

ISSN 2664-472X

e ISSN 2664-4738

Medical Science of Ukraine

Медична наука України

2021, Vol. 17, № 3

Medical Science of Ukraine. 2021, Vol. 17, № 3



ISSN 2664-472X



9 772664 472004

17

ISSN 2664-472X
e ISSN 2664-4738
<https://doi.org/10.32345>
Medical science of Ukraine
2021, Vol. 17, No. 3

Certificate of state registration:
KB № 21521-11421 ІПР dated 18.08.2015

Periodicity:
published four times a year

Scientific and practical journal in the field: Medicine.
Distributed in Ukraine and abroad

Founder:
Bogomolets National Medical University

Editor in Chief: Zemskov S. V.

Deputy Editor-in-Chief:
Kanyura O. A., Babel N. (Germany)

Members of the editorial board:
Gruzeva O. V. (Sweden), Grando S. O. (USA), Babel N. (Germany), Kulchytsky V. A. (Belarus), Srivastava H. M. (Canada), Shamsi Sh. (India), Kafipour R. (Iran), Omelchuk S. T., Zakharash U. M., Ziablitsev S. V., Nizhenkivska I. V., Khaytovych M. V., Iaremenko O. B., Natrus L. V., Dyndar O. A., Guryanov V. G., Chaly K. O., Dzhus M. B., Panova T. I., Zhegulovych Z. E., Zhaboedov D. G., Ventskiy B. M., Mykhailachenko B. V., Ushko Ia. A., Nishkumay O. I., Netyazhenko N. V., Kulbasha Y. A., Vygovska O. V. (Ukraine)

The journal «Medical Science of Ukraine» is included in the list of scientific professional editions of Ukraine (category «B»), which are recommended for publication of dissertation materials for obtaining scientific degrees of the doctor of sciences (Sc.D.) and candidate of sciences (Ph.D.).

Branch of science – medical sciences in the following specialties:

221 – Dentistry
222 – Medicine
224 – Technologies of medical diagnostics and treatment
225 – Medical psychology
226 – Pharmacy, industrial pharmacy
227 – Physical therapy, occupational therapy
228 – Pediatrics
229 – Public Health

Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine on 26th of November, 2020, No. 1471 (Appendix 3, paragraph 44)

Order of the Ministry of Education and Science of Ukraine on 13th of March, 2017, No. 374

The decision of the State Accreditation Commission of Ukraine on 18th of November, 2009, № n 1-05/5

Address of the editor:
Shevchenko's boulevard, 13, Kyiv, 01601

For correspondence:
01601, Kyiv, Shevchenko's boulevard, 13
Tel/fax (044) 234-69-75; (095) 244-27-26

Web-site: msu-journal.com

E-mail: msu@nmu.ua; msu.nmu34@gmail.com

For the reliability of the information in the publications, the authors of the article bear responsibility. Author's materials do not always reflect the point of view of the editorial staff.
In case of reprinting the reference is required.

Signed for print on 24, 2021
Conditional printed sheets 13.95. Format 60x84 1/8.
Circulation 500 copies.
Published by Publishing House «505»
Ukraine, Zhytomyr, street Mala Berdychivska, 17A
Phone: +38063 101 22 33
Certificate DK № 5609 dated 21.09.2017

ISSN 2664-472X
e ISSN 2664-4738
<https://doi.org/10.32345>
Медицина наука України
2021, Т. 17, № 3

Свідоцтво про державну реєстрацію
KB № 21521-11421 ІПР від 18.08.2015

Періодичність видання:

1 раз на квартал

Галузь науки: медична

Категорія: Б

Статус видання: розповсюджується в Україні та за кордоном

Засновник

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Головний редактор: Земсков С. В.

Заступники редактора:

Канюра О. А., Babel N. (Німеччина)

Члени редколегії:

Gruzeva O. V. (Швеція), Grando S. O. (США), Babel N. (Німеччина), Кульчицький В. А. (Білорусь), Srivastava H. M. (Канада), Shamsi Sh. (Індія), Кафіроур Р. (Іран), Омельчук С. Т., Захараш Ю. М., Зяблицев С. В., Ніженківська І. В., Хайтович М. В., Яременко О. Б., Натрус Л. В., Диндар О. А., Гур'янов В. Г., Чалий К. О., Джус М. Б., Панова Т. І., Жегулович З. Є., Жабосдов Д. Г., Венцківський Б. М., Михайліченко Б. В., Ушко Я. А., Нішкумай О. І., Нетяженко Н. В., Кульбашна Я. А., Виговська О. В. (Україна)

Журнал «Медицина наука України» включено в категорію «Б» – перелік наукових фахових видань України, рекомендованих для публікації дисертаційних матеріалів на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та доктора філософії у галузі «Медицина», спеціальності:

221 – стоматологія

222 – медицина

224 – технології медичної діагностики та лікування

225 – медична психологія

226 – фармація, промислова фармація

227 – фізична терапія, ерготерапія;

228 – педіатрія;

229 – громадське здоров'я

Наказ Міністерства освіти та науки України від 26.11.2020, № 1471 (Додаток 3, пункт 44)

Наказ Міністерства освіти та науки України від 13.03.2017, № 374

Постанова Президії Вищої Атестаційної Комісії України від 18.11.2009, № n 1-05/5

Адреса редакції:

01601, м. Київ, бульв. Шевченка, 13

Для кореспонденції:

01601, м. Київ, бульв. Т. Шевченка, 13

Тел./факс (044) 234-69-75; моб. (095) 244-27-26 (секретар)

Сайт видання: msu-journal.com

E-mail: msu@nmu.ua; msu.nmu34@gmail.com

За