,82±1,80 | 15,00±1,27*** |
| IPI | | 1,44±0,12 | 5,77±1,52** |
| Т-активні T-active | T/л T/l | 1,08±0,14 | 1,62±0,11* |
| | % | 41,44±2,62 | 42,18±1,53 |
| О-лімфоцити O-lymphocytes | T/л T/l | 0,85±0,14 | 0,28±0,02*** |
| | % | 26,48±2,06 | 8,07±1,12*** |

Примітка: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ порівняно із здоровими тваринами

Note: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ compared to healthy animals.

Аналізуючи одержані дані, встановлено, що у крові кролів, хворих на спірохетоз, відмічалось кількісне збільшення лімфоцитів, в основному за рахунок вірогідного збільшення В-лімфоцитів до 30,57% ($p<0,001$). Як відомо, на поверхні ці клітини несуть імуноглобуліни, що функціонують як рецептори до антигенів. У відповідь на взаємодію з антигеном В-лімфоцити відповідають розподілом і диференціацією в плазматичні клітини, що виробляють антитіла, за допомогою яких забезпечується гуморальний імунітет [12, 13]. За даними багатьох вчених збільшення В-лімфоцитів відзначається при аутоімунних захворюваннях,

хронічних захворюваннях печінки, цирозі, муковісцедоз, бронхіальний астмі, паразитарних і грибкових інфекціях [14-16]. Зокрема, у хворих тварин спостерігалась вірогідне зменшення О-лімфоцитів до 8,07% ($p<0,001$). Останні, як відомо, є однією з найбільш реактивних клітинних систем організму та за необхідністю можуть перетворюватися на Т- і В-лімфоцити, не проходячи диференціацію в імунних органах. Кількісна і відносна зміна цих клітин, на нашу думку, відбулася за впливу *Treponema cuniculi* на організм кролів.

У крові тварин дослідних груп відмічалась вірогідне кількісне збільшення Т-лімфоцитів на 35,42% ($p<0,01$) за рахунок Т-хелперів, які зросли в 1,82 рази, що вказує активацію імунної системи організму кролів.

Відсоток Т-супресорів у крові тварин, хворих на спірохетоз, достовірно знизився до 15,00% ($p<0,01$) порівняно із здоровими. Такий перерозподіл у популяції Т-клітин зумовив зростання імунорегуляторного індексу (IPI) у кролів дослідної групи в 4 рази, ніж у здорових.

Зокрема, у заражених тварин загальна кількість Т-активних лімфоцитів крові була на 23,85% більшою, ніж у контролю.

В цілому отримані результати досліджень показали, що за впливу збудника *Treponema cuniculi* у крові кролів призвело до збільшення Т- і В-лімфоцитів, Т-хелперів і Т-активних, на фоні зниження О-лімфоцитів і Т-супресорів. Такий перерозподіл популяції лімфоцитів, свідчать про імунну відповідь на запальні процеси на слизовій оболонці зовнішніх статевих органів, в області анального отвору і на прилеглих ділянках шкіри, що виникли за впливу паразитування спірохет.

Висновки та пропозиції. Нами встановлено, що у хворих на спірохетоз кролів: низький вміст загального протеїну ($p<0,001$) за рахунок зниження вмісту альбуміну на 8,15% ($p<0,01$); збільшення концентрації α_1 - і γ -глобулінів відповідно на 4,31% ($p<0,01$) і 6,14% ($p<0,05$); високий вміст сечовини та сечової кислоти в 1,86 рази ($p<0,01$) та 1,56 рази ($p<0,05$) відповідно, на фоні низького креатиніну на 13,08% ($p<0,01$). Виявлені характерні зміни в протеїновому обміні хворих кролів пов'язані з негативним впливом збудника і його токсинів на клітини печінки та функцію нирок.

Спірохетоз у кролів-самців спричинив істотні зміни кількості популяцій Т- і В-лімфоцитів. Встановлено, що у крові кролів, хворих на спірохетоз, відмічалось кількісне збільшення лімфоцитів, в основному за рахунок вірогідного збільшення В-лімфоцитів до 30,57% ($p<0,001$). У крові тварин дослідних груп відмічалась вірогідне кількісне збільшення Т-лімфоцитів на 35,42% ($p<0,01$) за рахунок Т-хелперів, які зросли в 1,82 рази, що вказує активацію імунної системи організму кролів. Зокрема, у хворих тварин спостерігалась вірогідне зменшення О-лімфоцитів до 8,07% ($p<0,001$) та відсотка Т-супресорів – до 15,00% ($p<0,01$), порівняно зі здоровими. Такий перерозподіл у популяції Т-клітин зумовив зростання імунорегуляторного індексу (IPI) у кролів дослідної групи в 4 рази, ніж у здорових. У заражених тварин загальна кількість Т-активних лімфоцитів крові була на 23,85% більшою, ніж у контролю.

В цілому отримані результати досліджень показали, що за впливу збудника *Treponema cuniculi* у крові кролів призвело до збільшення Т- і В-лімфоцитів, Т-хелперів і Т-активних, на фоні зниження О-лімфоцитів і Т-супресорів. Такий перерозподіл популяції лімфоцитів, свідчать про імунну відповідь на запальні процеси на слизовій оболонці зовнішніх статевих органів, в області анального отвору і на прилеглих ділянках шкіри,

що виникли за впливу паразитування спірохет.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні показників гуморальної ланки імунітету за впливу збудника *Treponema cuniculi*.

Список літератури:

1. Noguchi H. A note on the venereal spirochetosis of rabbits// J. Amer. med. Ass. – 1921.– 77. – P. 2052.
2. Duda Y.V., Kuneva L.V., Shevchik R.S., Koreyba L. V. Effect of *Treponema cuniculi* on protein metabolism of rabbits. 1st International gap agriculture and livestock congress, abstract. – 2018. – P. 439.
3. Інфекційні та інвазійні хвороби кролів / Л.Є. Корніenko, О.Б. Домбровський, С.І. Пономар, А.А. Антіпов. – Біла Церква, 2003. – С.209 – 213.
4. Герасимчик В.А. Инфекционные и незаразные болезни пушных зверей и кроликов : учеб.-метод. пособие / В.А. Герасимчик. – Вітебск: ВГАВМ, 2011. – С.142 – 145.
5. Nordhoff M.L., Wieler L.H. Incidence and significance of treponemes in animals//Berl Munch Tierarztl Wochenschr. – 2005. – Jan. – Feb;118(1 – 2). – pp. 24 – 36.
6. Saito K., Tagawa M., Hasegawa A. RPR Test for Serological Survey of Rabbit Syphilis in Companion Rabbits//J. Vet. Med. Sci. – 2003. – 65(7). – pp. 797 – 799.
7. Saito K., Tagawa M., Mimura M. et al. Clinical Features and Rapid Plasma Reagins Antibody Titers in Spontaneous and Experimental Rabbit Syphilis//J. Vet. Med. Sci. – 2005. – 67(7). – P. 739.
8. Saunders R.A., Davies R.R. Notes on Rabbit Internal Medicine//Blackwell Publishing Ltd. – Oxford, UK. – 2005. – pp. 1–68.
9. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : Довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін. – Львів: Сполом. – 2012. – 764 с.
10. Современные методы оценки иммунного статуса / С.Г. Ситайло, Т.И. Ельчанинова, Ю.И. Василенко и др. – Кривой Рог. – 2000. – 40 с.
11. Чередеев А.Н. Количественная и функциональная оценка Т- и В-систем иммунитета человека//Общие вопросы патологии. – М.: ВИНИТИ. – 1976. – Т.4. – С. 126–160.
12. Казмірчук В.Є., Ковальчук Л.В. Клінічна імунологія та алергологія. – Вінниця: Нова книга. – 2006. – 526 с.
13. Yuseff M.I., Pierobon P., Reversat A., Lennon-Dumenil A.M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity//Nat Rev Immunol. – 2013. – 13(7). – pp. 475 – 478.
14. Kearney J.F. Innate-like B cells//Springer Semin Immunopathol. – 2005. – 26(4). – pp. 377–383.
15. Cantaert T., Kolln J., Timmer T., et al. B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis//J Immunol. – 2008. – 181(1). – pp. 785–794.
16. Kendall P.L., Yu G., Woodward E.J., et al. Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes//J Immunol. – 2007. – 178(9). – pp. 5643–5651.

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

UDC 616.379-008.64-06:577.125:57.04

Bykhovets Mykhailo

PhD-student

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education.

Kyiv, Ukraine.

INFORMATION VALUE OF BIOCHEMICAL MARKERS FOR EVALUATION OF LIPID DYSMETABOLISM SECONDARY TO HYPERGLYCAEMIA IN PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Introduction. Diabetic retinopathy (DR) – the most common complication of long-term and uncontrolled type 2 diabetes mellitus (T2DM) – causes visual impairment and blindness all over the world. Hyperlipidaemia secondary to hyperglycaemia due to the endothelial dysfunction may contribute to the development of DR, macular oedema and impairment of blood-retinal barrier resulting in exudation of serum lipids and lipoproteins. Evaluation of the information value of biochemical markers determines priority trends of pharmacological correction and parameters for monitoring of the efficacy of therapeutic regimens.

Objective of this article was to study the information value of biochemical markers for evaluation of lipid dysmetabolism secondary to hyperglycaemia in patients with diabetic retinopathy.

Materials and methods. The study included 119 subjects maximally matched by the age and gender, allocated to three groups: 76 patients with the diagnosed long-term T2DM complicated with DR, 23 subjects without T2DM but with established metabolic changes by the lipid and carbohydrate metabolism parameters, 20 subjects without dysmetabolism – control group (CG). All biochemical tests were performed by the certified laboratory using the standard procedures. Fatty acids (FA) profile in red blood cell membranes was measured by the liquid chromatography method. Statistical analysis of data was performed using IBM SPSS Statistics 23 software package and MedStat software application.

Results. In patients with DR and T2DM, total cholesterol, Low-density lipoproteins (LDL), High-density lipoproteins (HDL) and triglycerides did not statistically differ compared with the healthy subjects. The main difference in the lipid metabolism of patients with complicated long-term T2DM and healthy subjects was a significant difference in redistribution of FA content in red blood cell membranes in the form of increased “saturation”. The content of saturated FAs (SAFAs) in patients with DR was higher compared with CG, namely: palmitic (C:16) 1.5-fold, myristic (C:14), pentadecanoic (C:15) and margaric (C:17) 2-fold ($P<0.05$). The content of saturated stearic (C:18) FA was not significantly changed. Change in the content of unsaturated FAs (USFAs) was multidirectional: content of linoleic (C18:2) and arachidonic (C20:4) reduced 1.5-1.7-fold, respectively. The content of linolenic (C18:3) increased 2-fold, and as for oleic FA (C18:1), its content was not changed significantly. Inversely, presence of the metabolic shifts in the form of increased total cholesterol and LDL secondary to hyperglycaemia, but without T2DM and its complications, is characterized by a slight increase in USFAs and polyunsaturated FA level in the composition of cellular membranes. This probably is a protective mechanism against worsening and complication of metabolic disorders, since FAs are strong natural inducers of unaffected β -cells of the pancreas preventing development of insulin resistance.

Conclusion. Study of the fluctuations of FA levels in the body of patients play a key role in the development of insulin resistance, T2DM and its microvascular complications, such as DR, making them an advantageous therapeutic approach.

Keywords: *diabetic retinopathy, type 2 diabetes mellitus, endogenous regulation of homeostasis, red blood cell membranes.*

According to the World Health Organization, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a reason of about 90 % of all cases of diabetes mellitus, and it is amongst 10 leading causes of death all over the world. The report of the International Diabetes Federation (IDF) predicts pronounced increase in the cases of diabetes, and it is expected that 629 million of adults in total will suffer from diabetes until 2045 [1]. Diabetic retinopathy (DR) – the most common complication of long-term and uncontrolled type 2 diabetes mellitus (T2DM) – causes visual impairment and blindness all over the world. [2, 3].

Dysfunction of vascular endothelium is considered as an important damaging factor in

pathogenesis of DR and other vascular complications developed secondary to hyperglycaemia. Endothelial dysfunction is well-known in patient with hypercholesterolemia, and lipid peroxidation in the vascular wall results in a local production of reactive radical species that mediate recruiting of macrophages, cellular activation and proliferation, as well as chemical modification of vascular proteins due to improved end products of lipoxidation. Therefore, hyperlipidaemia due to endothelial dysfunction may contribute to the development of DR, macular oedema and impaired blood-retinal barrier resulting in exudation of serum lipids and lipoproteins [4, 5]. At the same time, contradictory reports on the effect of lipid profile on

retinopathy and maculopathy are available in the literature.

The study [6] has found a significant correlation between HbA1c and total cholesterol level, however, no association was reported between serum lipids and DR. The lack of association between the lipid profile and DR severity in this study complies with previous findings of multi-ethnic study in atherosclerosis that do not find relationship between DR and serum lipids, course of diabetes, obesity, and lifestyle [5]. Alternately, Rema et al. in Chennai Urban Rural Epidemiology Study, have shown that mean cholesterol, triglyceride and LDL levels were higher in patients with DR versus those who did not suffer from DR. However, significant correlation was found only with triglyceride content [7].

Koehler et al. have studied features of fatty acid profile of red blood cell membrane in patients with different degree of retinal lesion. The authors have shown that red blood cells of patients suffering from diabetes mellitus with or without DR demonstrate pronounced reduction of docosahexaenoic acid and arachidonic acid levels [8].

Currently, it was proved that increased plasma content of free fatty acids plays a key role in the development of T2DM inducing insulin resistance, therefore, it is reasonable to establish the most informative biochemical markers that reflect lipid

dysmetabolism and highlight priority trends of pharmacological correction and parameters for monitoring of the efficacy of therapeutic regimens.

Objective of this article was to study the information value of biochemical markers for evaluation of lipid dysmetabolism secondary to hyperglycaemia in patients with diabetic retinopathy.

Materials and methods. The study included 119 subjects maximally matched by the age and gender (Table 1). Out of them, 76 patients were allocated to the group with the diagnosed long-term T2DM ($Me=16.4$ years, $QI-QIII$ 9-20 years, Min-Max 5-36 years) who had different degree of retinal lesion in the form of DR according to ophthalmological examinations. We have included them as "DR+T2DM". Another 43 subjects came for preventive check-up to the Clinical Diagnostics Laboratory at O. O. Bogomolets National Medical University, they have no established dysmetabolism and complaints. Out of them, 23 subjects were diagnosed with metabolic changes by the parameters of lipid and carbohydrate metabolism, and this group was defined as "MC". Subjects, who had no increased glucose, glycosylated haemoglobin and cholesterol level were included to the control group (CG) ($n = 20$). Characteristics of the comparison groups is provided in Table 1.

Table 1

CHARACTERISTICS OF THE COMPARISON GROUPS BY AGE AND GENDER

| Parameters | Control group $n=23$ | Metabolic changes group $n=20$ | DR+ T2DM $n=76$ | Significance of differences |
|---|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| Age, years $Me; [QI-QIII]$ (Maximum-Minimum) | 57 [51-63] (22-79) | 57 [50-65] (22-78) | 63 [57.5-68.5] (44-84) | $P_{c1-c2}>0.05$ $P_{c1-DM}=0.03^*$ $P_{c2-DM}=0.03^*$ |
| Gender, females, % Proportion in the group | 65% 15(23) | 70% 14(20) | 55% 42(76) | χ^2 $P=0.34$ |

Note: Determination of the statistical significance of differences was performed by Kruskal-Wallis test, and the parameter "gender" was compared in the contingency table " $k*m$ " using χ^2 test.

All biochemical tests were performed by the certified Clinical Diagnostics Laboratory at O. O. Bogomolets National Medical University using the standard procedures. Measurements were performed on semi-automated biochemical analyser BS-3000M, Sinnova, (China), using biochemical test kits Diagnosicum Zrt, (Hungary). Glycosilated haemoglobin (HbA1) concentration was measured by ion exchange temperature-independent chromatography-spectrophotometry using a set of reagents and microcolumns Bio Systems (Spain). Investigations of FA composition were performed by gas chromatography method at the Experimental Study Laboratory of O. O. Bogomolets National Medical University Scientific and Research Institute of Experimental and Clinical Medicine. Nine the most informative FAs were identified in FA profile of the lipids of blood cells: where myristic C14:0,

pentadecanoic C15:0, palmitic C16:0 margaric C17:0, stearic C18:0 form total of saturated fatty acids (SAFAs), and oleic C18:1, linoleic C18:2, linolenic C18:3 and arachidonic C20:4 forms a group of unsaturated fatty acids (USFAs). Linoleic C18:2, linolenic C18:3, arachidonic C20:4 FAs form a total amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and they are regarded as essential. Statistical analysis of data was performed using IBM SPSS Statistics 23 software package and MedStat software application. Check of the distribution of quantitative parameters throughout sample data for compliance with Gauss law was performed using Shapiro-Wilk one-sample test. The majority of parameters did not reflect normal distribution, therefore, non-parametric tests were used, and to compare data in a contingency table " $k*m$ ", χ^2 test was used. Data in the groups were compared using one-way ANOVA on ranks by Kruskal-Wallis test,

Dunn and Mann-Whitney test considering Bonferroni adjustment was used for pairwise comparison. For data description in the groups, median (Me) and 25th (P₂₅) and 75th (P₇₅) percentile values were provided that have been specified in tables QI–QIII. For median interval estimation, a 95 % confidence interval was calculated. Graphs were provided as columns with specification of (95% CI). Differences in the groups were specified as P-value with a statement of the level of significance. Data were considered to be different at P <0.05.

Results and discussion. Analysis of comparison groups by the age, BMI and gender showed homogeneity in the groups with slight predominance of females. Gender differences in body weight and BMI were also non-significant (Fig. , Table 2). First of all, we've performed analysis of the most wide-spread "screening" biochemical parameters used in clinical settings (Table 2). A special interest was called upon comparison of CG and MC groups that we have defined as patients without T2DM. CG included subjects who despite of the age and high body weight (BMI = 29.41)

have no deviations from the reference values by the main parameters of carbohydrate and lipid metabolism. MC group included subjects who were not followed-up in dispensary settings, and did not consider themselves ill. However, interview of each such subject has found that they have some increased values of biochemical parameters during regular preventive measurements. As it shown in the Table, glycosilated haemoglobin levels in MC group were 2.4-fold higher (P<0.05) compared with CG, however blood glucose level was only slightly higher. In general, this is explained by a transient reduction in glucose level during blood sampling due to the fact that a subject familiar with fluctuations of the parameter may ensure sugar deprivation in advance. Such a situation only underlines the information value of HbA1C that currently is a golden standard for determination of carbohydrate dysmetabolism. At the same time, while MC group have no complaints typical for pronounced metabolic disorders in T2DM, we have analysed them as a "conditionally healthy".

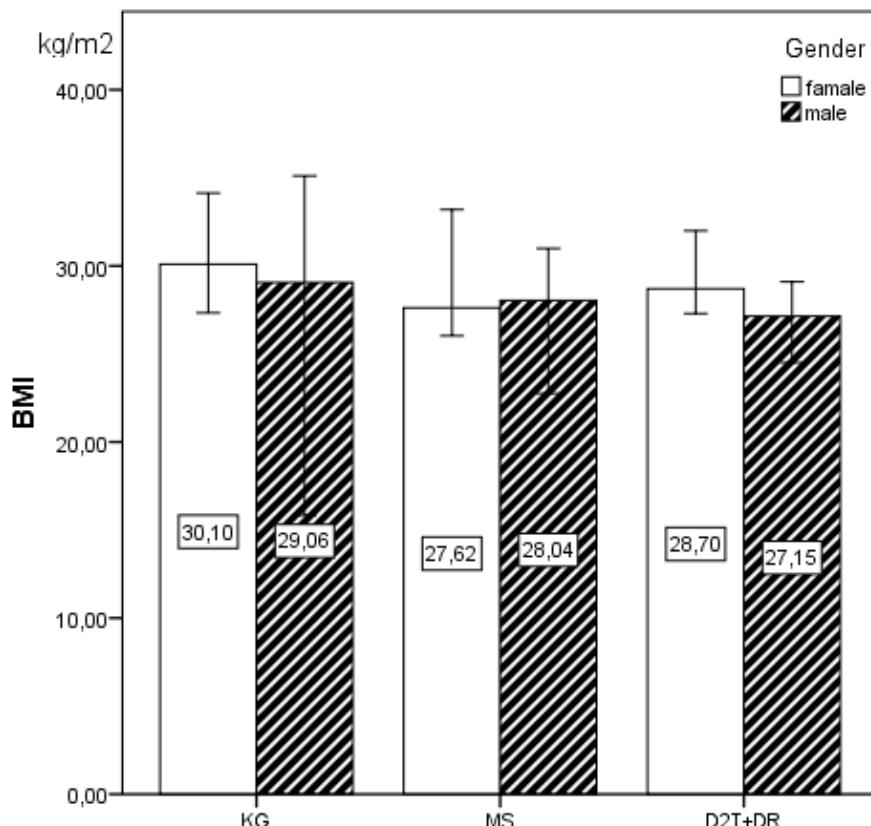


Fig. 1. Distribution of BMI in CG, MC group and patients with T2DM+DR depending on the gender.
Light columns stand for females, dark – for males.

**PARAMETERS OF THE GROUPS OF INTEREST AND PATIENTS WITH T2DM
(N, ME; [QI÷QIII])**

| Parameters | Control group n= 23 | Metabolic changes group n= 20 | DR+ T2DM n= 76 | Significance of differences |
|--------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------|---|
| BMI, kg/m ² | 29.41 [27.5-33.8] | 27.69 [26.4-30.72] | 28.05 [25.45-32] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} >0.05 P _{CG-DM} >0.05 |
| HbA1C (%) | 5.1 [4.9-5.5] | 12.3 [7.0-13.8] | 7.7 [6.6-9.5] | P _{CG-MC} <0.05* P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| Blood glucose, mmol/L | 5.0 [4.4-5.4] | 5.9 [5.0-7.6] | 10.0 [7.5-12.0] | P _{CG-MC} <0.05* P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| Cholesterol, mmol/L | 4.2 [3.82-4.66] | 5.4 [4.68-5.96] | 4.5 [3.72-5.30] | P _{CG-MC} <0.05* P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} >0.05 |
| HDL, mmol/L | 0.82 [0.60-1.34] | 1.16 [0.79-1.26] | 1.15 [0.87-1.40] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} >0.05 P _{CG-DM} >0.05 |
| LDL, mmol/L | 2.63 [2.17-3.11] | 3.38 [2.96-14.05] | 2.6 [1.77-3.41] | P _{CG-MC} <0.05* P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} >0.05 |
| Triglycerides, mmol/L | 1.4 [1.04-1.75] | 1.35 [1.12-1.85] | 1.55 [1.18-2.01] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} >0.05 P _{CG-DM} >0.05 |

Note: Determination of the statistical significance of differences was performed using Kruskal-Wallis test.

T2DM group included patients on dispensary follow-up due to diabetes mellitus, mean disease duration is 16 to 20 years, they obligatory take medications (tablet formulations or injections), and part of them administer statins. All patients with T2DM have vascular complication in the form of DR, which stage was determined by ETDRS. Thus, 30 patients suffered from initial moderate to severe non-proliferative DR, 34 – initial moderate and high risk proliferative DR, and 37 patients – progressive proliferative DR. Therefore, T2DM group was characterized with a long-term carbohydrate and lipid dysmetabolism.

Interesting fact was found that CG and MC group significantly differed by total cholesterol and LDL level, and patients with T2DM+DR did not differ from CG by these parameters. HDL and triglyceride values have no significant difference in the groups at all. We believe that the lack of difference in biochemical parameters of the CG and T2DM+DR reflects low information value of the specified parameters for characterization of long-term dysmetabolism.

Thus, to study features of FA metabolism in the body, we have used analysis of fatty acid composition in red blood cell membrane that was performed on a gas-liquid chromatograph. Blood is a transportation

medium for lipoproteins, therefore measurement of plasma FAs reflects total amount of chylomicrons circulating in different directions – to the cell and in the opposite direction, thus, measurement of plasma FA level does not provide complete information on the use of fatty acids by the cells. Red blood cell membrane is regarded as the most informative model for analysis of FA profile in the patient's body [9,10], and it reflects general features of FA consumption in the cells, their building into the cellular membrane, and how it takes place in all the cells of the body.

Analysis of FA content showed a significant difference between groups of conditionally healthy subjects and patients with T2DM. At the same time, no significant differences in terms of any measurement were reported in CG and MC group (Table 3).

Only relative content of two FAs – saturate stearic C18:0, and unsaturated oleic C18:1 did not differ in the groups. Other measurements had a clear tendency as follows: saturated FAs in patients with T2DM+DR were virtually 1.5-2-fold higher, and unsaturated linoleic C18:2 and arachidonic C20:4 1.5-1.7-fold lower, respectively. Unsaturated linolenic C18:3 FA, which content in patients with T2DM+DR also increased, was an exception.

Table 3

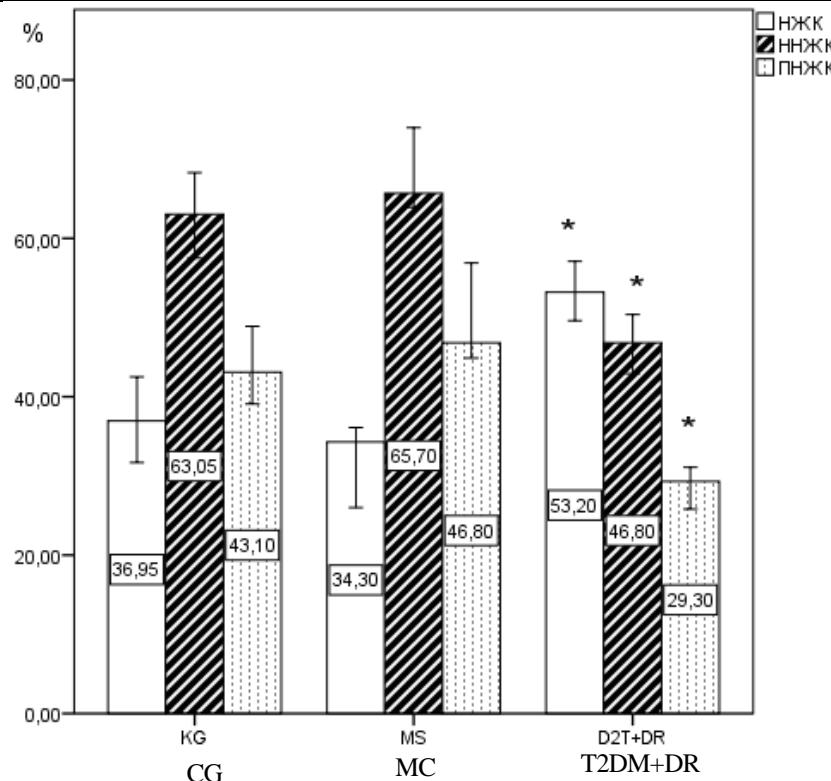
**CONTENT OF THE MAIN FAS (%), MEASURED IN RED BLOOD CELL MEMBRANES OF
THE STUDY SUBJECTS AND PATIENTS WITH T2DM+DR (N, ME; [QI÷QIII])**

| Fatty acid | Control group n= 23 | Metabolic changes group n= 20 | DR+ T2DM n= 76 | Significance of differences |
|------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------|--|
| C14:0 Myristic | 0.35 [0.3-0.6] | 0.4 [0.3-0.5] | 0.7 [0.4-1.2] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| C15:0 Pentadecanoic | 0.35 [0.3-0.6] | 0.4 [0.3-0.5] | 0.6 [0.4-1.0] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| C16:0 Palmitic | 24.7 [16.4-30.5] | 21.5 [13.2-23.4] | 39.1 [26.9-44.1] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| C17:0 Margaric | 0.35 [0.3-0.6] | 0.4 [0.3-0.5] | 0.6 [0.4-1.0] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| C18:0 Stearic | 12.3 [10.8-12.7] | 11.5 [10.3-12.4] | 11.3 [9.7-13.9] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05 P _{CG-DM} <0.05 |
| C18:1 Oleic | 18.6 [17.1-20.4] | 18.0 [16.4-19.3] | 17.8 [16.2-20.3] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05 P _{CG-DM} <0.05 |
| C18:2 Linoleic | 37.1 [31.0-41.6] | 40.1 [36.0-46.2] | 23.3 [17.0-32.4] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| C18:3 Linolenic | 0.35 [0.3-0.6] | 0.4 [0.3-0.5] | 0.6 [0.4-1.0] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |
| C20:4 Arachidonic | 6.6 [3.2-9.3] | 6.1 [4.4-8.4] | 3.8 [1.8-8.7] | P _{CG-MC} >0.05 P _{MC-DM} <0.05* P _{CG-DM} <0.05* |

Note: Determination of the statistical significance of differences was performed using Kruskal-Wallis test.

Conventionally, total SUFAs, PUFAs and USFAs in the observational groups was compared (Fig. 2). By the parameters in the CG, content of USFAs prevails in the membranes under normal conditions, and this is 1.7-fold higher than SUFAs content (37 %). PUFAs constitute virtually half (43.1 %) of membrane FAs. Presence of metabolic shifts by the biochemical parameters in the form of increased blood glucose and total cholesterol in MC group is accompanied by slight non-significant increase in USFAs and PUFAs and

decrease in SUFAs in MC group compared to the CG. In case of long-term complicated T2DM, redistribution of FAs completely differs: the main content of membrane FAs is presented with SUFAs (53.2 %) that is 1.4-fold higher compared with the normal value (P<0.05). There is a significant (P<0.05) 1.3-fold decrease to 46.8 % in the proportion of USFAs compared to the CG. Proportion of PUFAs decreases to 1/3 of membrane FAs (29.3 %) that is 1.5-fold (P<0.05) lower than in the CG.



*Fig. 2. Content of total amount of different FA types (%), measured in red blood cell membranes of the study groups. Light columns stand for SUFAs, striped – USFAs, columns with dots – PUFAs, where * - difference with the CG ($P < 0.05$).*

Therefore, metabolic disorders accompanied by shifts in the biochemical parameters of carbohydrate and lipid metabolism, but not transformed in the diabetes, are characterized with slight fluctuations in fatty acid profile of membrane in the form of increase in USFAs and PUFAs. In other words, tendency of changes has a reversal form than at the background of T2DM, where lipid dysmetabolism is characterized by the significant redistribution of FAs in cellular membranes. This may be a significant reason for changes in functional ability of cellular membrane of both red blood cell (in the form of its reduced flexibility and loss of deformation properties that prevents tissue oxygenation in capillaries and worsens hypoxia) and other cells, since it contributes to the reduction of intercellular interaction, possibility to exocytosis, ligand acceptance, receptor interaction, etc. [11,12].

For historical reasons, concepts of T2DM pathogenesis run on an axis of “glucose-insulin”, and diabetes is first of all a disorder associated with impaired glucose metabolism. Certainly, this concept has been confirmed by a great deal of data that chronic hyperglycaemia induces diabetic condition, the main threat of which involves many microvascular complications [13].

Boden et al. have studied causes of diabetes and made a conclusion why many people with obesity resistant to insulin will never suffer from diabetes. In people with normal pancreatic β -cells, FAs are strong inducers of insulin secretion, and particularly this is the compensatory mechanism that prevents development of insulin resistance [13]. It was experimentally shown

that continuous (2-4 days) raises of plasma FAs initially reduced and then potentiated glucose-induced secretion of insulin in healthy volunteers. Furthermore, in patients with obesity with and without diabetes, when chronically increased plasma FA levels were suddenly reduced, insulin secretion reduced by 30-50 % [14], highlighting that increased plasma FAs maintained 30-50 % of basal insulin secretion.

However, if FA plasma level increased for more than several hours, FA-induced insulin resistance develops that has a favourable action on accumulation of carbohydrates for use by vital tissues such as central nervous system. This is a very reasonable mechanism for sustainable survival and functioning of the brain during starvation or in the late pregnancy, when insulin resistance in mother accumulates glucose for growing foetus, however, FA-induced insulin resistance becomes counterproductive in other cases [13].

Since FA may induce insulin resistance both in liver and muscles, it may be expected that in all people with excessive body weight or obesity that may have increased plasma FA levels, glucose levels may be also increased. However, that is not the case, since only a half of people with excessive body weight have abnormal glucose levels. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) has shown that only 23 % of people with excessive body weight or obesity ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) had impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance, and 23 % suffered from diabetes [15].

Since long-term exposure to increased FA levels plays a key role in the development of insulin resistance

and T2DM, then the use of FA-lowering drugs is a consistent decision. However, their benefit is limited, since initial reduction in plasma FA levels after, for example, administration of nicotinic acid, is steadily accompanied by a dramatic FA peak [13] that increases insulin resistance, at least temporarily. Therefore, studies of the mechanism of effect of increased FA levels that result in insulin resistance, as well as their critical and maximally permissible levels that are protective and ensure compensatory mechanism of stimulation of pancreatic β -cells secondary to metabolic disorders are actively ongoing.

Conclusion:

1. Patients with DR and T2DM complicated with DR, total cholesterol, LDL, HDL and triglyceride levels have no statistically significant difference compared with healthy subjects.

2. The main difference in the lipid metabolism of patients with complicated long-term T2DM and healthy subjects was a significant difference in redistribution of FA content in red blood cell membranes in the form of increased "saturation". The content of saturated Fas in patients with DR was higher than in the CG: namely: palmitic (C:16) 1.5-fold, myristic (C:14), pentadecanoic (C:15) and margaric (C:17) 2-fold ($P<0.05$). The content of saturated stearic (C:18) FA was not significantly changed.

3. Change in the content of unsaturated FAs was multidirectional: content of linoleic (C18:2) and arachidonic (C20:4) reduced 1.5-1.7-fold, respectively. The content of linolenic (C18:3) increased 2-fold, and as for oleic FA (C18:1), its content was not changed significantly.

4. Inversely, presence of the metabolic shifts in the form of increased total cholesterol and LDL secondary to hyperglycaemia, but without T2DM and its complications, is characterized by a slight increase in USFAs and PUFAs level in the composition of cellular membranes. This probably is a protective mechanism against worsening and complication of metabolic disorders, since FAs are strong natural inducers of unaffected β -cells of the pancreas preventing development of insulin resistance.

5. Study of the fluctuations of FA levels in the body of patients play a key role in the development of insulin resistance, T2DM and its microvascular complications, making them an advantageous therapeutic approach

References

1. International diabetes federation annual report 2015. https://www.oedg.at/pdf/1606_IDF_Atlas_2015_UK.pdf
2. Balashevich L.I., Izmaylov A.S.

Diabeticheskaya oftal'mopatiya. SPb: Chelovek; 2012. 396 s. [in Russia]

3. Pasechnikova N.V. Diabeticheskaya makulopatiya. Sovremennyye aspekty patogeneza, kliniki, diagnostiki, lecheniya. Kiyev: iz-vo OOO «Karbon LTD». 2010. 154 s [in Russia]

4. Chernobryvtsev O.P. The endothelial dysfunction factors in diabetes mellitus 2 type. Journal of Education, Health and Sport formerly of Health Sciences. 2019;9(1):525-533.

5. Benarous R, Sasongko MB, Qureshi S, et al. Differential association of serum lipids with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Sep 27;52(10):7464-9. doi: 10.1167/iovs.11-7598.

6. Cetin E. N., Bulgu Y., Ozdemir S., et al. Association of serum lipid levels with diabetic retinopathy. Int J Ophthalmol. 2013; 6(3): 346–349.

7. Rema M, Srivastava BK, Anitha B, et al. Association of serum lipids with diabetic retinopathy in urban South Indians--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES) Eye Study-2. Diabet Med. 2006 Sep;23(9):1029-36.

8. Koehler P. Erythrocyte Phospholipid and Polyunsaturated Fatty Acid Composition in Diabetic Retinopathy/ P. Koehler, S.Saab, O. Berdeaux //2014 journal.pone 0106912

9. Petrenko O. V., Natrus L. V., Tavartkiladze K. Osoblyvosti vmistu zhyrnykh kyslot v klitynah krovi u khvorykh na diabetichnu retynopatiiu. Arkhiv oftalmolohii Ukrayni. – 2017. – T. 5, № 2

10. Weijers Rob N.M. Lipid Composition of Cell Membranes and Its Relevance in Type 2 Diabetes Mellitus. Curr Diabetes Rev. 2012 Sep; 8(5): 390–400.

11. Shin S, Ku Y, Babu N, Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. Indian J Exp Biol. 2007 Jan;45(1):121-8.

12. Hussein J. S. Cell membrane fatty acids and health / J. S. Hussein // Int. J. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 5, suppl. 3. – P. 38–46.

13. Boden G, Chen X and Iqbal N. Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects. Diabetes 1998 Oct; 47(10): 1609-1612.<https://doi.org/10.2337/diabetes.47.10.1609>

14. Boden G, Laakso M. Lipids and Glucose in Type 2 Diabetes. What is the cause and effect? Diabetes Care 2004 Sep; 27(9): 2253-2259. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.9.2253>

15. Benjamin SM, Valdez R, Geiss LS, Rolka DB, Narayan KM: Estimated number of adults with prediabetes in the US in 2000: opportunities for prevention. Diabetes Care 26:645–649, 2003

Fishchenko Volodymyr Olexandrovych

Doctor of Medical Sciences Professor,

Head of the Department of Traumatology and Orthopedics,

Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University

Vinnytsia, Ukraine

Mammadov Lachin Ali oglu

postgraduate student

of the Department of Traumatology and Orthopedics,

Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University

Vinnytsia, Ukraine

Khaled Jamal Saleh Obeidat

postgraduate student

of the Department of Traumatology and Orthopedics,

Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University

Vinnytsia, Ukraine

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE REPARATIVE CHONDROGENESIS STAGES UNDER THE INFLUENCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN A MODEL OF ACUTE DAMAGE TO CARTILAGE TISSUE

Фищенко Владимир Александрович

доктор медицинских наук, профессор,

заведующий кафедры травматологии и ортопедии,

Винницкого национального медицинского университета

имени Н. И. Пирогова

Винница, Украина

Маммадов Лачин Али оглы

аспирант кафедры травматологии и ортопедии,

Винницкого национального медицинского университета

имени Н. И. Пирогова

Винница, Украина

Обейдат Халед Джамал Салех

аспирант кафедры травматологии и ортопедии,

Винницкого национального медицинского университета

имени Н. И. Пирогова

Винница, Украина

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭТАПОВ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Summary. In the presented study was analyzed changes of the morphometric parameters of reparative chondrogenesis under the influence of mesenchymal stem cells in experimental model of acute damage of cartilage tissue. The experiment was performed on 64 linear rats, which under combined anesthesia a defect of metaepiphyseal cartilage of the femur was performed. Among the operated rats, 2 groups were formed –for rats of experimental group mesenchymal stem cells was injected at the time when the defect was applied and the rats of the control group were not chondrogenically stimulated. Animals were withdrawn from the study on days 7, 14, 21 and 28. During the study in the experimental group rats was found a significant increase in the specific gravity of chondrocytes, cartilage matrix and a significant decrease in the specific gravity of fibrous tissue. There was also a positive trend toward an increase in the thickness of the zones of indifferent, proliferating, and definitive cartilage in the experimental group of animals. Thus, a significant improvement in the morphometric parameters of reparative chondrogenesis under the influence of mesenchymal stem cells has been proved.

Аннотация. В представленном исследовании проанализировано изменения морфометрических показателей reparативного хондрогенеза под влиянием мезенхимальных стволовых клеток в экспериментальной модели острого повреждения хрящевой ткани. Эксперимент выполнен в условиях вивария на 64 линейных крысах, которым под комбинированным наркозом выполняли дефект метаэпифизарной хрящевой ткани бедренной кости. Среди прооперированных было сформировано 2 группы – крысам экспериментально группы в момент нанесения дефекта локально вводили мезенхимальные стволовые клетки, крысам контрольной группы хондрогенной стимуляции не производили. Животных выводили из исследования на 7, 14, 21 и 28 сутки. На протяжении исследования у крыс экспериментальной группе установлено достоверное увеличение показателей удельного веса хондроцитов, хрящевого матрикса и достоверного снижения показателей удельного веса фиброзной ткани.

Также зафиксировано положительную тенденцию увеличения толщины зон индифферентного, пролиферирующего и дефинитивного хряща в экспериментальной группе животных. Таким образом, доказано достоверное улучшение морфометрических показателей reparативного хондрогенеза под влиянием мезенхимальных стволовых клеток.

Key words: mesenchymal stem cells, reparative chondrogenesis, morphometric parameters, acute damage of cartilage tissue, cartilage thickness, cartilage restoration.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, reparативный хондрогенез, морфометрические показатели, острое повреждение хрящевой ткани, толщина хряща, восстановления хряща.

Постановка проблемы. Приходится согласиться с тем, что имеющиеся экспериментальные и клинические подходы к решению проблемы биологического восстановления повреждений суставного хряща далеки от совершенства. Известны способы полнослойной пластики дефектов, пересадки хрящевых или костно-хрящевых ауто- или аллотрансплантатов, аутогенной надкостницы или надхрящницы в сочетании с хирургической коррекцией биомеханической оси конечности, которые используются в клинической практике с различной степенью эффективности [4, 5, 6, 8]. Регенерат, образующийся в результате применения этих способов, обычно представлен грубоволокнистой соединительной тканью, волокнистым хрящом. В ряде исследовательских работ продемонстрировано прогрессирующие дегенеративные изменения регенерата в отдаленные сроки после пластики и достоверно худшие биомеханические свойства новообразованной ткани сравнительно с показателями интактного суставного хряща [4, 10]. Стремление воссоздать не только первоначальную анатомическую форму, но и внутреннюю структуру поврежденной суставной поверхности выводит проблему использования клеточных технологий в ряд актуальных и приоритетных, требующих дальнейшего изучения.

Анализ последних исследований и публикаций. Известно, что повреждение структуры суставного хряща, которое может быть обусловлено различными причинами, такими как травма, воспаление, онкология, старение, аутоиммунные заболевания приводят к серьезным функциональным нарушениям и снижению жизнедеятельности человека. Хрящевая ткань в отличие, например, от костной, имеет низкий потенциал для восстановления, поэтому даже незначительные повреждения могут привести к ее полной дегенерации. Попытки восстановить поврежденную часть хряща предпринимали давно и были сведены, прежде всего, к использованию синтетических материалов в качестве трансплантатов [7, 10]. Однако, применение синтетических протезов ассоциировано с наличием иммунологического барьера, дефицита пластичности материала и ухудшением качества жизни пациентов, даже после проведенного лечения. Современные подходы к восстановлению хрящевой ткани основаны на методах клеточной инженерии. Наиболее приоритетным направлением в травматологии и ортопедии является

использование мультипотентные мезенхимальные стволовых клеток при повреждении суставного хряща, острых и дегенеративных повреждений сухожилья, а также в лечении расстройств reparативного хондрогенеза [1, 2]. Согласно данным современных клинико-экспериментальных исследований по изучению стволовых клеток доказано, что клетки, полученные из жировой ткани, наиболее безопасны, легкодоступны и обладают высоким регенеративным потенциалом [1]. Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки играют ключевую роль в индукции процессов регенерации хрящевой ткани через секрецию биоактивных молекул. Эти клетки способны подавлять иммунные и воспалительные реакции, выделяют большое количество биологически активных веществ, ускоряющих протекание метаболизма, активизируют работу имеющихся высокоспециализированных клеток, обладают способностью к пролиферации и дифференциации в другие типы клеток.

Таким образом, применение клеточных технологий является актуальным и перспективным направлением в лечении повреждений хрящевой ткани и нуждается в дальнейшем изучении.

Выделение непрещенных ранее частей общей проблемы. Доказана способность MMCK к хондрогенной дифференциации, путем экспрессии коллагена II типа и кислых мукополисахаридов, типичных для гиалинового хряща. Использование MMCK в тканевой инженерии для лечения хрящевых дефектов суставов на ранних стадиях остеоартроза представлено в многих клинических исследованиях. Однако вопрос применения MMCK при остром повреждении хрящевой ткани – внутрисуставном переломе кости с повреждением хряща остается неизученным.

Цель исследования – проанализировать изменения морфометрических показателей reparативного хондрогенеза под влиянием мезенхимальных стволовых клеток в экспериментальной модели острого повреждения хрящевой ткани.

Изложение основного материала. Для реализации поставленной цели произведено экспериментальное исследование в условиях вивария Винницкого национального медицинского университета имени Н. И. Пирогова на 64 линейных крысах-самцах весом $300,0 \pm 35,6$ г. Под комбинированным наркозом испытуемым животным выполняли дефект метаэпифизарной хрящевой ткани бедренной кости. Все этапы проведения исследования соответствовало

тическим нормам обращения с животными, с соблюдением рекомендаций и требований Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Среди прооперированных крыс было сформировано 2 группы. Крысам экспериментально группы ($n=36$) в момент нанесения дефекта локально вводили мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, крысам контрольной группы ($n=28$) дополнительной хондрогенной стимуляции не производили. Мультипотентные мезенхимальные клетки были получены после обработки липоаспирата коллагеназой, центрифугирования, элиминации гемopoэтических клеток и последующей постепенной очистки культуры от слабоадгезивных клеток путем многослойного культивирования. В дальнейшем путем внутрибрюшинного введения летальной дозы тиопентала натрия животных выводили из исследования на 7, 14, 21 и 28 сутки по 9 особей из экспериментальной группы и по 7 – из группы контроля. Область коленного сустава оценивали макроскопически. Материал фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, производили декальцификацию в 12 % растворе азотистой кислоты и обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, в дальнейшем – заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикрофуксоналом по Ван Гизону. Для

количественной оценки динамики процессов хондрогенеза определяли удельный вес хондроцитов, фиброзной ткани и хрящевого матрикса, а также толщину зон индифферентного, пролиферирующего и дефинитивного хряща. Статистический анализ производили с помощью программы Statistica 13. Вероятность безошибочного прогноза соответствовала $p \leq 0,05$. Для сравнения независимых выборок использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, для определения взаимосвязи между двумя переменными – коэффициент ранговой корреляции τ-Кендалла. Динамику репаративного хондрогенеза оценивали путем построения динамических интегральных рядов на основании морфометрических показателей.

На 7 сутки эксперимента удельный вес хондроцитов в экспериментальной группе составлял $10,67 \pm 3,54$ %, у животных группы контроля – $3,71 \pm 2,29$ %, различия между показателями достоверно значимые ($p=0,002$) (табл. 1). Удельный вес фиброзной ткани между группами достоверно не отличался ($p=0,27$), хотя показатели группы контроля сравнимы с показателями экспериментальной группы были выше ($48,86 \pm 11,68$ % против $41,89 \pm 9,76$ %). Показатели удельного веса хрящевого матрикса у крыс экспериментальной группы составляли $45,11 \pm 9,35$ %, а в группе контроля – $34,29 \pm 16,03$ %, достоверных отличий между показателями не установлено ($p=0,08$).

Таблица 1

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА НА 7 СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

| Морфометрические показатели | ЭГ | КГ | p |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|--------|
| Удельный вес хондроцитов, % | $10,67 \pm 3,54$ | $3,71 \pm 2,29$ | 0,002* |
| Удельный вес фиброзной ткани, % | $41,89 \pm 9,76$ | $48,86 \pm 11,68$ | 0,27 |
| Удельный вес хрящевого матрикса, % | $45,11 \pm 9,35$ | $34,29 \pm 16,03$ | 0,08 |
| Толщина индифферентного хряща, мкм | $15,33 \pm 2,83$ | $10,71 \pm 2,14$ | 0,004* |
| Толщина пролиферирующего хряща, мкм | $77,78 \pm 3,27$ | $54,71 \pm 4,96$ | 0,001* |
| Толщина дефинитивного хряща, мкм | $38,56 \pm 3,84$ | $22,57 \pm 2,88$ | 0,001* |

*Примечание. Установлено достоверное отличие показателей при $p < 0,05$.

Зона пролиферирующего хряща была наиболее выраженной у крыс обоих групп, ее толщины в экспериментальной группе составляла – $77,78 \pm 3,27$ мкм и $54,71 \pm 4,96$ мкм в группе контроля, различия между показателями статистически значимые ($p=0,001$). В экспериментальной группе показатели толщины индифферентного – $15,33 \pm 2,83$ мкм и дефинитивного хряща – $38,56 \pm 3,84$ мкм превалировала сравнительно с показателями группы контроля, где толщина зоны индифферентного хряща составляла – $10,71 \pm 2,14$ мкм, а дефинитивного – $22,57 \pm 2,88$ мкм. При сравнении исследуемых данных в группах установлены достоверные различия, как в

показателях толщины зоны индифферентного хряща ($p=0,004$), так и дефинитивного ($p=0,001$).

Анализируя морфометрические показатели, полученные на 14 сутки эксперимента установлено, что удельный вес хондроцитов экспериментальной группы – $12,33 \pm 1,87$ % значительно превышал показатели группы контроля – $5,14 \pm 1,86$ % ($p=0,001$) (табл. 2). Напротив, удельный вес фиброзной ткани был достоверно выше в группе контроля – $54,29 \pm 12,84$ %, сравнительно с показателями экспериментальной группы – $38,89 \pm 2,71$ % ($p=0,02$). Установлено достоверное отличия показателей удельного веса хрящевого матрикса, который в экспериментальной группе составил – $49,56 \pm 10,67$ % и $34,71 \pm 15,78$ % в группе контроля ($p=0,04$).

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА
НА 14 СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

| Морфометрические показатели | ЭГ | КГ | p |
|-------------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Удельный вес хондроцитов, % | 12,33±1,87 | 5,14±1,86 | 0,001* |
| Удельный вес фиброзной ткани, % | 38,89±2,71 | 54,29±12,84 | 0,02* |
| Удельный вес хрящевого матрикса, % | 49,56±10,67 | 34,71±15,78 | 0,04* |
| Толщина индифферентного хряща, мкм | 16,22±2,64 | 11,86±1,77 | 0,004* |
| Толщина пролиферирующего хряща, мкм | 74,22±1,72 | 56,43±4,86 | 0,001* |
| Толщина дефинитивного хряща, мкм | 40,78±3,53 | 24,86±2,04 | 0,001* |

*Примечание. Установлено достоверное отличие показателей при $p<0,05$.

В экспериментальной группе показатели толщины зоны индифферентного хряща – $16,22\pm2,64$ мкм, пролиферирующего – $74,22\pm1,72$ мкм и дефинитивного – $40,78\pm3,53$ значительно превышали показатели контрольной группы – $11,86\pm1,77$ мкм, $56,43\pm4,86$ мкм и $24,86\pm2,04$ мкм соответственно ($p<0,05$).

На 21 сутки исследования в экспериментальной группе показатели удельного

веса хондроцитов – $14,11\pm4,20$ % и хрящевого матрикса – $55,22\pm11,49$ достоверно превышали показатели контрольной группы – $6,29\pm1,50$ % и $35,86\pm10,45$ % соответственно ($p<0,05$) (табл. 3). В контрольной группе установлено достоверно выше показатели удельного веса фиброзной ткани, которые составили – $57,86\pm9,46$ % и $30,67\pm13,62$ % в экспериментальной группе, различия между показателями статистически значимые ($p=0,003$).

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА
НА 21 СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

| Морфометрические показатели | ЭГ | КГ | p |
|-------------------------------------|-------------|-------------|---------|
| Удельный вес хондроцитов, % | 14,11±4,20 | 6,29±1,50 | 0,001* |
| Удельный вес фиброзной ткани, % | 30,67±13,62 | 57,86±9,46 | 0,003* |
| Удельный вес хрящевого матрикса, % | 55,22±11,49 | 35,86±10,45 | 0,01* |
| Толщина индифферентного хряща, мкм | 18,11±3,22 | 12,29±1,50 | 0,001* |
| Толщина пролиферирующего хряща, мкм | 74,33±1,80 | 57,14±3,39 | 0,0009* |
| Толщина дефинитивного хряща, мкм | 44,11±1,83 | 26,57±2,88 | 0,001* |

*Примечание. Установлено достоверное отличие показателей при $p<0,05$.

Зона пролиферирующего хряща была наиболее значимой в обоих исследуемых группах. В экспериментальной группе толщина зоны пролиферирующего хряща составляла – $74,33\pm1,80$ мкм, а в контрольной группе – $57,14\pm3,39$ мкм, между показателями установлено статистически значимые различия ($p=0,0009$). Зоны индифферентного хряща и дефинитивного также достоверно более выражены в экспериментальной группе ($18,11\pm3,22$ мкм и $44,11\pm1,83$ мкм) сравнительно с показателями контрольной ($12,29\pm1,50$ мкм и $26,57\pm2,88$ мкм) ($p<0,05$).

В экспериментальной группе к 28 суткам эксперимента показатели удельного веса хондроцитов составляли – $16,33\pm3,61$ % в экспериментальной группе и $7,14\pm0,69$ % в группе контроля, при сравнении показателей установлено достоверное различие ($p=0,0009$) (табл. 4). Удельный вес фиброзной ткани в контрольной группе – $55,43\pm13,14$ % значительно превышал

показатели экспериментальной группы – $21,67\pm8,97$ % ($p=0,002$), напротив, в экспериментальной группе – $61,56\pm9,99$ % установлено достоверно высшие показатели удельного веса хрящевого матрикса, сравнительно с показателями группы контроля – $37,43\pm13,04$ % ($p=0,003$).

Толщина зоны индифферентного хряща в экспериментальной группе составила – $19,56\pm3,50$ мкм, в группе контроля показатели достоверно отличались – $13,14\pm0,90$ мкм ($p=0,001$). Толщина зоны пролиферирующего хряща в экспериментальной группе – $78,89\pm2,42$ мкм также достоверно превышала показатели контрольной группы – $59,14\pm2,27$ мкм ($p=0,001$). Зона дефинитивного хряща в экспериментальной группе составляла – $46,22\pm1,72$ мкм и $29,14\pm2,48$ мкм в контрольной группе. При сравнении показателей толщины зоны дефинитивного хряща установлено достоверные различия между группами ($p=0,001$).

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА
НА 28 СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

| Морфометрические показатели | ЭГ | КГ | p |
|-------------------------------------|------------|-------------|---------|
| Удельный вес хондроцитов, % | 16,33±3,61 | 7,14±0,69 | 0,0009* |
| Удельный вес фиброзной ткани, % | 21,67±8,97 | 55,43±13,14 | 0,002* |
| Удельный вес хрящевого матрикса, % | 61,56±9,99 | 37,43±13,04 | 0,003* |
| Толщина индифферентного хряща, мкм | 19,56±3,50 | 13,14±0,90 | 0,001* |
| Толщина пролиферирующего хряща, мкм | 78,89±2,42 | 59,14±2,27 | 0,001* |
| Толщина дефинитивного хряща, мкм | 46,22±1,72 | 29,14±2,48 | 0,001* |

*Примечание. Установлено достоверное отличие показателей при $p<0,05$.

Путем построения и анализа интервальных динамических рядов у крыс экспериментальной группы на протяжении исследования установлено увеличение показателей удельного веса хондроцитов в 1,53 раза, удельного веса хрящевого матрикса – в 1,36 раз (табл. 5). Значения удельного веса фиброзной ткани напротив снизились в 1,93 раза. Таким образом, под влиянием мезенхимальных стволовых клеток установлено положительную тенденцию в формировании хрящевой ткани и отрицательную – в образовании фиброзной. При сравнении морфометрических показателей удельного веса хондроцитов ($p=0,006$), удельного веса фиброзной ткани ($p=0,003$) и удельного веса хрящевого матрикса ($p=0,02$) полученных на протяжении эксперимента установлено достоверное их различие. Анализируя показатели удельного веса хондроцитов и удельного веса хрящевого матрикса с учетом срока исследования установлено наличие прямой корреляционной связи средней силы ($\tau=0,4931$, $p=0,00002$ и $\tau=0,4154$, $p=0,0004$ соответственно) между показателями, что свидетельствует о достоверном увеличении исследуемых показателей на протяжении эксперимента. Между значениями удельного веса фиброзной ткани и сроком

исследования установлено наличие обратной корреляционной связи средней силы ($\tau=0,4920$, $p=0,00002$), что указывает на достоверное снижение показателей с увеличением срока наблюдения.

Оценивая изменения отдельных зон хрящевой ткани у крыс экспериментальной группы установлено увеличение толщины зоны индифферентного хряща в 1,28 раз, зоны пролиферирующего хряща – в 1,01 раз, зоны дефинитивного хряща – в 1,20 раз. При сравнении показателей толщины зоны индифферентного хряща ($p=0,03$), зоны пролиферирующего хряща ($p=0,007$) и зоны дефинитивного хряща ($p=0,0002$) установлено достоверные различия при измерениях в разные периоды наблюдения. Кроме того, между сроком наблюдения и показателями толщины индифферентного хряща ($\tau=0,4185$, $p=0,0003$), дефинитивного хряща ($\tau=0,6203$, $p<0,00001$) установлено наличие прямой корреляционной связи средней силы, свидетельствующей о достоверном увеличении показателей с увеличением периода наблюдения. Достоверного увеличения толщины зоны пролиферирующего хряща на протяжении эксперимента не установлено ($\tau=0,09$, $p=0,44$).

Таблица 5

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРУППЫ

| Показатели | 7 сутки | 14 сутки | 21 сутки | 28 сутки | p |
|--|------------|-------------|-------------|------------|---------|
| Удельный вес хондроцитов, % | 10,67±3,54 | 12,33±1,87 | 14,11±4,20 | 16,33±3,61 | 0,006* |
| Удельный вес фиброзной ткани, % | 41,89±9,76 | 38,89±2,71 | 30,67±13,62 | 21,67±8,97 | 0,003* |
| Удельный вес хрящевого матрикса, % | 45,11±9,35 | 49,56±10,67 | 55,22±11,49 | 61,56±9,99 | 0,02* |
| Толщина зоны индифферентного хряща, мкм | 15,33±2,83 | 16,22±2,64 | 18,11±3,22 | 19,56±3,50 | 0,03* |
| Толщина зоны пролиферирующего хряща, мкм | 77,78±3,27 | 74,22±1,72 | 74,33±1,80 | 78,89±2,42 | 0,0007* |
| Толщина зоны дефинитивного хряща, мкм | 38,56±3,84 | 40,78±3,53 | 44,11±1,83 | 46,22±1,72 | 0,0002* |

*Примечание. Установлено достоверное отличие показателей при $p<0,05$.

Оценивая показатели контрольной группы на протяжении эксперимента установлено увеличение

показателей удельного веса хондроцитов в 1,92 раза, удельного веса фиброзной ткани – в 1,13 раз и

удельного веса хрящевого матрикса – в 1,09 раз (табл. 6). Также отмечено увеличение толщины индифферентного хряща в 1,23 раза, зоны пролиферирующего хряща в 1,08 раз и зоны дефинитивного хряща в 1,29 раз. При сравнении

морфометрических показателей, полученных на протяжении исследования установлено достоверное различие значений удельного веса хондроцитов ($p=0,02$) и толщины зоны дефинитивного хряща ($p=0,005$).

Таблица 6

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ

| Показатели | 7 сутки | 14 сутки | 21 сутки | 28 сутки | p |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| Удельный вес хондроцитов, % | 3,71±2,29 | 5,14±1,86 | 6,29±1,50 | 7,14±0,69 | 0,02* |
| Удельный вес фиброзной ткани, % | 48,86±11,68 | 54,29±12,84 | 57,86±9,46 | 55,43±13,14 | 0,44 |
| Удельный вес хрящевого матрикса, % | 34,29±16,03 | 34,71±15,78 | 35,86±10,45 | 37,43±13,04 | 0,83 |
| Толщина зоны индифферентного хряща, мкм | 10,71±2,14 | 11,86±1,77 | 12,29±1,50 | 13,14±0,90 | 0,11 |
| Толщина зоны пролиферирующего хряща, мкм | 54,71±4,96 | 56,43±4,86 | 57,14±3,39 | 59,14±2,27 | 0,25 |
| Толщина зоны дефинитивного хряща, мкм | 22,57±2,88 | 24,86±2,04 | 26,57±2,88 | 29,14±2,48 | 0,005* |

*Примечание. Установлено достоверное отличие показателей при $p<0,05$.

Анализируя изменения показателей удельного веса хондроцитов с учетом срока исследования установлено наличие прямой корреляционной связи средней силы ($r=0,5120$, $p=0,0001$) свидетельствующей о достоверном увеличении исследуемого показателя на протяжении эксперимента. Между сроком исследования и показателями удельного веса фиброзной ткани, удельного веса хрящевого матрикса достоверной корреляционной связи не зафиксировано ($r=0,2101$, $p=0,12$ и $r=0,1293$, $p=0,33$ соответственно). Доказано достоверное увеличение показателей толщины индифферентного хряща ($r=0,3979$, $p=0,003$), пролиферирующего хряща ($r=0,3295$, $p=0,01$) и дефинитивного хряща ($r=0,5718$ $p=0,00002$) на протяжении исследования.

Выводы и предложения.

Таким образом, в экспериментальной модели острого повреждения хрящевой ткани установлено достоверное улучшение морфометрических показателей reparativного хондрогенеза под влиянием мезенхимальных стволовых клеток.

В экспериментальной группе на протяжении исследования установлено достоверное увеличение показателей удельного веса хондроцитов в 1,53 раза, хрящевого матрикса – в 1,36 раз, на фоне достоверного снижения показателей удельного веса фиброзной ткани в 1,93 раза.

Также под влиянием мезенхимальных стволовых клеток установлено положительную тенденцию увеличения толщины зоны индифферентного хряща в 1,28 раз, зоны пролиферирующего хряща – в 1,01 раз, зоны дефинитивного хряща – в 1,20 раз.

Список литературы:

1. Айзенштадт А. А. Сравнение пролиферативной активности и фенотипа МСК, полученных из костного мозга, жировой ткани и пупочного канатика / А. А. Айзенштадт, Н. И. Енукашвили, Т. Л. Золина, Л. В. Александрова, А. Б. Смоляников // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2015. – Том 7, № 2. – С. 14–22.
2. Киселевский М. В. Роль мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток в ремоделировании хрящевой ткани / М. В. Киселевский, Н. Ю. Анисимова, Ю. И. Должикова, Р. Я. Власенко, Ф. С. Сенатов, А. В. Карапулов // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 4. – С. 515–522.
3. Hashimoto, Y. Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial / Y. Hashimoto, Y. Nishida, S. Takahashi, H. Nakamura, H. Mera, K. Kashiwa, S. Wakitani // Regenerative therapy. – 2019. – 11. P. 106–113. doi:10.1016/j.reth.2019.06.002
4. Lamo-Espinosa J. M. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II) / J. M. Lamo-Espinosa, G. Mora, J. F. Blanco, F. Granero-Moltó, J. M. Nuñez-Córdoba, C. Sánchez-Echenique, J. M. Bondía, J. D. Aquerreta, E. J. Andreu, E. Ornilla, E. M. Villarón, A. Valentí-Azcárate, F. Sánchez-Guijo, M. C. Del Cañizo, J. R. Valentí-Nin, F. Prósper // J

Transl Med. – 2016. – 14(1). – P. 246. doi: 10.1186/s12967-016-0998-2.

5. Li L. Mesenchymal Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for Articular Cartilage Defects / L. Li, X. Duan, Z. Fan, L. Chen, F. Xing, Z. Xu, Q. Chen, Z. Xiang // Sci Rep. – 2018. – 8(1). – 9900. doi:10.1038/s41598-018-27737-y

6. Mak J. Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model. J. Mak, C. L. Jablonski, C. A. Leonard, J. F. Dunn, E. Raharjo, J. R. Matyas, J. Biernaskie, R. J. Krawetz // Sci Rep. – 2016. – 6. – P. 23076. doi: 10.1038/srep23076

7. Satué, M. Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs / M. Satué, C. Schüller, N. Ginner, R. G. Erben // Scientific reports. – 2019. – 9 (1). – 10153.

doi:10.1038/s41598-019-46554-5

8. Wang Y. Mesenchymal Stem Cells for Treating Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis / Y. Wang, M. Yuan, Q.-Y. Guo, S.-B. Lu, J. Peng // Cell Transplant. – 2015. – 24. – P.1661–1678.

9. Yamasaki S. Effect of the direct injection of bone marrow mesenchymal stem cells in hyaluronic acid and bone marrow stimulation to treat chondral defects in the canine model / S. Yamasaki, Y. Hashimoto, J. Takigami, S. Terai, H. Mera, H. Nakamura // Regenerative Therapy. – 2015. – 2. P. 42–48.

10. Yang X. Intraarticular Injection of Allogenic Mesenchymal Stem Cells has a Protective Role for the Osteoarthritis / X. Yang, T. Y. Zhu, L. C. Wen, Y. P. Cao, C. Liu, Y. P. Cui, Z. C. Meng, H. Liu // Chin Med J (Engl). – 2015. – 128(18). – P. 2516-2523. doi: 10.4103/0366-6999.164981

Avdosiev Yu. V.

Doctor of medical sciences, Head of the X-ray Surgery Department
State Institution “Zaytsev V.T. Institute of General and Urgent Surgery of NAMS of Ukraine”,
Kharkiv, Ukraine

Pankiv K. M.

assistant of the Department of Endoscopic and Cardiovascular Surgery
National Pirogov Memorial Medical University,
Vinnytsia, Ukraine

Ustymenko O.S.

assistant of the Department of Human Anatomy
Bogomolets National Medical University
Kyiv, Ukraine

SEVERITY PREDICTION AND COMPLICATIONS RISK IN PATIENTS WITH ACUTE ALIMENTARY PANCREATITIS TAKING ACCOUNT OF GENE PRSS1 POLYMORPHISM

Авдосєєв Юрій Володимирович

доктор медичних наук, завідувач рентгенокірургічним відділенням
ДУ “Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України”,
Харків, Україна

Паньків Катерина Михайлівна

асистент кафедри ендоскопічної та серцево-судинної хірургії
Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова,
Вінниця, Україна

Устименко Олена Сергіївна

асистент кафедри анатомії людини
Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

ПРОГНОЗУВАННЯ ВАЖКОСТІ ПЕРЕБІGU ТА РИЗИК РОЗВИТКУ УСКЛАДНЕНЬ У ПАЦІНТІВ З ГОСТРИМ АЛІМЕНТАРНИМ ПАНКРЕАТИТОМ З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА PRSS1

Summary. 70 patients with acute alimentary pancreatitis, 48 (68.57 %) men and 22 (31.43 %) women were examined. Mean age 45.4±13.87 years. By analyzing genetically determined factors, a significantly higher frequency of mutational status of the PRSS1 gene was established in patients with severe acute pancreatitis ($p = 0.01$) and complicated course ($p = 0.04$). The predicted higher chances of forming a severe course in patients with the presence of mutation of the PRSS1 gene ($OR = 3.70$; CI (1.35-10.13), $p=0.008$), and its absence are associated with a reduced risk of complications ($OR = 0.16$; CI (0.03-0.85), $p=0.01$). The study proved the high informativeness of the identification of the mutational status of the PRSS1 gene in patients with acute alimentary pancreatitis regarding the prediction of the inflammatory process severity and the risk of developing a complicated course.

Анотація. Обстежено 70 хворих з гострим аліментарним панкреатитом, 48 (68,57 %) чоловіків та 22 (31,43 %) жінок. Середній вік $45,4 \pm 13,87$ років. Шляхом аналізу генетично детермінованих факторів встановлено достовірно вищу частоту мутаційного статусу гена PRSS1 у пацієнтів з важкими формами гострого панкреатиту ($p=0,01$) та ускладненим перебігом ($p=0,04$). Доведено прогнозовано вищі шанси формування важкого перебігу у пацієнтів за наявності мутації гена PRSS1 ($OR=3,70; CI (1,35-10,13), p=0,008$), а її відсутність асоційована зі зниженими ризиком розвитку ускладнень ($OR=0,16; CI (0,03-0,85), p=0,01$). В результаті дослідження доведено високу інформативність ідентифікації мутаційного статусу гена PRSS1 у пацієнтів з гострим аліментарним панкреатитом щодо прогнозування важкості перебігу запального процесу та ризику розвитку ускладненого перебігу.

Key words: acute alimentary pancreatitis, polymorphic variants of PRSS1 gene, mutational status of PRSS1 gene, complicated course, severity.

Ключові слова: гострий панкреатит аліментарного генезу, поліморфні варіанти гена PRSS1, мутаційний статус гена PRSS1, ускладнений перебіг, ступінь важкості.

Постановка проблеми. Проблема діагностики, вибору методу лікування та профілактики гострого аліментарного панкреатиту є однією з найбільш складних та актуальних в сучасній ургентній абдомінальній хірургії [3, 4, 10]. Значний інтерес науковців та практичних лікарів обумовлений неухильним зростанням частоти випадків гострого панкреатиту аліментарного генезу та його деструктивних форм зокрема [2, 11]. Обрання оптимальної тактики лікування та попередження розвитку ускладнень можливі лише на основі ранньої діагностики захворювання, визначення його форми та глибини деструктивних змін в залозі. Необхідним є ретельне загальноклінічне обстеження пацієнта та оцінка структурно-функціонального стану підшлункової залози. Відсутність доведених клініко-лабораторних критеріїв ранньої діагностики форми, прогнозування важкості перебігу та розвитку ускладнень гострого аліментарного панкреатиту привертає особливу увагу та виводить проблему в ряд тих, що потребують першочергового вирішення [5, 7, 12].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Одним із найбільш сучасних методів вивчення особливостей перебігу гострого панкреатиту є дослідження генетично детермінованих факторів. На сьогодні уже ідентифіковано ряд мутацій, які обумовлюють склонність до розвитку гострого панкреатиту [6, 8]. Найпоширенішою є мутація в гені катіонного трипсиногену – PRSS1, частота ідентифікації якої становить 68-81 % у хворих із запальними захворюваннями підшлункової залози. Ген PRSS1 забезпечує синтез основної складової загального трипсиногену підшлункової залози – трипсиногену 1. Доведено, що мутація в гені PRSS1 полегшує процес аутоактивації трипсина в підшлунковій залозі [8, 9]. Внаслідок мутації трипсиноген стає стійким до аутолізу і підлягає більш легкій аутоактивації, що провокує розвиток генетично обумовленого гострого панкреатиту.

Пенетрантність гена становить 80 %, що свідчить про відсутність клінічних проявів панкреатиту у 20 % осіб з ідентифікованою мутацією гена [6, 9]. Таким чином, існують додаткові генетично детерміновані фактори, які володіють протективними властивостями у функціонуванні залози. Доведений зв'язок наявності мутації в гені PRSS1 з частими

рецидивуючими атаками гострого панкреатиту, підвищеним ризиком розвитку хронічного панкреатиту, панкреатичного паренхіматозного кальцифікування та раку підшлункової залози [1, 8].

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Значення генетичних чинників у розвитку запального процесу в підшлунковій залозі описано в численних роботах, однак зв'язок мутаційного статусу з урахуванням важкості перебігу та розвитком ускладнень залишається невивченим. Прогнозування важкості перебігу гострого аліментарного панкреатиту на ранніх етапах дозволить попередити розвиток ускладнень та знизити частоту незадовільних результатів лікування. Таким чином, визначення ролі мутаційного статусу в якості предиктора важкого чи ускладненого перебігу гострого панкреатиту є актуальним та потребує подальшого вивчення.

Ціль статті. Визначити роль поліморфізму гену PRSS1 у прогнозуванні ступеня важкості та розвитку ускладненого перебігу гострого панкреатиту аліментарного генезу.

Викладення основного матеріалу. Проведено комплексне обстеження 70 хворих з гострим аліментарним панкреатитом, які перебували на лікуванні в хірургічному відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні імені М.І. Пирогова за період 2014–2017 років. Середній вік обстежених становив $45,4 \pm 13,87$ років. У досліджувану групу включено 48 (68,57 %) чоловіків та 22 (31,43 %) жінок. Діагностичні етапи і тактика лікування усіх пацієнтів групи відповідали вимогам клінічного протоколу надання медичної допомоги хворим з гострим панкреатитом, згідно наказу МОЗ України N 297 від 02.04.2010 р.

З урахуванням важкості перебігу гострого аліментарного панкреатиту серед обстежених було сформовано 3 групи – у більшості – 34 (48,57 %) хворих встановлено важкий перебіг гострого панкреатиту, у 25 (35,72 %) – середній ступінь важкості, ще у 11 (15,71 %) – легкий. Додатково було сформовано групи з урахуванням наявності ускладнень. Важкість перебігу гострого панкреатиту та наявність ускладнень встановлювали з допомогою класифікації Атланта

(2012 р.) [3]. Ускладнений перебіг гострого панкреатиту зафіксовано у переважної більшості – 59 (84,29 %) хворих групи, у решти – 11 (15,71 %) пацієнтів перебіг мав неускладнений характер. В структурі ускладнень найвищу частоту мали місцеві асептичні ускладнення, які зафіксовано у 59 (84,29 %) пацієнтів, у 35 (50,0 %) хворих встановлено місцеві гнійні ускладнення, ще у 3 (4,29 %) місцеві вторинні ускладнення. Системні ускладнення спостерігалися у 31 (44,29 %) обстеженої групи.

Усім пацієнтам обстежуваної групи було виконано визначення поліморфних алелей генів PRSS1. Геномна ДНК екстрагувалась із мононуклеарів периферичної крові з

використанням набору для виділення ДНК Gene Jet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, США) згідно інструкції виробника. Для ідентифікації поліморфних алелей гена PRSS1 використовували ампліфікацію відповідної ділянки гену методом алель-специфічної ПЛР (паралельно проводили дві реакції ампліфікації – з двомаарами алель-специфічних праймерів) в режимі реального часу з використанням комплекту реагентів за методикою SNP-експрес-РВ (Літекс, РФ). Ампліфікацію проводили на приладі “iCycler IQ5” (BioRad, США). Режим ампліфікації: 930С, 1 хв; 35 циклів: 930С, 10 с.; 640С, 10 с.; 720С, 20 с.

Таблиця 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛІМОРФНИХ ВАРИАНТІВ ГЕНА PRSS1 У ПАЦІЄНТІВ З УРАХУВАННЯМ ВАЖКОСТІ ПЕРЕБІGU ГОСТРОГО АЛІМЕНТАРНОГО ПАНКРЕАТИТУ

| Генетичний статус | Ступінь важкості | | | p |
|-------------------|------------------|-------------|--------------|--------|
| | легкий | середній | важкий | |
| RR | 9 (81,82 %) | 14 (56,0 %) | 11 (32,35 %) | 0,01* |
| RH | 2 (18,18 %) | 10 (40,0 %) | 11 (32,35 %) | 0,44 |
| HH | 0 | 1 (4,0 %) | 12 (35,30 %) | 0,002* |
| RH+ HH | 2 (18,18 %) | 11 (44,0 %) | 23 (67,65 %) | 0,01* |

*Примітка. Встановлено достовірну відмінність показників при $p < 0,05$.

Шляхом аналізу генетично детермінованих факторів відсутність мутації гена PRSS1 (R122R) зустрічалася у більшості хворих з легким – 9 (81,82 %) та середнім ступенем важкості – 14 (56,0 %) та у 11 (32,35 %) пацієнтів з важким перебігом (табл. 1). При порівнянні частотних показників встановлено достовірну відмінність між результатами ($p=0,01$). Гомозиготні та гетерозиготні мутації PRSS1 (R122H), (H122H) зустрічалися у більшості пацієнтів з важким – 23 (67,65 %) та середнім ступенем важкості – 11 (44,0 %) гострого панкреатиту та у 2 (18,18 %) хворих з легким перебігом, різниця між показниками статистично значима ($p=0,01$). Крім того, у пацієнтів з важким перебігом з достовірно вищою частотою

зустрічалася гетерозиготна мутація PRSS1 (H122H) ($p=0,002$).

В подальшому оцінювали частоту мутаційного статусу у групах пацієнтів з урахуванням розвитку ускладнень (табл. 2). У більшості хворих з неускладненим перебігом гострого панкреатиту – 9 (81,82 %) мутації гена PRSS1 (R122R) не зустрічалися, відсутність мутації даного гену спостерігалася і у 25 (42,37 %) пацієнтів з ускладненим перебігом, відмінність між показниками статистично значима ($p=0,04$). Гомозиготні та гетерозиготні мутації PRSS1 (R122H), (H122H) зустрічалися у більшості пацієнтів з ускладненим перебігом гострого панкреатиту – 34 (57,63 %) та у 2 (18,18 %) хворих з легким перебігом, різниця між показниками статистично значима ($p=0,04$).

Таблиця 2

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛІМОРФНИХ ВАРИАНТІВ ГЕНА PRSS1 У ПАЦІЄНТІВ З УРАХУВАННЯМ РОЗВИТКУ УСКЛАДНЕНЬ ГОСТРОГО АЛІМЕНТАРНОГО ПАНКРЕАТИТУ

| Генетичний статус | Перебіг захворювання | | p |
|-------------------|----------------------|--------------|-------|
| | неускладнений | ускладнений | |
| RR | 9 (81,82 %) | 25 (42,37 %) | 0,04* |
| RH | 2 (18,18 %) | 21 (35,59 %) | 0,37 |
| HH | 0 | 13 (22,04 %) | 0,25 |
| RH+ HH | 2 (18,18 %) | 34 (57,63 %) | 0,04* |

*Примітка. Встановлено достовірну відмінність показників при $p < 0,05$.

Наявність гомозиготних та гетерозиготних мутацій PRSS1 (R122H), (H122H) асоційована з достовірно вищим ризиком розвитку важкого перебігу гострого панкреатиту ($OR = 3,70$; $CI (1,35-10,13)$, $p = 0,008$) та нижчими шансами формування легкого перебігу ($OR = 0,16$; $CI (0,03-0,85)$, $p = 0,01$) (табл. 3). У пацієнтів з відсутністю мутацій в гені PRSS1 (R122R) встановлено достовірно вищий

ризик легкого перебігу гострого аліментарного панкреатиту ($OR = 6,12$; $CI (1,18-31,75)$, $p = 0,01$) та нижчі шанси розвитку важких форм ($OR = 0,27$; $CI (0,10-0,74)$, $p = 0,008$). Наявність гомозиготних мутацій PRSS1 (H122H) пов’язана зі зниженням ризику розвитку середнього ступеня важкості ($OR = 0,12$; $CI (0,01-0,98)$, $p = 0,01$) та вищими шансами формування гострого

панкреатиту важкого ступеня важкості (OR = 19,09; CI (2,23-163,37), p = 0,0002).

Таблиця 3
ПРОГНОЗУВАННЯ ВАЖКОСТІ ПЕРЕБІGU ГОСТРОГО АЛІМЕНТАРНОГО ПАНКРЕАТИTU У ПАЦІЄНТІВ З УРАХУВАННЯM ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА PRSS1

| Генетичний статус | Ступінь важкості | | | | | |
|-------------------|----------------------|-------|---------------------|-------|------------------------|---------------------|
| | легкий | | середній | | важкий | |
| | OR | p | OR | p | OR | p |
| RR | 6,12 (1,18-31,75) | 0,01* | | | 0,35 | 0,27 (0,10-0,74) |
| RH | | 0,24 | | 0,35 | | 0,93 |
| HH | | 0,02* | 0,12 (0,01-0,98) | 0,01* | 19,09 (2,23-163,37) | 0,0002* |
| RH, HH | 0,16 (0,03-0,85) | 0,01* | | 0,35 | 3,70 (1,35-10,13) | 0,008* |

*Примітка. Встановлено достовірну відмінність показників при p<0,05.

Відсутність мутацій гена PRSS1 асоційована зі зниженням ризику розвитку місцевих ускладнень (OR = 0,16; CI (0,03-0,85), p = 0,01) – перитоніту (OR = 0,19; CI (0,04-0,97), p = 0,02), плевриту (OR = 0,19; CI (0,04-0,97), p = 0,02), панкреатичного скupчення (OR = 0,27; CI (0,07-0,95), p=0,03),

гострого панкреатичного та пара панкреатичного некрозу (OR = 0,16; CI (0,03-0,85), p = 0,01). Підвищений ризик плевриту зафіковано у пацієнтів з гомозиготною мутацією PRSS1(H122H) (OR = 5,31; CI (1,28-22,13), p = 0,02).

Таблиця 4
ЗАГАЛЬНИЙ РИЗИК РОЗВИТКU УСКЛАДНЕнь ТА РИЗИК МІСЦЕВИХ АСЕПТИЧНИХ УСКЛАДНЕнь ГОСТРОГО АЛІМЕНТАРНОГО ПАНКРЕАТИTU З УРАХУВАННЯM ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА PRSS1

| Ускладнення | Поліморфні варіанти | | | | | |
|------------------------|---------------------|-------|----|---|------|----------------------|
| | RR | | RH | | HH | |
| | OR | p | OR | p | OR | p |
| Ускладнення | 0,16 (0,03-0,85) | 0,01* | | | 0,24 | |
| Місцеві | 0,16 (0,03-0,85) | 0,01* | | | 0,24 | |
| Перитоніт | 0,19 (0,04-0,97) | 0,02* | | | 0,11 | |
| Плеврит | 0,19 (0,04-0,97) | 0,02* | | | 0,79 | 5,31 (1,28-22,13) |
| Панкреатичне скupчення | 0,27 (0,07-0,95) | 0,03* | | | 0,10 | |
| Гострий некроз | 0,16 (0,03-0,85) | 0,01* | | | 0,24 | |
| Псевдокіста | | 0,15 | | | 0,27 | |
| Панкреатогенний ЦД | | 0,004 | | | 0,08 | |
| | | | | | | 0,36 |

*Примітка. Встановлено достовірну відмінність показників при p<0,05.

Достовірно вищі шанси формування місцевих гнійних ускладнень гострого панкреатиту, таких як гнійний перитоніт (OR = 4,03; CI (1,09-14,93), p = 0,04), абсцеси черевної порожнини (OR = 7,29; CI (1,79-29,70), p = 0,005), нагноення псевдокісти (OR = 8,28; CI (1,78-38,54), p = 0,006) зафіковано у пацієнтів з гомозиготною мутацією PRSS1 (H122H)

(табл. 5). У хворих з гострим аліментарним панкреатитом відсутність мутацій гена PRSS1 достовірно знижує шанси розвитку гнійного перитоніту (OR = 0,17; CI (0,04-0,69), p = 0,005) та нагноення псевдокісти (OR = 0,11; CI (0,01-0,94), p=0,01).

Таблиця 5

РИЗИК РОВИТКУ МІСЦЕВИХ ГНІЙНИХ УСКЛАДНЕНЬ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ У ПАЦІЄНТІВ З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА PRSS1

| Ускладнення | Поліморфні варіанти | | | | | |
|----------------------|---------------------|--------|----|------|----------------------|--------|
| | RR | | RH | | HH | |
| | OR | p | OR | p | OR | p |
| Інфіковані скупчення | | 0,0007 | | 0,07 | | 0,18 |
| Відмежовані некрози | | | | | | |
| Гнійний перитоніт | 0,17 (0,04-0,69) | 0,005* | | 0,30 | 4,03 (1,09-14,93) | 0,04* |
| Абсцеси | | 0,07 | | 0,52 | 7,29 (1,79-29,70) | 0,005* |
| Емпієма плеври | | 0,94 | | 0,98 | | 0,90 |
| Флегмона | | 0,37 | | 0,11 | | 0,34 |
| Нагноєна псевдокіста | 0,11 (0,01-0,94) | 0,01* | | 0,97 | 8,28 (1,78-38,54) | 0,006* |

*Примітка. Встановлено достовірну відмінність показників при $p < 0,05$.

У пацієнтів досліджуваної групи не встановлено підвищеної ризику формування місцевих вторинних ускладнень гострого аліментарного панкреатиту з урахуванням

поліморфних варіантів гена PRSS1, що обумовлено низькою частотою даного виду ускладнень в обстежених (табл. 6).

Таблиця 6

РИЗИК РОВИТКУ МІСЦЕВИХ ВТОРИННИХ УСКЛАДНЕНЬ НЕКРОТИЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ У ПАЦІЄНТІВ З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА PRSS1

| Ускладнення | Поліморфні варіанти | | | | | |
|--------------------|---------------------|------|----|------|----|------|
| | RR | | RH | | HH | |
| | OR | p | OR | p | OR | p |
| Гостра кровотеча | | 0,25 | | 0,37 | | 0,06 |
| Нориці | | 0,97 | | 0,20 | | 0,31 |
| Арозивна кровотеча | | 1,0 | | 1,0 | | 1,0 |

Відсутність мутацій гена PRSS1 достовірно знижує шанси розвитку системних ускладнень гострого аліментарного панкреатиту ($OR = 0,23$; CI (0,08-0,64), $p = 0,003$) – синдрому системної запальної відповіді ($OR = 0,17$; CI (0,05-0,58), $p = 0,002$) та поліорганної недостатності ($OR = 0,14$; CI (0,03-0,72), $p = 0,006$). У пацієнтів з гетерозиготною мутацією гена PRSS1 встановлено підвищений

різик розвитку синдрому поліорганної недостатності ($OR = 4,48$; CI (1,24-16,21), $p = 0,02$), а гомозиготні носії мутації мають вищі шанси розвитку синдрому системної запальної відповіді ($OR = 3,95$; CI (1,10-14,15), $p = 0,03$), синдрому органної недостатності ($OR = 8,00$; CI (1,48-43,14), $p = 0,02$) та системних ускладнень в цілому ($OR = 5,71$; CI (1,38-23,72), $p = 0,008$).

Таблиця 7

РИЗИК РОВИТКУ СИСТЕМНИХ УСКЛАДНЕНЬ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ У ПАЦІЄНТІВ З УРАХУВАННЯМ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА PRSS1

| Ускладнення | Поліморфні варіанти | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------|--------|----------------------|-------|----------------------|--------|
| | RR | | RH | | HH | |
| | OR | p | OR | p | OR | p |
| Системні | 0,23 (0,08-0,64) | 0,003* | | | 5,71 (1,38-23,72) | 0,008* |
| Синдром системної запальної відповіді | 0,17 (0,05-0,58) | 0,002* | | | 3,95 (1,10-14,15) | 0,03* |
| Синдром органної недостатності | 0,15 (0,02-1,39) | 0,04 | | | 8,00 (1,48-43,14) | 0,02* |
| Синдром поліорганної недостатності | 0,14 (0,03-0,72) | 0,006* | 4,48 (1,24-16,21) | 0,02* | | 0,65 |

*Примітка. Встановлено достовірну відмінність показників при $p < 0,05$.

Висновки:

1. Встановлено достовірно вищу частоту мутаційного статусу гену PRSS1 у хворих з важкими формами гострого аліментарного панкреатиту та за наявності ускладнень.
2. Доведено високу інформативність ідентифікації мутаційного статусу генів PRSS1 у пацієнтів з гострим панкреатитом аліментарного генезу щодо оцінки важкості запального процесу та ризику формування ускладнень.
3. Таким чином, визначення мутаційного статусу є надійним та точним критерієм прогнозування ступеня важкості та визначення ускладненого перебігу гострого панкреатиту.

Список літератури:

1. Borowitz M. J. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: A report from Children's Oncology Group study AALL0232. / M. J. Borowitz, B. L. Wood, M. Devidas // Blood. – 2015. – 126. – p. 964–971.
2. Dumnicka, P. The Interplay between Inflammation, Coagulation and Endothelial Injury in the Early Phase of Acute Pancreatitis: Clinical Implications. / P. Dumnicka, D. Maduzia, P. Ceranowicz, R. Olszanecki, R. Drożdż, B. Kuśnierz-Cabala // International journal of molecular sciences. – 2017. – 18. – 2. – p. 354. doi:10.3390/ijms18020354
3. Greenberg J. A. Clinical practice guideline: management of acute pancreatitis / J. A. Greenberg, J. Hsu, M. Bawazeer, J. Marshall, J. O. Friedrich, A. Nathens, N. Coburn, G. R. May, E. Pearsall, R. S. McLeod // Can J Surg. – 2016. – 59. – 2. – p. 128–140. doi: 10.1503/cjs.015015. PMID: 27007094; PMCID: PMC4814287.
4. Karakayali F. Surgical and interventional management of complications caused by acute pancreatitis. / F. Karakayali // World J Gastroenterol. – 2014. – 20. – 37. – p. 13412–13423.
5. Leppkes M. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. / M. Leppkes, C. Maueröder, S. Hirth, S. Nowecki, C. Günther, U. Billmeier, S. Paulus, M. Biermann, L. E. Munoz, M. Hoffmann // Nat. Commun. – 2016. – 7. c. 10973. doi: 10.1038/ncomms10973.
6. Liu C. Clinical and Genetic Risk Factors for Acute Pancreatitis in Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. / C. Liu, W. Yang, M. Devidas, C. Cheng, D. Pei, C. Smith, M. V. Relling // Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2016. – 34. – 18. – p. 2133–2140. doi:10.1200/JCO.2015.64.5812
7. Merza M. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis / Merza M., Hartman H., Rahman M., Hwaiz R., Zhang E., Renström E., Luo L., Mörgelin M., Regner S., Thorlacius H. // Gastroenterology. – 2015. – 149. c. 1920–1931. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.026.
8. Mounzer R. Genetics of acute and chronic pancreatitis / R. Mounzer, D. C. Whitcomb // Curr Opin Gastroenterol. – 2013. – 29. – p. 544–551.
9. Shah, A. P. Acute pancreatitis: current perspectives on diagnosis and management / A. P. Shah, M. M. Mourad, S. R. Bramhall // Journal of inflammation research. – 2018. – 11. – p. 77–85. doi:10.2147/JIR.S135751
10. Werner J. Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. / J. Werner, S. Uhl, W. Feuerbach, M. Buchler // Gut. – 2005. – 54. – 3. – p. 426–436.
11. Yadav D. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. / D. Yadav, A. B. Lowenfels // Gastroenterology. – 2013. – 144. p. 1252–1261.
12. Yang Z. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. / Z. Yang, X. Meng, P. Xu // J. Cell. Mol. Med. – 2015. – 19. – c. 2513–2520. doi: 10.1111/jcmm.12639.

Trofymov A.

Researcher, radiologist

Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine

Starenkiy V.

doctor of medicine, senior researcher

Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine

Svynarenko A.

Radiologist

Grigoriev Institute for medical Radiology NAMS of Ukraine

CONFORMAL RADIATION THERAPY WITH INDIVIDUAL PLANNING OF TARGET VOLUME FOR LOCALLY ADVANCED NON-METASTATIC PROSTATE CANCER: TRANSFORMATION OF CLINICAL SYMPTOMS AND A CHANGE IN THE QUALITY OF LIFE IN PATIENTS AT THE STAGE OF RADIATION TREATMENT.

Summary. The aim of this study was to determine the effect of treatment on the clinical course of the disease and a change in the quality of life in patients who underwent two types of treatment planning: traditional (planning for conventional radiation therapy without monitoring the position of the target volume isocenter) and developed by us, the one which allows the planning for the 3D CRT course followed by monitoring the position of the target volume in the interfractional period. Assessment of quality of life in patients who underwent a course of EBRT with special radiation treatment planning method was carried out using the IPSS scale (International Prostate Symptom Score), which allows the determination the severity of symptoms in patients with urination disorder. Evaluation of a quality of life index was used as an additional method. The incidence rate of the reported disorders in the group of patients with individual treatment planning decreased 2.1 times (from 73% to 34.9%, respectively), while in the control group this rate barely reached 1.3 times (from 68.6% to 51.4%, respectively).

Keywords. External beam radiation therapy, treatment planning, target volume, prostate cancer.

Prostate cancer is one of the most common cancers among men around the world: external beam radiation therapy (EBRT) is a standard treatment for localized and locally advanced prostate cancer [1, 2].

The progress made over the past decade in modern radiation therapy has improved treatment tolerance and reduced the risk of complications for organs at risk (OAR) and healthy tissues. It has been made possible by means of strictly conformal methods of irradiation with the introduction of higher doses [3], as well as through the introduction of procedures of the accuracy improvement and reproducibility of radiation therapy by daily checks and correction of the position of the previously reduced target volume [4]. However, there are still no reliable planning models whose goal would be to reduce the genitourinary toxicity due to a change in the filling of the bladder that occurs between the planning computed tomography and the irradiation session. [5]

An estimated 15-year survival rate in patients with prostate cancer after EBRT at T2 and T3 stages is 65–68% and 44–75%, respectively [6], and the most recent results of modern EBRT appear to have been further improved. With such a high life expectancy, tolerance may be an increasingly important criterion for choosing a treatment [7].

In addition to assessing radiation toxicity by the doctor, the subjective assessment of the quality of life by the patient has become an important aspect of tolerance assessment in modern radiotherapy [8]. Specially designed questionnaires, based on a set of questions covering the most important aspects of everyday life and side effects, provide a comprehensive assessment of the patient's quality of life [9]. In most articles devoted to this problem of radiation therapy for

prostate cancer, the quality of life appears to remain stable or only slightly decrease after treatment; however, patients experience a number of dysuric disorders, irritative and obstructive symptoms [10].

Objective: to evaluate treatment efficacy of patients with locally advanced non-metastatic prostate cancer prepared for the course of conformal radiation therapy using the method of individual planning.

Materials and methods. The study involved 63 patients with prostate cancer T2-T3b, stages N0-1NM0. After carrying out a set of necessary diagnostic procedures that confirmed the inoperability of the tumor due to the locally advanced prostate cancer, as well as the absence of distant metastases, these patients became candidates for neoadjuvant radiation therapy. It was performed at the clinic of the State Institution "S. P. Grigoriev Institute for Medical Radiology NAMS of Ukraine" in the period from 2012 to 2016, treatment planning was carried out for each patient (Patents for utility model "Method for radiation treatment planning in patients with prostate cancer" No. 97417 and No. 106050). Radiation treatment planning was done by scanning the patient on a CT scanner with a full bladder and one more time with an empty bladder. CT scans with a full bladder were reference standards. Further, after contouring the target volume and OAR in the planning system, the displacement of the prostate gland was determined and the dependence of its displacement on the filling of the bladder was mathematically proved. Before each irradiation session, using the ultrasound imaging method, the volume of the bladder was determined and using the formulas calculated with mathematical method, the displacement of the target organ in three directions was calculated with the subsequent adjustment of its position in order to match

the reference standard. The treatment was carried out on a Clinac 600C linac with 6 MeV photon energy. The comparison group included patients who underwent planning for conventional EBRT, who were treated on the ROKUS-AM machine with 1.25 MeV.

Assessment of quality of life in patients who underwent a course of EBRT was done according to the IPSS scale (International Prostate Symptom Score), which allows us to determine the severity of symptoms in patients with urination disorder. Assessment of a quality of life index was used as an additional method.

It should be noted that the planning of radiation therapy course was carried out in two ways: traditional (conventional) and personally developed by the author of the study (conformal individualized).

Results and its discussion. One of the main components of the study was to determine the effect of treatment on the clinical course of the disease and change in the quality of life in patients who underwent two types of preradiation planning: traditional (planning of the conventional radiation therapy without monitoring the position of the target volume isocenter) and developed by us, the one which allows planning for

the 3D CRT course followed by monitoring the position of the target volume in the interfractional period.

All clinical symptoms were divided into irritative and obstructive.

The first group includes symptoms such as:

- frequent urination;
- feeling of not completely empty bladder;
- discomfort in the perineum (most often spastic or painful).

Obstructive symptoms include:

- difficulty in the process of urination;
- atypical nature of the urine stream (too thin or intermittent);
- urinary retention;
- prolongation of the urination process;
- tension of the abdominal muscles for the sensation of complete emptying of the bladder.

Table 1 presents information that allows you to track the dynamics of the main symptoms of the disease in accordance with the selected method of radiation therapy planning — conformal individualized or conventional.

THE INFLUENCE OF THE METHOD OF PRERADIATION PREPARATION FOR RADIATION TREATMENT OF LOCALLY ADVANCED PROSTATE CANCER ON THE DYNAMICS OF DISEASE SYMPTOMS.

| Treatment protocol/symptoms | Irritative symptoms | | Obstructive symptoms | |
|---|---------------------|------|----------------------|-------|
| | n | % | n | % |
| Individualized 3D CRT (main group, n=63) | | | | |
| baseline | 25 | 39,7 | 14 | 22,2 |
| complete improvement | 7 | 11,1 | 4 | 6,3 |
| partial improvement | 15 | 23,8 | 10 | 15,9 |
| need for continuous catheterization | — | — | 6 | 9,5 |
| Conventional RT (control group, n=35) | | | | |
| baseline | 15 | 40,4 | 9 | 25,7 |
| complete improvement | 4 | 11,4 | 1 | 2,9 |
| partial improvement | 6 | 17,1 | 2 | 5,7* |
| need for continuous catheterization | — | — | 6 | 17,1* |

Note: * - significant differences ($p < 0,05$, CCU).

The first group of symptoms (irritative) was found in approximately 40% of the investigated cases. The dominance of such symptoms can be explained by the fact that they develop at an early stage of the disease, as a rule, being the first clinically detected sign of locally advanced prostate cancer.

Approximately 10% of patients showed a positive trend regarding the reduction or disappearance of irritative symptoms during the radiation treatment. It is symptomatic that these data were identified both in the main and in the control groups.

As for the partial improvement of the declared symptoms, it is 3D CRT that gives the greater effect (the difference with the control group reaches 6.7%:

23.8% of cases of partial improvement in the main group, while in the control this figure is kept at 17,1%). The obtained results give reasons to consider 3D CRT as a very promising way to control the symptoms of prostate cancer.

Obstructive symptoms characteristic of later stages of the disease were much less common in the studied groups than irritative ones (on average, 2 times). And although the incidence rate of these events is not very high, infravesical obstruction is extremely burdensome for patients and requires the earliest possible improvement of symptoms.

The data presented in table 1, clearly demonstrates that the effectiveness of removing organic barriers to

the normal outflow of urine was much higher when using 3D CRT. In 2.9% of cases, a complete improvement of obstructive symptoms was achieved in the control group of patients (where traditional radiation planning was carried out). While the conformal individualized method gave 6.3% of cases of complete improvement of obstructive disorders, which is 2.2 times more than in the control group.

Statistical significance is especially evident when analyzing cases of partial improvement of obstructive symptoms. As a result of applying a conformal individualized method of radiation therapy planning in 15.9% of patients, a weakening of the symptoms of infravesical obstruction was noted. While among the control group of such patients there were only 5.7% of cases, i.e., 2.8 times less.

No less conclusive are the results associated with the need for constant catheterization of the bladder in the late stages of the disease. In the main group, where treatment was planned in an individual conformal way, the possibility of extracting a urinary catheter was 1.8 times higher: the need for catheterization of the bladder in the case of 3D CRT was 9.5% of cases, and in the control group it reached 17.1%. It is also significant that, according to the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$), the demonstrated difference can be considered statistically significant.

This is another convincing argument that allows us to assess the prospects of the proposed method for planning of EBRT. It is the improvement of the methodology for conducting radiation therapy that allows us to talk about obvious advantages, the main of which is achieving control over the symptoms of the disease under study. Recall that it is individual

conformal planning, during which the position of the target volume is strictly and regularly monitored, that allows the minimum displacement of PTV and OAR from session to session.

As a result of using such a technique, the improvement of irritative and obstructive disorders was faster and more pronounced. This was achieved due to the bi-directional process: tumor regression and elimination of paratumor inflammation led to an improvement in urine outflow; the volume of normal tissue adjacent to the tumor and subject to post-radiation changes in organs (urethra and bladder) decreased. Accordingly, the analysis clearly demonstrates the advantages of the innovative method of EBRT planning.

The American Urological Association questionnaire, used to standardize patient symptoms and known as the International Prostate Symptom Score (IPSS), was selected to comprehensively review patients' quality of life as urinary disorder. This questionnaire allows you to evaluate how subjectively severe urination disorders appear to each patient. According to the methodology of the study, patients are asked 7 questions about the various manifestations of dysuria. The severity of symptoms is evaluated by each patient, based on a 6-point scale. The degree of violations on average is:

- 0-8 points - mild disorders;
- 9-19 points - moderate;
- 20 or more points are heavy.

The results of a study of a subjective assessment by patients of the degree of their own disorders during urination are presented in table 2.

Table 2

SUBJECTIVE ASSESSMENT OF PATIENTS WITH PROSTATE DISEASES ACCORDING TO THE IPSS METHODOLOGY (INTERNATIONAL PROSTATE SYMPTOM SCORE) DEPENDING ON THE CHOSEN METHOD OF PRERADIATION TREATMENT PREPARATION FOR RT OF LOCALLY ADVANCED PROSTATE CANCER.

| Treatment protocol/IPSS score | Before treatment | | After treatment | |
|--|------------------|------|-----------------|-------|
| | n | % | n | % |
| Individualized 3D CRT (main group, n=63) | | | | |
| 0-8 | 17 | 26,9 | 8 | 12,7 |
| 9-19 | 15 | 23,8 | 7 | 11,1 |
| ≥20 | 14 | 22,2 | 7 | 11,1 |
| Total | 46 | 73 | 22 | 34,9 |
| Conventional RT (control group, n=35) | | | | |
| 0-8 | 8 | 22,9 | 7 | 20 |
| 9-19 | 9 | 25,7 | 6 | 17,1 |
| ≥20 | 7 | 20 | 5 | 14,3 |
| Total | 24 | 68,6 | 18 | 51,4* |

Note: * - significant differences ($p < 0.05$, CCU).

Analyzing obtained data, it is necessary to emphasize fairly equal conditions in which the patients of the main and control groups were. Almost similar were:

- the frequency of dysuric disorders assessed subjectively (73% in the main and 68.6% in the control group);

- the severity of symptoms of urination disorders (maximum - $\frac{1}{4}$ cases of disorders of varying severity).

Consequently, all patients participating in the study experienced approximately the same degree of subjective discomfort. Such homogeneous initial data allow us to reasonably assume that the main factor that caused the transformation of clinical symptoms during and after treatment can be considered the method of preradiation preparation.

After the end of the radical RT treatment course, a second control assessment was carried out according to the chosen technique. Its results demonstrate the convincing advantages of the irradiation planning methodology developed by us even more. In this case, the most burdensome symptoms of prostate cancer are controlled much more effectively compared to the traditional method of radiation.

Especially evident (and statistically significant, according to the Kruskal-Wallis criterion) are the results associated with the overall frequency of subjectively assessed urination disorders. So, in the main group, as a result of treatment, the frequency of reported disorders decreased by 2.1 times (from 73% to 34.9%, respectively). While in the control group this frequency barely reached 1.3 times (from 68.6% to 51.4%, respectively).

It should be noted that after the end of treatment in the control group, 3-8% of various dysuric disorders were observed more than in the main group.

However, it is worth paying attention to the severity of dysuria before and after treatment in each of the studied groups. So, in the main group, the proportion was more beneficial for the main group:

- for mild disorders - 1.6 / 1;
- for medium violations - 1.5 / 1;
- for severe violations - 1.3 / 1.

Patients with localized prostate cancer usually have several radical treatment options, such as radical prostatectomy, brachytherapy, and 3D CRT. The results of our study provide useful data for understanding the function of urination specifically after the course of 3D CRT. According to the data obtained, it is obvious that radiation therapy, planned on the basis of an individual conformal method that controls the position of the target volume, guarantees much more reliable control over the symptoms of the disease in the study, manifested at different stages of prostate cancer. In the group of patients who underwent preradiation training using the individualized method, the frequency of reported disorders decreased 2.1 times (from 73% to 34.9%, respectively), while in the control group this frequency barely reached 1.3 times (from 68.6% to 51.4%, respectively).

This is explained by a more uniform dose distribution in reduced PTV, while irradiation of surrounding intact organs and tissues (primarily the bladder) is significantly minimized. It is recommended to continue monitoring both groups, including more patients for further results.

References

1. Kulik A, Dąbkowski M. Prostate cancer radiotherapy. *Contemp Oncol (Pozn)* 2011; 15: 317-22.
2. Hoskin PJ, Rojas AM, Ostler PJ, Hughes R, Lowe GJ, Bryant L. Quality of life after radical radiotherapy for prostate cancer: longitudinal study from a randomized trial of external beam radiotherapy alone or in combination with high dose rate brachytherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2013; 25: 321-7.
3. Pawlowski JM, Yang ES, Malcolm AW, Coffey CW, Ding GX. "Reduction of dose delivered to organs at risk in prostate cancer via image-guided radiation therapy," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. vol. 76, no. 3, pp. 924-934, 2010.
4. Fu W, Yang Y, Yue NJ, Heron DE, Huq MS. A cone beam CT-guided online plan modification technique to correct interfractional anatomic changes for prostate cancer IMRT treatment. *Phys Med Biol*. 2009;54(6):1691-1703.
5. Valdagni R, Kattan MW, Rancati T, Yu C, Vavassori V, Fellin G, Cagna E, Gabriele P, Mauro FA, Baccolini M, Bianchi C, Menegotti L, Monti AF, Stasi M, Giganti MO, Fiorino C. Is it time to tailor the prediction of radio-induced toxicity in prostate cancer patients? Building the first set of nomograms for late rectal syndrome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012; 82: 1957–1966.
6. Martinez AA, Gonzalez J, Ye H, Ghilezan M, Shetty S, Kernen K, et al. Dose escalation improves cancer-related events at 10 years for intermediate- and high risk prostate cancer patients treated with hypofractionated high-dose-rate boost and external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79:363–70.
7. Zapatero A, Roch M, Buchser D, et al. Reduced late urinary toxicity with high-dose intensity-modulated radiotherapy using intra-prostate fiducial markers for localized prostate cancer. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:1161–7.
8. Murakami N, Itami J, Okuma K, Hiroshi M, Keiichi N, Tsukasa B, et al. Urethral dose and increment of international prostate symptom score (IPSS) in transperineal permanent interstitial implant (TPI) of prostate cancer. *Strahlenther Onkol*. 2008;184:515–9.
9. Malik R, Jani AB, Liauw SL. External beam radiotherapy for prostate cancer: urinary outcomes for men with high International Prostate Symptom Scores (IPSS). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011; 80: 1080–1086.
10. Schaake W, de Groot M, Krijnen WP, Langendijk JA, van den Bergh AC. Quality of life among prostate cancer patients: A prospective longitudinal population-based study. *Radiother Oncol* 2013; 108: 299-305.

Bashkirova A.D.

PhD student,

assistant professor of Department of Internal Medicine №1,
Kharkiv National Medical University,
Ukraine

ANALYSIS OF PATHOGENETIC RELATIONS BETWEEN CLINICAL AND METABOLIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE ON THE BACKGROUND OF HYPERTENSION

Abstract. The article presents the factor analysis of pathogenetic relationships between metabolic parameters, EL levels and clinical parameters in patients with liver steatosis on the background of hypertension. The study have found that the most significant factor load on the severity of liver steatosis is reproduced by the concentration of insulin, triglycerides, HDL, and proatherogenic hyperdyslipidemia is closely associated with diet and alcohol intake.

Key words: NAFLD, hypertension, endothelial lipase, dyslipidemia

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of abnormal liver function test results in both adults and children [1]. NAFLD in fact covers a histological spectrum ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), advanced fibrosis, and cirrhosis [2]. Simple steatosis without fibrosis or inflammation has a benign clinical course in most but not in all cases without excess mortality [3]. The possible role of NAFLD as an adjunctive risk factor for the development of CV diseases has been debated for a long time, and only recent evidence has demonstrated an existing relationship between these conditions [4]. Insulin resistance is frequently detected in patients with NAFLD, as it is in those without obesity and diabetes [5] An increasing number of patients have been described with normal body mass index (BMI), although these individuals may have central adiposity and occult insulin resistance [6] NAFLD is frequently associated with the components of metabolic syndrome, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM), obesity, hypertension, and dyslipidemia [7]. Several studies have shown that the adoption of a healthy lifestyle, weight loss, and pro-active management of individual components of metabolic syndrome can help to prevent, retard or reverse NAFLD-related liver damage [8].

Endothelial lipase (EL) is a strong determinant of structural and functional properties of high-density lipoprotein (HDL) [9]. EL - a new marker of cardiovascular risk, which is closely associated with dyslipidemia and insulin resistance, and almost has not been studied in the presence of NAFLD [10].

Independently, NAFLD increases the risk of premature cardiovascular disease and associated mortality, so investigation and monitoring of the liver metabolic function and early detection of EL accumulation having great importance.

The purpose of the study was to conduct a factor analysis of pathogenetic relationships between metabolic parameters, EL levels and clinical parameters in patients with liver steatosis on the background of hypertension.

Materials and methods 80 patients have been examined on the basis department of internal medicine

№1 of Kharkiv National Medical University and National Institute of Therapy named by L.T. Malaya of National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

The study has been conducted according to the requirements European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 08.03.1986), Directive of the Council of the European Economic Society for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 24.11.1986) of the Law of Ukraine "About medications", 1996, articles 7,8,12, according to ICH GCP (2008), GLP (2002), according to the requirements and norms, the standard provisions on ethics of the Ministry of Health of Ukraine No. 690 of 23.09.2009. The research was approved by the Ethics Commission of the Kharkiv National Medical University (Protocol No. 7 of 13.09.2016) and conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration.

The patients have been divided into three groups according to the severity of liver steatosis. The first group consisted of 16 patients with hypertension without laboratory or instrumental signs of liver steatosis (hypertension group). Patients who, in addition to hypertension, had signs of steatosis during ultrasound and normal level of transaminases (ALT, AST), formed a group with moderate liver steatosis (MLS, n = 20). Patients with hypertension who, in addition to the echoscopic features of hepatic steatosis had increased level of transaminases, were assigned to the group with severe liver steatosis (group SLS, n = 24). The control group consisted of 20 practically healthy individuals. The patients' ages ranged from 45 to 60 years, with an average age of 52.12 ± 5.24 years. Among them 28 were female (46.66%) and 32 were male (53.33%).

The NAFLD diagnosis was established according to the Protocol № 826 of the Ministry of Health of Ukraine of 6.11.2014, based on the criteria of the American Association for the Study of Liver Diseases [11] and European Recommendations for the Diagnosis and Treatment of NAFLD [12], to be exact, in the presence of ultrasound criteria of liver steatosis and severity of metabolic disorders.

The diagnosis of hypertension was established according to the Protocol No. 384 of the Ministry of

Health of Ukraine dated 24.05.2012, determining the stage and degree of hypertension is according to the clinical guidelines for arterial hypertension (2017) of the European Society for Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC) [13].

To clarify the existing steatosis and confirm its severity, we have calculated and investigated the surrogate coefficients recommended by EASL-EASD-EASO for calculation in this contingent of patients. So for identification of liver steatosis and its severity we have used liver fat index (NAFLD liver fat score), which includes such indicators as the presence of metabolic syndrome and T2DM, serum insulin level, AST and the ratio AST/ALT and is calculated by the formula [14]:

$$\text{NAFLD liver fat score} = -2.89 + 1.18 \times \text{metabolic syndrome (yes=1/no=0)} + 0.45 \times \text{type 2 diabetes (yes=2/no=0)} + 0.15 \times \text{fasting serum Insulin (mU/L)} + 0.04 \times \text{fasting serum AST(U/L)} - 0.94 \times \text{AST/ALT.}$$

The FIB-4 index has been used to identify liver fibrosis, which includes indicators such as AST, ALT, platelet count, and is calculated by the formula [15]:

$$\text{FIB4} = \text{Age (years)} \times \text{AST (IU/L)} / \text{platelet count} (\times 10^9/\text{L}) \times \sqrt{\text{ALT (IU/L)}}$$

The body mass index (BMI) has been accessed for all patients. Measurement of blood pressure (BP) has been performed according to the standard auscultatory method by N.S. Korotkov (office measurement) using a sphygmomanometer No. 31304500 (Erka, Chemnitz, Germany).

For the diagnosis of overweight and obesity we have used BMI, which was determined by the Kettle formula where body weight (in kg) is divided by height (in meters) squared. The results have been interpreted according to WHO recommendations. To diagnose the obesity phenotype, a visual assessment of the localization of fat deposits has been carried out - in the upper, in the lower half of the body, the measurement of WC (in cm), the ratio of WC/HC.

The examination plan also included: complete blood count, urine test, determination of serum glucose, studies of total protein, total bilirubin and its fractions, aminotransferase activity, alkaline phosphatase, thymol test, determination of total cholesterol, triglycerides (TG), high density lipoproteins (HDL), low density lipoproteins (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) and atherogenic coefficient. In order to analyze the carbohydrate metabolism, glucose and fasting insulin levels have been determined. The HOMA index is calculated by the formula: HOMA-IR = (fasting blood insulin (U/ml) x fasting blood glucose (mmol/l)) / 22.5. HOMA-IR values ≥ 2.77 were regarded as presence of insulin resistance.

Serum endothelial lipase (EL) concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay using Aviscera Bioscience INC reagent kit (USA) using a Labline 90 enzyme immunoassay analyser.

For excluding the alcoholic genesis of NAFLD all patients have been interviewed to determine alcohol units. This test has international standardization and allows detecting alcohol abuse by the formula:

$$\text{Alcohol units} = \text{amount (liters)} \times \text{alcoholic strength (\%)} \times 0.789$$

Alcohol abuse was eliminated by less than 14 units per week regardless of gender [16].

In order to monitor the implementation of dietary recommendations, we have used a questionnaire designed by the original questionnaire, which asked patients about the consumption of 15 basic foods that are not recommended for overweight, carbohydrate metabolism disorders and liver steatosis. They are aerated waters, fast food, potatoes, baking, including bread, fried meat, sugar, "yellow" fruits, honey, spices, canned food, semi-finished products, cereals (semolina, millet porridge, corn, white rice, muesli), chocolate, milk products with more than 2.5% fat, smoked foods.

Suggested answers included options for the frequency of use of the products: every day; several times a week; several times a month; several times a year; never and they had a gradation of points from 4 to 0, respectively. Result was scored as: 0-15 points - factor 0: dietary recommendations were followed almost without breakdowns; 15-30 - Coefficient 1: Dietary recommendations were followed with rare disruptions; 30-45 - Coefficient 2: Dietary recommendations were followed with frequent disruptions; 45-60 - Coefficient 3: Dietary recommendations are practically not followed.

The statistical processing of the survey data has been performed using Microsoft Excel and Statistica 7.0 using standard methods of virion statistics. To analyse the association between the features, Pearson parametric and non-parametric Spearman parameter correlation was performed. The relationship was considered statistically significant at $p < 0.05$. In order to establish patterns of grouping of features, cluster and factor analyses have been performed. To identify the dependence of different features, linear and nonlinear (logistic regression) regression analysis (standard and stepwise) have been reproduced with model creation.

Results and discussion. Results of studies are presented in table 1.

There was a significant difference in groups with surrogate coefficient of hepatic steatosis (NAFLD), which also takes into account insulin sensitivity, which significantly (SS effect 27.39; MS effect 13.69; $F = 6.73$; $p = 0.002$) increased from group to groups. The most sensitive and specific for the determination of hepatic fibrosis, the FIB-4 surrogate coefficient increased significantly from group to group. However, diagnostically significant levels were only available in patients with severe steatosis, suggesting disorders that correspond to F1-F2 fibrosis on the METAVIR scale. The severity of liver steatosis is directly associated with overweight and abdominal fat. All hypertension patients had a proatherogenic lipidogram profile and increased EL concentration, but the severity of lipid disorders was exacerbated as steatosis increases and was associated with an increase in insulin resistance. The level of endothelial lipase in patients with steatosis on the background of hypertension was significantly higher than in patients with hypertension without steatosis and significantly higher than the value in the

control group. In addition, an increase in endothelial lipase was the highest in patients with severe steatosis and was associated with metabolic disorders. So in

general EL level can be attributed to independent markers of atherosclerotic process and cardiovascular risk.

Table 1.

ANTHROMETRIC, LABORATORY AND SURROGATE RATIOS INDICATING THE SEVERITY OF LIVER STEATOSIS

| Parameter | Control, n=20 | | Hypertension group, n=16 | | MLS group, n=20 | | SLS group, n=24 | | Significance of difference, P | |
|--------------------------------|------------------|------------|--------------------------------|------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|---|--|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | | | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD | | |
| AST/ALT, U | 0,73 | 0,34 | 0,95 | 0,26 | 1,19 | 0,38 | 1,75 | 0,77 | 12, 23, 13 | |
| ALT, U/L | 18,15 | 7,26 | 22,44 | 6,29 | 24,65 | 7,19 | 62,54 | 40,7 8 | 23, 13 | |
| AST, U/L | 11,45 | 3,78 | 24,56 | 7,84 | 22,90 | 10,1 8 | 38,71 | 20,7 0 | 23, 13 | |
| AP, mmol/l | 1334, 90 | 464, 11 | 1422,5 0 | 302,4 6 | 1457, 13 | 384, 29 | 1834, 06 | 690, 13 | 13, 23 | |
| NAFLD liver fat score | -1,93 | 0,65 | -0,308 | 1,14 | 2,308 | 2,43 | 4,48 | 3,21 | For all groups < 0,001 | |
| Fib-4 | 0,43 | 0,16 | 1,07 | 0,36 | 1,14 | 0,72 | 1,36 | 0,63 | With control - all groups < 0,0001 13, 23 | |
| BMI, kg/m ² | 21,44 | 1,57 | 25,91 | 3,42 | 30,00 | 2,79 | 29,04 | 5,44 | 01, 02, 03, 12 | |
| WC, cm | 75,50 | 6,83 | 79,31 | 8,58 | 98,08 | 10,5 3 | 104,1 0 | 8,67 | 02, 03, 12, 13, 23 | |
| WC/height, U | 0,44 | 0,03 | 0,47 | 0,04 | 0,57 | 0,05 | 0,60 | 0,04 | 01, 02, 03, 12, 13, 23 | |
| SBP, mm Hg | 116,0 0 | 4,17 | 161,56 | 17,77 | 163,8 9 | 17,5 4 | 169,1 7 | 22,2 0 | 01, 02, 03 | |
| DBP, mm Hg | 73,50 | 5,16 | 101,56 | 7,47 | 102,7 8 | 8,26 | 101,4 6 | 9,94 | 01, 02, 03 | |
| Cholesterol, mmol/l | 3,85 | 0,77 | 5,25 | 1,47 | 5,74 | 0,85 | 5,80 | 1,42 | 01, 02, 03 | |
| Triglycerides, mmol/l | 0,92 | 0,16 | 1,13 | 0,38 | 1,70 | 0,83 0,33 | 1,96 | 0,67 0,37 | 12, 13, 23 | |
| HDL, mmol/l | 1,77 | 0,28 | 1,47 | 0,42 | 1,42 | 0,30 | 1,20 | 0,27 | 13, 23 | |
| LDL, mmol/l | 2,36 | 0,46 | 3,45 | 1,41 | 3,34 | 0,85 | 3,75 | 1,25 | | |
| VLDL, mmol/l | 0,38 | 0,05 | 0,56 | 0,16 | 0,70 | 0,40 | 0,92 | 0,31 | 13, 23 | |
| Endothelial lipase, ng / ml | 8,23 | 2,47 | 10,54 | 2,69 | 13,21 | 3,59 | 13,71 | 3,71 | 01, 02, 03, 12, 13 | |
| Diet | 2,36 | 0,81 | 2,57 | 0,53 | 2,64 | 1,15 | 2,08 | 0,86 | | |
| Alcohol units | 4,26 | 2,27 | 4,29 | 1,82 | 6,39 | 2,99 | 6,62 | 2,98 | 02, 03, 12, 13 | |
| Fasting glucose , mmol/l | 4,36 | 0,72 | 5,01 | 0,60 | 6,32 | 1,75 | 5,73 | 0,91 | 12, 13 | |
| Fasting insulin, mU/l | 7,91 | 3,71 | 17,77 | 6,86 | 24,51 | 9,49 | 33,28 | 13,8 2 | 12, 13, 23 | |
| HOMA-IR | 1,55 | 0,85 | 3,61 | 1,80 | 7,02 | 4,76 | 8,35 | 5,25 | 12, 13 | |
| HbA1C, % | - | - | 5,40 | 0,63 | 6,64 | 1,76 | 5,79 | 0,49 | 12, 23, 13 | |

A factor analysis of the model has been carried out, which contained the studied parameters. Analysis of variants with orthogonal rotation of factors, minimizing the number identified 2 main factors of model distribution (Table. 2). Factor 1 included the grouping of factors with the most significant factor

loadings of the following parameters: severity of liver steatosis, concentration of insulin, triglycerides, HDL (negative contribution), VLDL. Significant factor 2 load is associated with cholesterol, LDL, diet (negative contribution) and alcohol consumption (negative contribution).

**FACTOR LOAD OPTION FOR DISTRIBUTION BY MAJOR COMPONENTS BY VARIMAX
NORMALIZED**

| Parameter | Factor - 1 | Factor - 2 |
|-----------------------|------------|------------|
| Insulin 1 | 0,73 | 0,01 |
| HbA1C | 0,24 | 0,08 |
| EL 1 | 0,38 | 0,38 |
| Cholesterol | 0,24 | 0,84 |
| Triglycerides | 0,79 | 0,14 |
| HDL | -0,63 | -0,01 |
| LDL | 0,15 | 0,81 |
| VLDL | 0,69 | 0,06 |
| SAD 1 | 0,36 | -0,02 |
| DAD 1 | 0,26 | -0,12 |
| BMI 1 | 0,19 | 0,07 |
| WC/ height | -0,53 | -0,19 |
| Alcohol units | 0,38 | -0,62 |
| Diet | 0,15 | -0,78 |
| NAFLD liver fat score | 0,77 | 0,02 |
| Expl.Var | 3,32 | 2,55 |
| Prp.Totl | 0,23 | 0,18 |

Using the quartimax method, which minimizes the number of factors needed to explain the variable, it was concluded that blood glucose and triglyceride measurements should at least be obtained to predict

NAFLD severity. To predict proatherogenic hyperlipidemia, one must be aware of diet and alcohol intake (Table 3).

Table 3

**FACTOR LOAD OPTION OF QUARTIMAX NORMALIZED DISTRIBUTION BY MAJOR
COMPONENTS**

| Parameters | Factor - 1 | Factor - 2 |
|-----------------------|------------|------------|
| WC/ height | 0,56 | 0,07 |
| Insulin 1 | 0,72 | 0,01 |
| HbA1C | 0,27 | -0,06 |
| EL 1 | 0,39 | -0,36 |
| Cholesterol | 0,26 | -0,83 |
| TG | 0,74 | -0,14 |
| HDL | -0,61 | -0,01 |
| LDL | 0,18 | -0,79 |
| VLDL | 0,65 | -0,06 |
| SAD 1 | 0,35 | 0,03 |
| DAD 1 | 0,25 | 0,12 |
| BMI 1 | 0,33 | -0,02 |
| Alcohol units | 0,37 | 0,63 |
| Diet | 0,11 | 0,77 |
| NAFLD liver fat score | 0,78 | 0,01 |
| Expl.Var | 3,57 | 2,53 |
| Prp.Totl | 0,24 | 0,17 |

The ratio of factor loadings in factor 1 versus factor 2 is presented in figure 1, showing that blood pressure, BMI and glycated hemoglobin are located in the middle, so they have the least variability, even though they form the model from a clinical point of view (criteria of selection and severity). The location of the EL also has its place in the middle of the system,

although it has a certain distance relative to the named central components. Also significant is the fact that the expressiveness of the factor load of EL in both factors is the same - 0.381, which explains the significant dependence of the parameter on the ratio of other components of the system.

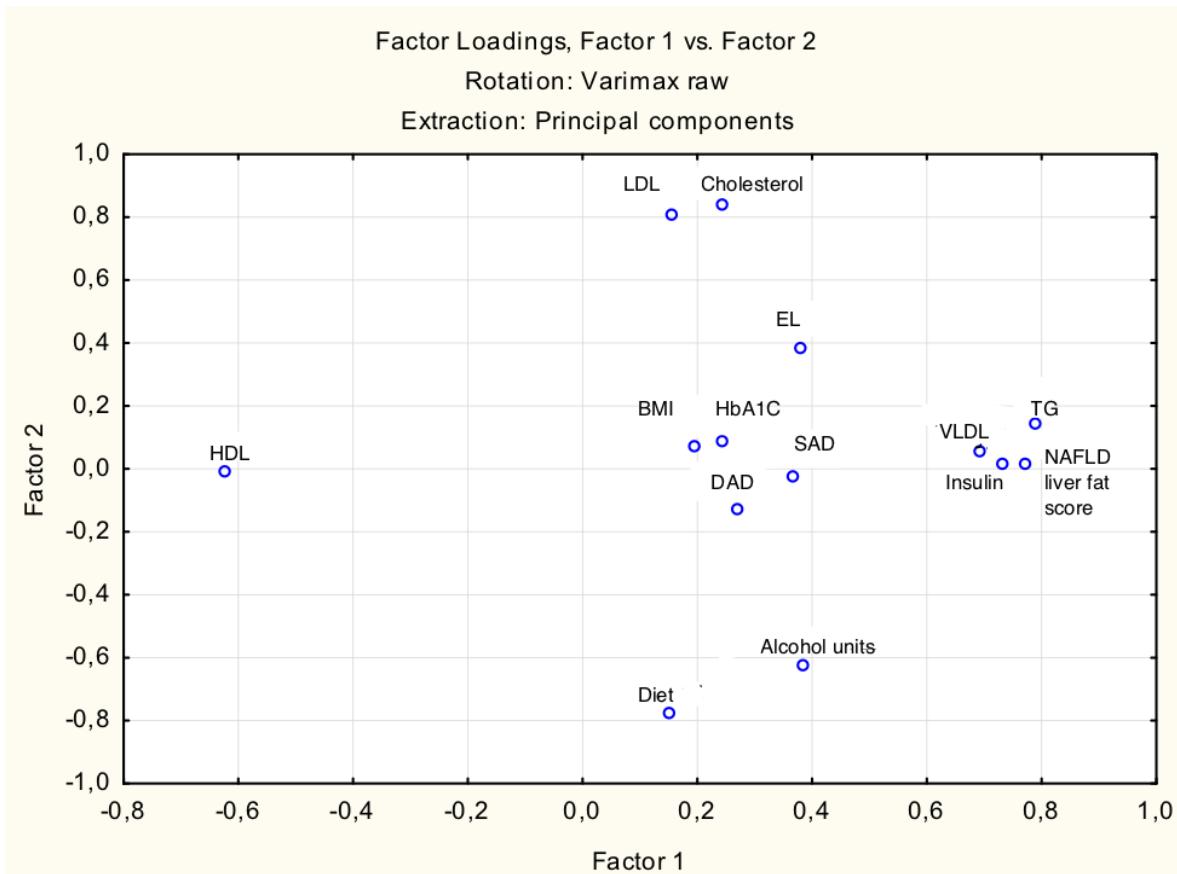


Fig 1. Factor load ratio of model components in factor 1 and factor 2.

Thus, the system itself formed by clinical parameters is variable due to the unstable lipid-carbohydrate ratio between the parameters. Indeed, after selecting the most significant covariable factors, cholesterol levels (-0.98) and LDL (-0.88) remain for

factor 1, insulin levels (-0.88) and steatosis (-0.94), which is presented in table 4. The cumulative percentage of variability for factor 1 is 20.73% (eigenvalue of factor is 2.90), for factor 2 it is 34.96% (eigenvalue of factor is 1.99).

Table 4

THE MOST SIGNIFICANT FACTORS BY THE FACTOR LOAD

| Parameter | Factor - 1 | Factor- 2 |
|-------------|------------|-----------|
| Insulin 1 | -0,281143 | -0,884764 |
| HbA1C | -0,009640 | -0,208619 |
| EL 1 | -0,310367 | -0,195030 |
| Cholesterol | -0,981871 | 0,126769 |
| TG | -0,383178 | -0,324554 |
| HDL | 0,105576 | 0,300576 |
| LDL | -0,883342 | 0,171048 |
| VLDL | -0,275324 | -0,248849 |
| SAD 1 | 0,034232 | -0,053297 |
| DAD 1 | 0,062614 | -0,037207 |
| BMI 1 | -0,094491 | -0,145286 |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Alcohol units | 0,183776 | -0,360396 |
| Diet | 0,395081 | -0,192957 |
| NAFLD liver fat score | -0,309226 | -0,941152 |
| Expl.Var | 2,453105 | 2,245520 |
| Prp.Totl | 0,175222 | 0,160394 |

Conclusions

1. In patients with NAFLD on the background of hypertension additional association between EL and glycemic control and hypertension ($MR = 0.47$; $F(5.44) = 2.56$; $P < 0.05$) forms, so endothelial lipase can be considered as an additional predictor of cardiovascular risk.

2. In the expressiveness of factor load EL depends equally on other metabolic parameters, such as dyslipidemia, insulin resistance and severity of steatosis.

3. The most significant factor load on the severity of liver steatosis is reproduced by the concentration of insulin, triglycerides, HDL (negative contribution). And pro-atherogenic hyperdyslipidemia is tightly linked to diet and alcohol consumption.

References:

1. Estes, C.; Razavi, H.; Loomba, R.; Younossi, Z.; Sanyal, A.J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018, 67, 123–133.
2. Younossi, Z.M.; Koenig, A.B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016, 64, 73–84.
3. Younossi, Z.; Anstee, Q.M.; Marietti, M.; Hardy, T.; Henry, L.; Eslam, M.; George, J.; Bugianesi, E. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 15, 11–20.
4. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver Int* 2006; 26: 856–863.
5. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373–379.
6. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421–427.
7. Estes, C.; Razavi, H.; Loomba, R.; Younossi, Z.; Sanyal, A.J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018, 67, 123–133.
8. Kumari RSP, Vipula VA, Reddy BS, Nagadeepa W, Reddy BLN. Predictors of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in patients with type-2 diabetes mellitus. *Int J Med Sci Public Health* 2017;6:372–376.
9. Schilcher I, Ledinski G, Radulović S, et al. Endothelial lipase increases antioxidative capacity of high-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(10):1363–1374. doi:10.1016/j.bbaply.2019.06.011
10. Junji Kobayashi. Which is the Best Predictor for the Development of Atherosclerosis Among Circulating Lipoprotein Lipase, Hepatic Lipase, and Endothelial Lipase?, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2019, Volume 26, Issue 9: 758–759.
11. Chalasani, N. , Younossi, Z. , Lavine, J. E., Charlton, M. , Cusi, K. , Rinella, M. , Harrison, S. A., Brunt, E. M. and Sanyal, A. J. (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 67: 328–357. doi:10.1002/hep.29367
12. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, Volume 64, Issue 6, 1388 – 1402.
13. Bryan Williams, Giuseppe Mancia, Wilko Spiering et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension, *European Heart Journal*, Volume 39, Issue 33, 01 September 2018: 3021–3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
14. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*, vol. 137, no. 3: 865–872.
15. Sterling, R. K., Lissen, E. , Clumeck, N. , Sola, R. , Correa, M. C., Montaner, J. , S. Sulkowski, M. , Torriani, F. J., Dieterich, D. T., Thomas, D. L., Messinger, D. and Nelson, M. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*, 2006, 43: 1317-1325. doi:10.1002/hep.21178
16. Department of Health. UK Chief Medical Officers' Alcohol Guidelines Review: summary of the proposed new guidelines. London: Department of Health. 2016.

Kravets O.V.

Candidate of Medical Science, Senior Researcher,
National Cancer Institute, Head and Neck Oncology Department,
Kyiv, Ukraine

Cherniienko V.V.

Surgeon,
National Cancer Institute, Head and Neck Oncology Department,
Kyiv, Ukraine

Burtyn O.V.

Surgeon,
National Cancer Institute, Head and Neck Oncology Department,
Kyiv, Ukraine

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF SUBMENTAL ISLET FLAP AND RADIAL FOREARM FREE FLAP FOR TONGUE RECONSTRUCTION AFTER HEMIGLOSSECTOMY

Abstract. The paper presents a comparative analysis of the effectiveness of the use of local submental island flap (SIF) and radial forearm free flap (RFFF) to replace hemiglossectomy defects in cancer patients. It has been shown that RFFF remains the first option of choice for tongue reconstruction after hemiglossectomy. Although the use of RFFF to replace hemiglossectomy defects significantly improves the functional outcome and the quality of life of patients, it can increase the duration of surgery and the incidence of complications in the donor site compared with the use of SIF. There were no statistically significant differences in terms of inpatient treatment, incidence of complications after flap transplantation, complications in the recipient area in patients who underwent surgery to replace hemiglossectomy defects with SIF and RFFF. The 5-year overall and 5-year relapse-free survival rates of patients who underwent surgery to replace hemiglossectomy defects with SIF and RFFF were comparable, which indicates the oncological safety of using local SIF.

Keywords: hemiglossectomy defects, submental island flap, radial forearm free flap.

Introduction. Squamous cell carcinoma of the oral tongue is the most common subsite of all oral malignancies [1]. The patients with early oral tongue cancer require only surgery, while the patients with advanced cancer should complement surgery with subsequent radiation or concomitant chemoradiation therapy [2]. With the development of reconstructive surgery, the approaches to the surgical treatment of tongue malignancies have significantly changed. The primary closure of the tongue defect after hemiglossectomy was modified by reconstruction using local, regional, or free flaps. The restoration of the shape, volume, mobility of the tongue is of crucial importance for achieving the most optimal speech, swallowing, chewing functions and oral hygiene [3, 4].

For many years, radial forearm free flap (RFFF) has been considered as the best choice for plastic replacement of hemiglossectomy defects [3]. In recent years, anterolateral thigh flap for tongue reconstruction has been promoted. However, only a few studies have compared differences in the quality of life of patients with RFFF and anterolateral thigh flap. Thus, the results remain open to objection [5–7]. The use of local and regional flaps, as an alternative to free ones, has recently become more common for the plastic replacement of oral defects after oncologic resections. This is due to a deeper understanding of the features of blood supply to the flaps, the possibilities of preoperative and intraoperative imaging of the vascular pedicle and skin perforators, improvement of the flap harvest [8, 9].

The submental islet flap (SIF) was described by D. Martin et al in 1993 [10]. It has been recognized as a useful local flap for the reconstruction of the floor of mouth, tongue, cheeks, palate and soft facial tissues. The advantages of SIF inherent in RFFF include its reliability, fineness and pliability. It also allows a large surface area to be harvested. In addition, the use of SIF to replace postoperative oral defects avoids the microsurgical stage, and therefore shortens the duration of surgical intervention and achieves functional rehabilitation results comparable to RFFF [11–13].

In general, most studies have evaluated postoperative oral defects as a whole, rather than a specific hemiglossectomy defect, which makes it impossible to determine the benefits of a particular reconstructive technique. In addition, there were usually compared such parameters as the duration of surgery, the duration of hospitalization, postoperative complications, cost of treatment, functional outcome, but there is very few data on comparing the quality of life of patients.

Aim of study: comparison of the effectiveness of the use of SIF and RFFF for plastic replacement of hemiglossectomy defects.

Materials and methods. A retrospective comparative analysis of surgical interventions was performed in 62 patients with oral tongue cancer who underwent treatment at the Head and Neck Oncology Department of the National Cancer Institute between 2008 and 2013. The activities were carried out in accordance with the principles of the Declaration of

Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Institute.

The criteria by which patients were included in the study were oral tongue squamous cell carcinoma without prior radiotherapy or chemoradiation therapy; tongue reconstruction after hemiglossectomy using SIF or RFFF. The exclusion criteria included oral tongue non-squamous cell carcinoma; relapse of the disease after surgical treatment or radiation therapy; squamous cell carcinoma of the root of the tongue; previously performed segmental mandibulectomy.

All the patients underwent surgical treatment, which included hemiglossectomy, neck dissection and tongue reconstruction. Depending on the type of the flap used to replace the hemiglossectomy defect, the patients were divided into two groups. The SIF group included 32 patients, whereas the RFFF group was comprised of 30 patients. The tumor resection was performed with a margin of 1 cm from the visible borders of the tumor. All patients underwent supraomohyoid or comprehensive neck dissection - unilateral or bilateral, depending on the clinical status of the cervical lymph nodes. The SIF was used for the tongue reconstruction in the case of absence of clinical and radiological signs of extranodal spread in level I metastatic lymph nodes. Tumors were staged according to the International Union against Cancer (UICC) 2009 tumor, node, metastasis (TNM) classification. Adjuvant chemoradiation therapy was prescribed for histologically confirmed factors of high risk of recurrence (positive surgical margin where re-resection is not achievable or extracapsular extension in metastatic nodes). The patients with intermediate risk factors for relapse (pT3, pT4, lymphovascular invasion, perineural invasion, metastatic lesion of the cervical lymph nodes, which corresponds to pN2-3, metastatic lesion of the cervical lymph nodes of IV or V level) underwent adjuvant radiotherapy.

Socio-demographic characteristics (age, sex), clinical data (TNM, stage of the disease, type of neck dissection, marginal mandibulectomy, adjuvant treatment) were retrospectively collected from medical records and analyzed. There were compared such

factors as duration of a surgical procedure, duration of the inpatient treatment, postoperative complications, functional status and quality of life of patients. The functional status assessment was conducted according to the Performance Status Scale for Head and Neck Cancer Patients (PSS-HN) in 6 months and 12 months after surgical treatment. The quality of life was assessed by the University of Washington Quality of Life questionnaire, version 4 (UW-QOL v4) in 6 months and 12 months after surgical treatment. The 5-year overall and the 5-year relapse-free survival rates between the groups were compared as well.

The statistical analysis of the results of the study was performed in the package MedCalc v. 18.11 (MedCalc Software bvba, Belgium, 1993-2018).

To represent the quantitative traits, mean value (\bar{X}) and its root-mean-square deviation ($\pm SD$) were calculated, whereas the representation of qualitative traits was achieved via the calculation of their frequency (%). The quantitative trait comparison involved the use of either Student's t-test (in the case of a normal distribution law) or the Wilcoxon signed-rank test (in the case of an abnormal distribution law). The Shapiro-Wilk test was used to check the appropriateness of distribution. The chi-squared test (with Yates's correction) was used to compare qualitative indicators. The Kaplan-Meier estimator served to analyze patient survival rate. To evaluate the clinical effect, its magnitude and 95% probable interval (95% CI) were calculated. The critical level of significance is assumed to be $\alpha_{kp}=0,05$.

Results. A total of 62 patients participated in the study. 32 patients underwent tongue reconstruction using SIF, while 30 patients had reconstruction using RFFF. All 62 (100%) patients started adjuvant radiation or chemoradiation therapy within 6 weeks after the surgical stage of treatment. The characteristics of patients are presented in Table 1. There were no statistically significant differences in age, sex, TNM, stage of the disease, type of neck dissection, previously performed marginal mandibulectomy ($p> 0.05$ for all comparisons; Table 1).

Table 1

CHARACTERISTICS OF PATIENTS

| Index | | Submental flap (n=32) | Free radial flap (n=30) | Significance level of difference, p |
|-------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Age, $\bar{X} \pm SD$, years | | 58.6±11.1 | 55.9±9.3 | 0.31 |
| Sex, n (%) | F | 5 (15.6) | 3 (10) | 0.78 |
| | M | 27 (84.4) | 27 (90) | |
| T, n (%) | T2 | 6 (18.8) | 6 (20) | 0.85 |
| | T3 | 26 (81.2) | 24 (80) | |
| | T4 | — | — | |
| N, n (%) | N0 | 13 (40.6) | 10 (33.3) | 0.44 |
| | N1 | 7 (21.9) | 11 (36.7) | |
| | N2 | 12 (37.5) | 9 (30) | |
| | N3 | — | — | |
| Stage, n (%) | III | 20 (62.5) | 21 (70) | 0.72 |
| | IV | 12 (37.5) | 9 (30) | |
| Neck dissection, n (%) | Supraomohyoid | 13 (40.6) | 10 (33.3) | 0.74 |
| | Comprehensive | 19 (59.4) | 20 (66.7) | |

| | | | | |
|--------------------------------|-------------------|-----------|-----------|------|
| | Unilateral | 17 (53.1) | 13 (43.4) | 0.61 |
| | Bilateral | 15 (46.9) | 17 (56.6) | |
| Marginal mandibulectomy, n (%) | Yes | 4 (12.5) | 5 (16.7) | 0.92 |
| | No | 28 (87.5) | 25 (83.3) | |
| Adjuvant treatment, n (%) | Radiotherapy | 24 (75) | 21 (70) | 0.88 |
| | Chemoradiotherapy | 8 (25) | 9 (30) | |

Having analyzed the duration of surgery, we determined that the average duration of surgery in patients of the SIF group was (6.17 ± 0.30) hours, whereas the average duration of surgery in patients of the RFFF group was (9.14 ± 0.54) hours, ($p < 0.001$). The use of SIF compared to RFFF to replace hemiglossectomy defects reduced the duration of surgery by an average of 3.5 hours (95% BI 3.3 hours - 3.7 hours).

There were no statistically significant differences between the groups in terms of inpatient treatment. The average duration of inpatient treatment of patients in the SIF group was (12.7 ± 1.5) days, while the average duration of inpatient treatment in RFFF group was (13.2 ± 1.7) days ($p = 0.24$).

The analysis of complications after flap transplantation showed the following data. Only one patient of the SIF group developed total skin flap necrosis (3.1%) and two patients of the group had partial skin flap necrosis (6.3%). The patients of this group did not have any marginal flap necrosis. One patient (3.3%) of the RFFF group developed total skin flap necrosis, but no one of the patients in this group had partial or marginal skin flap necrosis. Thus, the incidence of complications after flap transplantation in the SIF group of patients was 9.4%, while the same indicator in patients of the RFFF group was 3.3%, ($p = 0.65$).

The complications in the recipient area are as follows. Both groups of patients did not have any postoperative wound dehiscence and the formation of orostomas. Two (6.3%) patients of the SIF group developed salivary fistula, one (3.1%) had a hematoma

in the area of the postoperative wound and one (3.1%) had infectious complications. In the RFFF group, three (10%) patients developed a hematoma in the area of the postoperative wound and one (3.3%) had infectious complications. The patients of this group did not have any salivary fistula. In general, the incidence of complications in the recipient area in patients of the SIF group was 12.5%, while the same indicator in patients of the RFFF group was 13.3%, ($p = 0.78$).

The complications in the donor site are listed below. Two patients (6.3%) of the SIF group had wound dehiscence that did not require additional surgery. The patients did not have any other complications, including lesions of the marginal mandibular branch of the facial nerve. Three patients (10%) of the RFFF group developed partial skin graft necrosis, which was replaced by a defect of the donor area. Moreover, seven patients (23.3%) felt numbness of the fingers and tissues of the dorsal surface of the wrist, two patients (6.7%) had hypertrophic scars. Thus, the incidence of complications in the donor site in patients of the SIF group was 6.3%, while the same indicator in patients of the RFFF group reached 40%, ($p = 0.004$).

Functional status assessment was completed according to the PSS-HN scale. The indicator of the normalcy of diet in patients of the RFFF group in 6 months and in 12 months ($p = 0.03$ and $p = 0.04$, respectively) was significantly increased. There were not found any statistically significant differences in other indicators of the scale between the groups of patients in 6 months and 12 months after surgical treatment ($p > 0.05$ for all comparisons; Table 2).

Table 2

FUNCTIONAL STATUS OF PATIENTS IN 6 AND 12 MONTHS AFTER SURGICAL INTERVENTION.

| Functional status according to the PSS-HN scale, % | $\bar{X} \pm SD$ | | | | Significance level of difference between groups, p | |
|--|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|--|--------------|
| | SIF group | | RFFF group | | | |
| | in 6 months, (n=32) | in 12 months, (n=27) | in 6 months, (n=30) | in 12 months, (n=27) | in 6 months | in 12 months |
| Normalcy of diet | 78.8±9.4 | 80.4±8.1 | 83.7±9.6 | 85.6±9.3 | 0.04 | 0.03 |
| Public eating | 77.3±14.7 | 77.8±16 | 80.8±14.2 | 81.5±13.1 | 0.35 | 0.36 |
| Understandability of Speech | 85.2±12.5 | 86.1±12.7 | 87.5±12.7 | 88.9±12.7 | 0.46 | 0.42 |

The quality of life of patients was evaluated using the UW-QOL v4 questionnaire. The RFFF group showed significantly higher indices of swallowing and chewing in 6 and 12 months ($p = 0.045$ and $p = 0.04$, respectively). There were not found any statistically

significant differences in other indicators of the questionnaire between the groups of patients in 6 and 12 months after surgical treatment ($p > 0.05$ for all comparisons; Table 3).

THE QUALITY OF LIFE OF PATIENTS IN 6 AND 12 MONTHS FOLLOWING THE SURGICAL INTERVENTION.

| Quality of life according to the questionnaire UW-QOL v4, % | $\bar{X} \pm SD$ | | | | Significance level of difference between groups, p | |
|---|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--|---------------|
| | SIF group | | FRFF group | | | |
| | in 6 months, (n=32) | in 12 months, (n=27) | in 6 months, (n=30) | in 6 months, (n=27) | in 6 months | in 12 months. |
| Pain | 89.1±12.6 | 89.8±12.5 | 90.8±12.3 | 92.6±11.6 | 0.57 | 0.4 |
| Appearance | 86.7±14.2 | 86.1±14.4 | 83.3±13.7 | 82.4±13.5 | 0.34 | 0.34 |
| Activity | 75.8±17.4 | 80.6±16 | 79.2±14.8 | 81.5±11.2 | 0.41 | 0.95 |
| Recreation | 80.5±16.5 | 85.2±14.3 | 82.5±13.4 | 81.5±11.2 | 0.6 | 0.24 |
| Swallowing | 72.5±18.3 | 69.6±23.6 | 81.7±11.2 | 83.3±12 | 0.04 | 0.03 |
| Chewing | 61.8±31.5 | 62.2±30.2 | 77.5±24.9 | 78.7±24.7 | 0.045 | 0.04 |
| Speech | 76.6±12.6 | 80±14.4 | 82±14.9 | 85.6±15.3 | 0.12 | 0.17 |
| Shoulder function | 72.2±22.7 | 70.7±21.3 | 75±20.5 | 69.6±20.5 | 0.61 | 0.81 |
| Taste | 65.9±14.8 | 72.6±17 | 62±16.3 | 74.4±10.9 | 0.31 | 0.81 |
| Saliva production | 53.8±20 | 61.1±16.9 | 50.3±22 | 64.1±14.5 | 0.56 | 0.49 |
| Mood | 72.8±20.1 | 76.9±16.9 | 70.8±21.9 | 75.9±17.7 | 0.71 | 0.84 |
| Anxiety | 75.6±20.3 | 78.5±17.3 | 74±19.9 | 76.3±16.2 | 0.75 | 0.63 |
| Global Questions A | 61.7±14.2 | 63±12.7 | 63.3±14.3 | 64.8±12.5 | 0.66 | 0.59 |
| B | 66.9±20.1 | 68.1±20.2 | 68.7±18.7 | 69.6±18.7 | 0.72 | 0.78 |
| C | 68.8±17.6 | 69.6±17.9 | 70.7±18 | 71.1±17.8 | 0.67 | 0.76 |

Note:

A – Health-related QOL compared to month before you had cancer?

B – Health-related QOL during the past 7 days?

C – Overall QOL during the past 7 days?

The 5-year overall survival rate of patients in the SIF group was $70.1 \pm 8.2\%$, while the same indicator in the RFFF group was $70.0 \pm 8.4\%$; 5-year relapse-free survival rate of patients in the SIF group was $67.5 \pm 8.5\%$, while the same indicator in the RFFF group was $66.7 \pm 8.6\%$. The comparison of the curves of overall

and relapse-free survival rates between the groups did not show any statistically significant differences ($p = 0.83$ and $p = 0.93$, respectively). The curves of overall and relapse-free survival rates for groups of patients are presented in Figures 1, 2. (Fig.1,2)

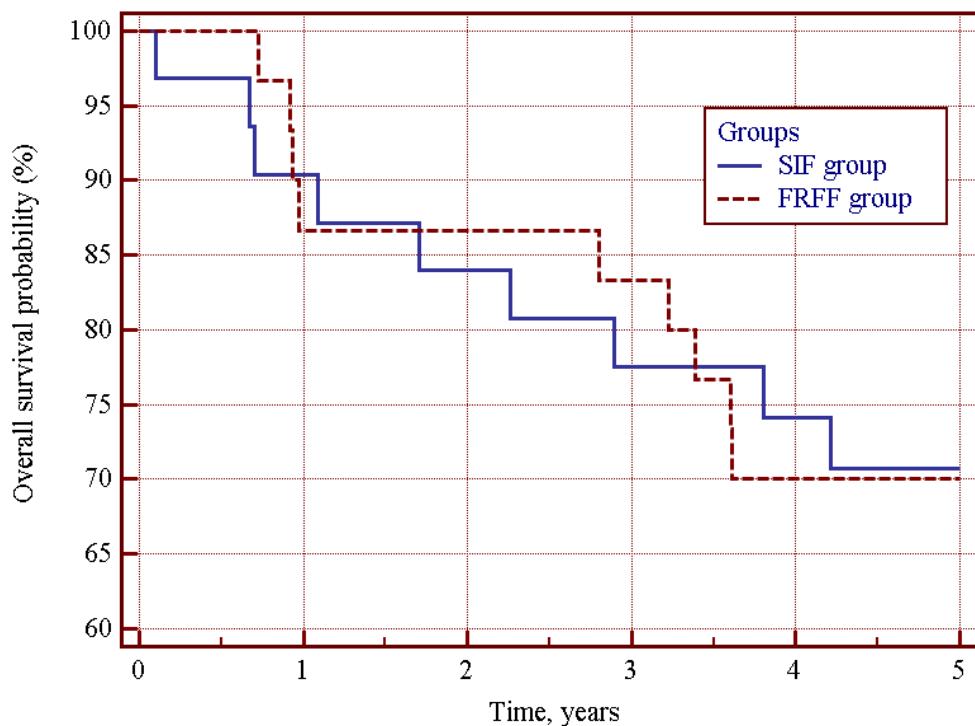


Fig. 1. Overall survival curves of SIF and RFFF patient groups

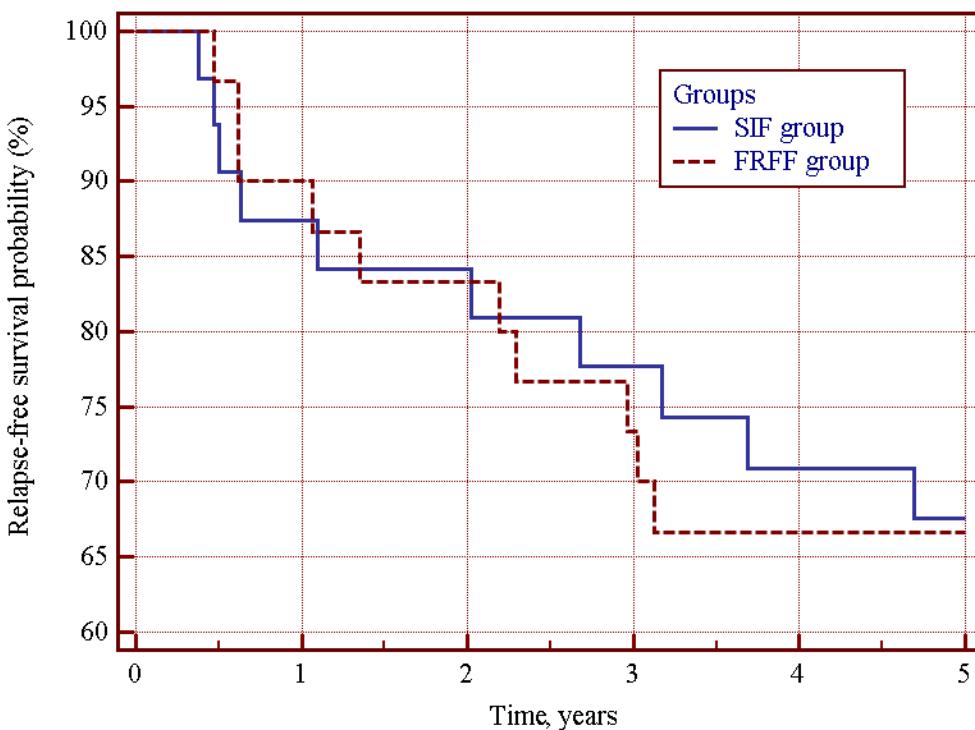


Fig. 2. Relapse-free survival curves of SIF and RFFF patient groups

Discussion. In recent years, there has been a renewed interest in local and regional flaps for the replacement of postoperative oral defects. J. Paydarfar and co-authors conducted the first direct comparison of the results of the use of SIF and RFFF to replace defects of the floor of the mouth and tongue. The authors note that the use of SIF provides a reduction in the duration of surgery and the duration of inpatient treatment with

comparable functional speech and swallowing results [12]. D. Forner and co-authors conducted a comparative analysis of the results of the use of SIF against RFFF when replacing only hemiglossectomy defects, which showed that the use of SIF reduces the duration of surgery and reduces the cost of treatment at comparable terms of inpatient treatment [14]. P. Sittitrai and co-authors compared the complications

and functional outcome in patients with tongue cancer after reconstruction using SIF and RFFF. The study included patients with hemiglossectomy, subtotal glossectomy and near-total glossectomy defects. The reconstruction using RFFF resulted in a significantly higher incidence of donor site complications. The SIF group was characterized by a significantly shorter duration of surgery and duration of inpatient treatment. Speech and swallowing function, frequency of complications after flap transplantation, frequency of complications in the recipient area and locoregional control were comparable between the groups [15].

In our study we made a comparative analysis of the effectiveness of the use of SIF and RFFF for plastic replacement of only hemiglossectomy defects. It was found that the use of SIF contributes to the shorter duration of surgery. In addition, our analysis showed a significantly lower incidence of donor site complications when using SIF compared to RFFF. There were no statistically significant differences in terms of inpatient treatment, incidence of complications after flap transplantation, complications in the recipient site. Also, there were not found any statistically significant differences between the 5-year overall and the 5-year relapse-free survival rates between the groups, which indicates the oncological safety of SIF use. However, our study found that the use of RFFF to replace hemiglossectomy defects significantly improves the functional outcome of the normalcy of diet and the quality of life of patients in terms of swallowing and chewing compared to the use of SIF. As no comparisons of quality of patients' life with SIF and RFFF use have been made before, we are unable to compare our findings with other studies, so further accumulation of experience is needed to understand the benefits of a particular flap after hemiglossectomy.

Many studies have already noted partial or total skin graft necrosis, affected sensitivity of the tissues of the forearm and hand, tendon ruptures and cosmetic deformation of the donor site [16]. The techniques for the replacement of the defect of the donor site of the forearm aimed at reducing the frequency of complications and improving the cosmetic result require further improvement. Therefore, in our opinion, local SIF can be considered to replace hemiglossectomy defects in patients who are not candidates for microsurgical reconstruction using RFFF.

Conclusions. RFFF remains the first choice of option for tongue reconstruction after hemiglossectomy. The local SIF can be used to replace hemiglossectomy defects in patients who are not candidates for microsurgical reconstruction.

The use of RFFF to replace hemiglossectomy defects significantly improves the functional outcome and the quality of life of patients, but increases the duration of surgery and the incidence of complications in the donor site compared with the use of SIF.

There were not found any statistically significant differences in terms of inpatient treatment, incidence of complications after flap transplantation, complications

in the recipient area in patients who had hemiglossectomy defects replaced by SIF and RFFF.

There were not found any significant differences between the 5-year overall and 5-year relapse-free survival rates of patients with hemiglossectomy defects replaced by SIF and RFFF, which indicates the oncologic safety of using local SIF.

References:

1. Cancer in Ukraine, 2016–2017. Incidence, mortality, indicators of the oncological service. Bull Nat Cancer Reg of Ukraine 2018; (19): 136.
2. D'Cruz AK, Vaish R, Dhar H. Oral cancer: Current status. *Oral Oncol.* 2018 Dec; 87: 64-9.
3. Lam L, Samman N. Speech and swallowing following tongue cancer surgery and free flap reconstruction – A systematic review. *Oral Oncol* 2013; 49 (6): 507–24.
4. Bokhari WA, Wang SJ. Tongue reconstruction: recent advances. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15: 202–7.
5. Tarsitano A, Vietti MV, Cipriani R, Marchetti C. Functional results of microvascular reconstruction after hemiglossectomy: free anterolateral thigh flap versus free forearm flap. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2013; 33(6): 374-9.
6. Yuan Y, Zhang P, He W, Li W. Comparison of oral function: free anterolateral thigh perforator flaps versus vascularized free forearm flap for reconstruction in patients undergoing glossectomy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Jul; 74(7): 1500.e1-6.
7. Zhang PP, Meng L, Shen J, Liu H, Zhang J, Xiang X, Yan YB. Free radial forearm flap and anterolateral thigh flap for reconstruction of hemiglossectomy defects: A comparison of quality of life. *J Craniomaxillofac Surg* 2018 Dec; 46(12): 2157-63.
8. Patel UA, Hartig GK, Hanasono MM, Lin DT, Richmon JD. Locoregional flaps for oral cavity reconstruction: a review of modern options. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017 Aug; 157(2): 201-9.
9. R. Mahieu, G. Colletti, P. Bonomo, G. Parrinello, A. Iavarone, G. Dolivet, A. Deganello. Head and neck reconstruction with pedicled flaps in the free flap era. *Acta Otorhinolaryngol Ital Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2016 Dec; 36(6): 459–68.
10. Martin D, Pascal JF, Baudet J, Mondie JM, Farhat JB, Athoum A, Le Gaillard P, Peri G. The submental island flap: a new donor site: anatomy and clinical applications as a free or pedicled flap. *Plast Reconstr Surg* 1993; 92(5): 867-73.
11. Sebastian P, Thomas S, Varghese BT, Iype EM, Balagopal PG, Mathew PC. The submental island flap for reconstruction of intraoral defects in oral cancer patients. *Oral Oncol* 2008; 44(11): 1014-8.
12. Paydarfar JA, Patel UA. Submental island pedicled flap vs radial forearm free flap for oral reconstruction: Comparison of outcomes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 137: 82–7.
13. Sittitrai P, Srivanitchapoom C, Reunmakaew D, Yata K. Submental island flap reconstruction in oral

cavity cancer patients with level I lymph node metastasis. Br J Oral Maxillofac Surg 2017; 55: 251–5.

14. Forner D, Phillips T, Rigby M, R. Hart, M. Taylor, J. Trites Submental island flap reconstruction reduces cost in oral cancer reconstruction compared to radial forearm free flap reconstruction: a case series and cost analysis. J Otolaryngol Head Neck Surg 2016; 45: 11.

15. Sittitrai P, Reunmakaew D, Srivanitchapoom C. Submental island flap versus radial forearm free flap for oral tongue reconstruction: a comparison of complications and functional outcomes. J Laryngol Otol 2019; 133(5): 413-8.

16. Yun T.K, Yoon E.S, Ahn D.S, Park S.H, Lee B.I, Kim H.S, You H.J. Stabilizing morbidity and predicting the aesthetic results of radial forearm free flap donor sites. Arch. Plast. Surg 2015; 42: 769–75.

УДК 616.89-008; 811.161.11

**Исаэль (Владимир Модестович) Дацковский
Ph.D**

Кабинет клинической психологии и патопсихологии,
г. Бейт Шемеш, Израиль

К ВОПРОСУ ОБ УТОЧНЕНИИ ТЕРМИНОВ "СИНДРОМ", "СИМПТОМОКОМПЛЕКС" И ДРУГИХ БАЗОВЫХ ТЕРМИНОВ В ПСИХИАТРИИ

Israel (Vladimir Modestovich) Datskovsky

Ph.D.,

Clinical Psychology and Pathopsychology Cabinet,
Beit Shemesh, Israel

TO THE QUESTION OF REFINING THE TERMS "SYNDROME", "SYMPTOMOCOMPLEX" AND OTHER BASIC TERMS IN PSYCHIATRY

Annotation. The fuzziness of many definitions of basic medical terms and the ambiguity of their understanding in their practical mass use are considered. The next attempt was made to determine the basic terms of the symptom, phenomenon, syndrome and symptomatic complex as clearly and unambiguously as possible. One of the overly broad definitions of the symptomatic complex is replaced by the concept of "set of symptoms". For the purpose of creating a one-to-one correspondence between the clinical diagnosis and its symptomatic justification, the concepts of the diagnostic complex of symptoms (diacomplex) and the preliminary diagnostic complex of symptoms (prediacomplex) are introduced and defined. The "extra" terms of the presindroma and presymptomatic complex are also proposed and explained.

Аннотация. Рассмотрена нечеткость множества определений базовых медицинских терминов и неоднозначность их понимания при их практическом массовом использовании. Выполнена очередная попытка как можно четче и однозначней определить базовые термины симптома, феномена, синдрома и симптомокомплекса. Одно из излишне широких определений симптомокомплекса заменено понятием "комплект симптомов". Для целей создания взаимно-однозначного соответствия между клиническим диагнозом и его симптоматическим обоснованием введены и определены понятия диагностического комплекса симптомов (диакомплекса) и предварительного диагностического комплекса симптомов (предиакомплекса). Также предложены и объяснены "лишние" термины пресиндрома и пресимптомокомплекса.

Key words: symptom, phenomenon, syndrome, symptomatic complex, set of symptoms, diacomplex, prediacomplex, presyndrome, presymptomatic complex.

Ключевые слова: симптом, феномен, синдром, симптомокомплекс, комплекс симптомов, диакомплекс, предиакомплекс, пресиндром, пресимптомокомплекс.

Введение

Занимаясь терминами, сначала воспользуемся приведенным в Википедии определением самого понятия "термин" (статья "Термин", URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Термин> (дата обращения 30.08.2019)): "Тéрмин (греч. ὡρος, лат. *terminus* - предел, граница) - слово или словосочетание, являющееся названием некоторого понятия какой-нибудь области науки, техники, искусства и так далее. Термины служат специализирующими, точными [подчеркнуто нами – И.Д.] обозначениями, характерными для этой сферы предметов, явлений, их свойств и

взаимодействий. В отличие от слов общей лексики, которые зачастую многозначны и несут эмоциональную окраску, термины в пределах сферы применения однозначны [подчеркнуто нами – И.Д.] и лишены экспрессии". Термин одним-двумя словами фиксирует явление или понятие, описываемое многими словами.

В медицинской и общей литературе содержатся десятки достаточно различных определений базовых медицинских терминов, таких как симптом, феномен, синдром и подобные медицинские термины. Именно множественность определений привела к тому, что во многих случаях

использование некоторыми людьми и понимание этого использования другими людьми этих столь привычных терминов затруднено из-за явной неоднозначности этих терминов, из-за их использования в различных значениях. То есть, часть терминов потеряла (или не приобрела) необходимых для термина свойств однозначности и точности описания обозначаемого явления, точного и однозначного обозначения смысла того явления, которое обозначается тем или иным термином. Поэтому мы видим необходимость уточнить или даже переопределить некоторые термины с учетом особенностей психиатрии, ее феноменологического подхода, а пару-тройку новых терминов даже предложить, определить и, возможно, ввести в медицинский оборот. В этой работе мы пытаемся находиться в пределах медицинской сферы знаний и даже не пытаемся прикоснуться к филологической стороне вопроса.

Понятия симптома и феномена, в первую очередь для нужд психиатрии.

Сначала – определения симптома:

Симптом (от др.-греч. σύμπτωμα - «случайность, несчастная случайность, приступ болезни») — один из отдельных признаков, частое проявление какого-либо заболевания, патологического состояния или нарушения какого-либо процесса жизнедеятельности. (Википедия, статья "Симптом", URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Симптом> (дата обращения 30.08.2019)). Это весьма общее определение, мало что говорящее психиатру.

"Симптом – это некий повторяющийся у разных больных феномен, указывающий на патологию, болезненное отступление от естественного течения психических [подчеркнуто нами – И.Д.] процессов, ведущее к дезадаптации" (Жариков Н.М., Тюльпин Ю.Г., 2009, с. 99). Это определение устанавливает тождество между симптомом и феноменом в психиатрии.

У феномена может быть несколько иное определение: по мнению В.Д. Менделевича (2017, с. 72) феномен лежит в основе наиболее принятого в психиатрии феноменологического подхода. "Феноменом можно обозначить любое индивидуальное целостное психическое переживание" [не только болезненное! Очень расширительное определение. Оно, несомненно, верное, психология занимается всем спектром феноменов психики человека, но нас в вопросах психиатрической диагностики интересует именно болезненное отступление от нормальных психических процессов – И.Д.].

Так как психиатрия плотно стоит на основе феноменологического подхода к описанию психического состояния пациентов и диагностике этого состояния, разделим в психиатрии понятия симптома и феномена. К симптомам (по вышеупомянутому определению Википедии) отнесем только соматические болезненные проявления (например, в психиатрии симптомом будут клонические судороги при эпилептическом

припадке, но, естественно, не будут симптомом действия при истерическом приступе или при выполнении императивных указаний галлюцинаторных "голосов"). А к феноменам отнесем только психические проявления по приведенному выше определению Н.М. Жарикова и Ю.Г. Тюльпина. Для диагностики в психиатрии определение феномена В.Д. Менделевичем, включающее и психические переживания здорового человека, представляется нам слишком широким, а потому не актуальным для диагностики в психиатрии.

Синдром и симптомокомплекс.

Необходимость уточнения определений понятий синдрома и симптомокомплекса связана в первую очередь с путаницей в понятии синдрома. С одной стороны, многие авторы (например, Жмуров В.А. Психопатология. Ч. II, гл. 2) выделяют группы симптомов в те или иные синдромы или симптомокомплексы без четкого разделения этих понятий и чаще всего без связи этих комплексов с диагнозами, например, астенический синдром, ряд невротических синдромов (обессиально-фобический, синдром невротической депрессии, ипохондрический синдром и вдруг – истерический симптомокомплекс). Там же В.А. Жмуров пишет, что "нервная анорексия ... в качестве синдрома [Н.В.! – И.Д.] чаще встречается при шизофрении, истерическом неврозе", т.е. нет даже попытки установить взаимно-однозначное соответствие между синдромом и диагнозом (что, скорее всего, невозможно, так как чаще всего психиатрический диагноз устанавливается на базе более сложного комплекта синдромов, симптомокомплексов, симптомов и проч.) или хотя бы объявить синдром необходимой частью диагноза и хоть как-то разделить понятия синдрома и симптомокомплекса (а нервная анорексия не является облигатным симптомом шизофрении и лишь иногда при ней встречается, то есть, является для шизофрении в лучшем случае факультативным симптомом (синдромом?)).

С другой стороны, диагностика психических и поведенческих расстройств в МКБ-10 (Класс V, глава F) целиком построена на сочетании симптомов, которые иногда в силу сложности и комплексности могут быть названы симптомокомплексами (а не стоит строго на базе синдромов или симптомокомплексов) и только сам нозологический диагноз постфактум "заявляет" о синдроме или, скорее, о симптомокомплексе (ниже мы увидим, что здесь как термин "синдром", так и термин "симптомокомплекс" употреблены в нестрогом понятии) как том или ином наборе симптомов, приведших к установлению данного диагноза (без ссылок на единый механизм, единые этиологии или патогенез). При этом, так как для установления диагноза иногда необходимо присутствие у пациента не всех симптомов, а, например, трех из списка, включающего шесть симптомов, то к данному диагнозу может однозначно привести довольно длинный ряд

комплектов симптомов, набранных из шести приведенных в МКБ-10. Поэтому мы сочли необходимым попытаться уточнить или переопределить основные термины для создания более четкого языка описания состояния пациента.

С понятием синдрома в психиатрии дело обстоит достаточно сложно. Прежде, чем привести определения, укажем на две особенности психиатрии. Сначала – цитата из А.С. Тиганова (1999, введение): "Этиология большинства психических болезней остается в значительной мере неизвестной". Добавим, что сегодня относительно уверенно можно говорить об этиологии только прогрессивного паралича, психиатрических следствий органического поражения мозга (травма, интоксикация, внутричерепные опухоли, анатомическое или функциональное недоразвитие), психиатрических следствий соматических заболеваний (не интоксикации, а психические сдвиги как следствие тяжелых или неизлечимых (иногда – только в понятиях пациента) соматических заболеваний – соматопсихика, в отличие от психосоматики, при которой первичным звеном являются психические проблемы, а вторичным – соматические страдания ипохондрического, функционального, а иногда и органического регистра), и иногда – психиатрических следствий психотравмирующей обстановки (развитие невроза до уровня психоза).

Добавим цитату из Н.М. Жарикова и Ю.Г. Тюльпина (2009, с. 100): "В психиатрии практически не существует патогномоничных симптомов".

Теперь на этой базе перейдем к определениям синдрома. Сначала – цитаты:

Жариков Н.М., Тюльпин Ю.Г. (2009, с. 102): "Синдромом называют повторяющееся сочетание симптомов, тесно связанных между собой общими механизмами происхождения [элегантный обход понятий этиологии и патогномоничности – И.Д.] и характеризующих текущее состояние больного". Нам бы еще убедиться в общности механизмов группы симптомов!

В.А. Жмуро, Психопатология. Ч. II, гл. 1: "Синдром («совместный бег» симптомов) – совокупность симптомов, имеющих общий механизм развития... Патологические явления имеют системный характер и выражаются в форме синдромов".

Википедия, статья "Синдром", URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Синдром> (дата обращения 30.08.2019): "Синдром (др.-греч. συνδρομή «стечение, скопление»; от συν- «с-, со-» + δρόμος «бег, движение») – совокупность симптомов с общими этиологией и патогенезом" (С оговорками может подходить соматической медицине, но об отсутствии определенности этиологии и патогенеза в психиатрии см. цитаты чуть выше).

Во всех трех определениях нет отношения понятия синдрома к понятию диагноза.

Для введения четкого, хотя и не лишенного подводных камней определения синдрома добавим еще одно понятие, заимствованное у Н.М. Жарикова и Ю.Г. Тюльпина (2009, с. 101): "... в психиатрии используются некоторые внеспиритомные и надсиндромные характеристики (качества)... Так, одним из важнейших признаков шизофrenии является расщепление (схизис)... Другое надсиндромное свойство пароксизмальность указывает на родство симптома с эпилепсией [или, возможно, с истерией – И.Д.]. При истерии симптомы тоже наделены общими свойствами ... - как проявление демонстративности".

Определим синдром, несколько изменив приведенное выше определение Н.М. Жарикова и Ю.Г. Тюльпина (2009, с. 102): *Синдромом называется повторяющееся сочетание симптомов, тесно связанных между собой общими механизмами происхождения и характеризующих один из аспектов текущего состояния больного.*

Теперь займемся симптомокомплексом. Также сначала начнем с цитат:

На сайте "Словари и энциклопедии на Академике" в статье Симптомокомплекс, URL: <https://dic.academic.ru/dic.nsf/medic2/43117> (дата обращения 30.08.2019), приведен ряд определений из разных словарей:

"Симптомокомплекс – это (1) ряд симптомов, которые наблюдаются у больного в какой-то период времени; (2) совокупность симптомов определенного расстройства; (3) совокупность симптомов настоящего расстройства на момент исследования пациента (от греч. *symptoma* – случай, совпадение и лат. *complexus* – связь, сочетание)".

Методическая разработка Гомельского медуниверситета (дата обращения 01.08.2019): "Симптомокомплекс – это группа симптомов или синдромов, характерных для заболевания, но не объединенных общим происхождением".

В.А. Жмуро, Психопатология. Ч. II, гл. 1: "Под симптомокомплексом чаще понимают совокупность симптомов, свойственных данному заболеванию". Широкое определение, мало отличимое от его же определения синдрома, при этом остается неясным отношение симптомокомплекса к синдрому и диагнозу в психиатрии и может произвольно включать в себя индивидуальную (не общую) симптоматику, относящуюся к данной болезни, но проявляемую лишь иногда при каждом заболевании. В этом же абзаце имеется еще более широкое и еще менее дифференцированное определение: "В другой интерпретации симптомокомплекс – это сумма всех нарушений, выявляющихся у пациента на момент исследования". Это определение мы вообще выведем из понятия симптомокомплекса и обозначим его понятием "комплект симптомов".

Разница между комплексом и комплектом заключается в том, что термин "комплекс" описывает, пусть и, возможно, разнородный набор

элементов, но тех, которые все вместе служат некоторой общей цели или описывают некоторое явление, и нехватка даже одного из элементов может помешать всему комплексу служить заданной ему цели (см. статью "Комплекс" в Википедии URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Комплекс> (дата обращения 30.08.2019): "Комплекс (лат. *complex* - связь, сочетание; лат. *complexus* - соединение) - система, совокупность чего-либо, объединённого вместе, имеющего общее предназначение, и отвечающего какой-либо определённой общей цели". Также см. статью "Комплекс" в Викисловаре URL: <https://ru.wiktionary.org/wiki/комплекс> (дата обращения 30.08.2019): "Комплекс - сочетание, совокупность объектов, предметов, явлений или свойств, связанных между собой и образующих единое целое".

А термин "комплект" подразумевает более механический набор элементов, хотя и их полный набор в точности в соответствии с приведенным чуть выше вторым определением симптомокомплекса В.А. Жмуровым (см. статью "Комплект" в Викисловаре, URL: <https://ru.wiktionary.org/wiki/Комплект> (дата обращения 30.08.2019)): "Комплект - полный набор каких-либо предметов, имеющих определённое назначение. Пример: "В библиотеке Ф. А. Толстого был полный комплект газеты «Ведомости» (1703-27)".

Некоторые источники просто уравнивают понятия синдрома и симптомокомплекса, что, с нашей точки зрения, является несколько излишним огрублением.

На основании приведенных мнений и разъяснений теперь возможно дать определение симптомокомплекса, отличающееся от определения синдрома только наличием частицы "не":

Симптомокомплексом называется повторяющееся сочетание симптомов, не связанных между собой общими механизмами происхождения (или при неизвестности общности механизмов происхождения симптомов) и характеризующих один из аспектов текущего состояния больного.

Несмотря на то, что диагностика в психиатрии во многом основана на феноменологическом подходе, а чуть выше мы разделили признаки болезни на соматические симптомы и психиатрические феномены, мы НЕ будем чрезмерно и без необходимости увеличивать набор терминов и НЕ будем рекомендовать к использованию термин "феноменокомплекс", хотя его определение легко построить из определений симптомокомплекса и феномена.

Диагностический комплекс симптомов, диакомплекс.

Целью исследования пациента является установление диагноза, так как назначение лечения достаточно однозначно зависит от установленного

клинического диагноза. Н.Г. Незнанов (2016, с. 16) указывает: "Нозологическое направление в классификации психических заболеваний, возникшее более столетия назад и основанное преимущественно на работах Э. Крепелина, до настоящего времени не превалирует над синдромологическим. МКБ-10, по сравнению с предыдущими версиями, носит эклектический характер, используя для разграничения болезней и этиологический, и нозологический, и синдромологический, и даже симптоматический уровни. Такая разноплановость в классификации объясняется несколькими причинами:

...
отсутствием специфичности
психопатологических синдромов;
недостаточной изученностью
патогенетических механизмов психических
заболеваний;

..."

То есть, другими словами, для постановки диагноза часто оказывается явно недостаточным выявление у пациента наличия определяемого синдрома или симптомокомплекса. Тогда для обозначения необходимого и достаточного набора параметров пациента, однозначно определяющих клинический диагноз, нам придется ввести новый термин - диагностический комплекс симптомов, диакомплекс (в названии данного термина слово "комплекс" использовано по приведенному выше определению этого слова и имеет достаточно поверхностную связь с понятием симптомокомплекса).

Этот термин - диакомплекс - мы несколько в математическом стиле определим так: "*Диакомплекс - это необходимый и достаточный набор синдромов, симптомокомплексов, симптомов, феноменов и внесимптомных характеристик (качеств), которые имеют или не имеют общий механизм возникновения и развития (и, если известно, общую этиологию и/или патогенез) и которые все вместе однозначно указывают на диагноз. Диакомплекс может со временем динамически изменяться, указывая на типичную или атипичную стадийность болезни (патокинез) или указывая, что состояние пациента требует установления другого диагноза.*

При коморбидности возможно выявление у пациента нескольких зависимых или независимых между собой диакомплексов, каждый из которых указывает на "свой" диагноз. Компоненты одного диакомплекса вполне могут входить как составные части в набор компонентов другого диакомплекса.

Свойство необходимости каждого синдрома, симптома, феномена или другого компонента диакомплекса определяется тем, что его отсутствие уже не позволяет выйти на однозначный диагноз и весь набор симптомов и феноменов превращается в определенный чуть ниже **предиагностический комплекс симптомов (предиакомплекс)**, а свойство достаточности указывает на то, что дополнительно обнаруженные у пациента сверх

необходимого для установления полноты и достаточности компонентов диакомплекса (проявления его однозначности для констатации клинического диагноза), дополнительные симптомы, феномены и другие компоненты, описывающие болезненное состояние пациента, не изменят, а лишь подтвердят установленный на основании базового диакомплекса диагноз. Один из подводных камней такого определения диакомплекса именно для психиатрии связан с тем, что, например, в психопатиях и акцентуациях для установки диагноза важны результаты тестирования, в частности, по Патохарактерологическому диагностическому опроснику (ПДО), а сегодня вообще патопсихологическое тестирование вне острого психоза становится необходимой частью психиатрической диагностики, которая при этом несколько сдвигается со своего традиционного чисто феноменологического подхода.

Предиагностический комплекс симптомов (предиакомплекс).

В обследовании пациента и попытке установления клинического диагноза часто встречается состояние, когда собранный набор (комплект) синдромов, симптомокомплексов, симптомов, феноменов и внесимптомных характеристик (качеств) не выводит однозначно на определенный клинический диагноз. Для установления однозначного диагноза требуется констатировать наличие дополнительных компонентов диакомплекса – синдромов, феноменов и т.д. (то есть не выполняется указанное выше свойство достаточности компонентов диакомплекса). Этот набор компонентов не определяет однозначно диагноз, причем, добавление того или иного компонента диакомплекса (тех или иных его компонентов) может вывести весь дополненный этими компонентами диакомплекс на тот или иной уже однозначный клинический диагноз (иначе бы выполнялось свойство достаточности и дополнительные компоненты диакомплекса всего только подтверждали бы уже установленный комплексом необходимых и достаточных составных частей диакомплекса клинический диагноз). Именно такой комплект (набор) синдромов, симптомокомплексов, симптомов, феноменов и внесимптомных характеристик (качеств), которые еще не выводят на однозначный клинический диагноз и требуют дополнительного количества компонентов для появления однозначности диагноза (для выполнения свойств необходимости и достаточности комплекса) мы предложили назвать **предиагностическим комплексом симптомов (предиакомплексом)**, (предварительным диагностическим комплексом симптомов, по некоторой аналогии с термином "преалкоголизм", предложенным Э. Е. Бехтелем (1986)).

"Лишние" термины.

Хотя нам известен принцип, именуемый в современном языке бритвой Оккама (лат. «*Entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem*» - «Не следует привлекать новые сущности без крайней необходимости»), а определений вокруг терминов синдрома и симптомокомплекса уже более, чем достаточно даже в данном тексте, мы не можем удержаться от соблазна попытаться ввести еще два термина для повышения формальной (математической) определенности, хотя и не рассчитываем на их использование чтобы не увеличивать терминологическую путаницу в использовании множества похожих между собой терминов.

Этими терминами могут быть "**Пресиндром**", "предварительный синдром" (вульг.: недосиндром) и "**Пресимптомокомплекс**". Объяснения мы дадим только для первого из этих терминов, так смысл второго термина после этого станет и так очевидно понятен.

Итак, возможно состояние диагностики, когда для четкого и однозначного определения синдрома (который, в свою очередь, войдет в определенный выше диагностический комплекс симптомов, диакомплекс) будет недоставать одного – двух симптомов или феноменов, причем добавление необходимого может определить получаемый синдром так или иначе. То есть, имеющийся набор симптомов или феноменов не может однозначно определить синдром и создает возможность выбора между двумя или большим количеством синдромов, для чего и требовались дополнительные компоненты, создающие однозначность синдрома.

Литература

1. Бехтель Э.Е. Донозологические формы злоупотребления алкоголем. М.: Медицина, 1986 – 272 с.
2. Жариков Н.М., Тюльпин Ю.Г. Психиатрия: Учебник. М.: ООО "Медицинское информационное агентство (МИА)", 2009, 832 с.
3. Жмурков В.А. Психопатология. Ч. II. [электронный ресурс] URL: <https://www.klex.ru/mg> (дата обращения 15.07.2019).
4. Менделевич В.Д., Менделевич Е.Г. Психиатрия: учебник. Ростов-на-Дону: Феникс, 2017, 412 с.
5. Методическая разработка для проведения занятия со студентами III курса по пропедевтике внутренних болезней кафедры пропедевтики внутренних болезней Гомельского государственного медицинского университета [электронный ресурс] URL: <https://studfiles.net/preview/5243450/> (дата обращения 01.08.2019).
6. МКБ-10. Психические расстройства и расстройства поведения. М.: Прометей, 2013, 584 с.
7. Незнанов Н.Г. Психиатрия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 496 с.
8. Тиганов А.С Общая психиатрия. М.: Медицина, 1999, 405 с.

#9 (49), 2019 część 1

Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe
(Warszawa, Polska)

Czasopismo jest zarejestrowane i publikowane w Polsce. W czasopiśmie publikowane są artykuły ze wszystkich dziedzin naukowych. Czasopismo publikowane jest w języku polskim, angielskim, niemieckim i rosyjskim.

Artykuły przyjmowane są do dnia 30 każdego miesiąca.

Częstotliwość: 12 wydań rocznie.

Format - A4, kolorowy druk

Wszystkie artykuły są recenzowane

Każdy autor otrzymuje jeden bezpłatny egzemplarz czasopisma.

Bezpłatny dostęp do wersji elektronicznej czasopisma.

Zespół redakcyjny

Redaktor naczelny - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

Rada naukowa

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

Dawid Kowalik (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Peter Clarkwood(University College London)

#9 (49), 2019 part 1

East European Scientific Journal
(Warsaw, Poland)

The journal is registered and published in Poland. The journal is registered and published in Poland. Articles in all spheres of sciences are published in the journal. Journal is published in English, German, Polish and Russian.

Articles are accepted till the 30th day of each month.

Periodicity: 12 issues per year.

Format - A4, color printing

All articles are reviewed

Each author receives one free printed copy of the journal

Free access to the electronic version of journal

Editorial

Editor in chief - Adam Barczuk

Mikołaj Wiśniewski

Szymon Andrzejewski

Dominik Makowski

Paweł Lewandowski

The scientific council

Adam Nowicki (Uniwersytet Warszawski)

Michał Adamczyk (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Peter Cohan (Princeton University)

Mateusz Jabłoński (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Piotr Michalak (Uniwersytet Warszawski)

Jerzy Czarnecki (Uniwersytet Jagielloński)

Kolub Frennen (University of Tübingen)

Bartosz Wysocki (Instytut Stosunków Międzynarodowych)

Patrick O'Connell (Paris IV Sorbonne)

Maciej Kaczmarczyk (Uniwersytet Warszawski)

Dawid Kowalik (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)

Peter Clarkwood(University College London)

Igor Dziedzic (Polska Akademia Nauk)
Alexander Klimek (Polska Akademia Nauk)
Alexander Rogowski (Uniwersytet Jagielloński)
Kehan Schreiner(Hebrew University)
Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Anthony Maverick(Bar-Ilan University)
Mikołaj Żukowski (Uniwersytet Warszawski)
Mateusz Marszałek (Uniwersytet Jagielloński)
Szymon Matysiak (Polska Akademia Nauk)
Michał Niewiadomski (Instytut Stosunków Międzynarodowych)
Redaktor naczelny - Adam Barczuk

1000 kopii.

Wydrukowano w «Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warszawa, Polska»

Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe

Aleje Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warszawa, Polska

E-mail: info@eesa-journal.com ,
http://eesa-journal.com/

Igor Dziedzic (Polska Akademia Nauk)
Alexander Klimek (Polska Akademia Nauk)
Alexander Rogowski (Uniwersytet Jagielloński)
Kehan Schreiner(Hebrew University)
Bartosz Mazurkiewicz (Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki)
Anthony Maverick(Bar-Ilan University)
Mikołaj Żukowski (Uniwersytet Warszawski)
Mateusz Marszałek (Uniwersytet Jagielloński)
Szymon Matysiak (Polska Akademia Nauk)
Michał Niewiadomski (Instytut Stosunków Międzynarodowych)
Editor in chief - Adam Barczuk

1000 copies.

Printed in the "Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw, Poland»

East European Scientific Journal
Jerozolimskie 85/21, 02-001 Warsaw,
Poland

E-mail: info@eesa-journal.com ,
http://eesa-journal.com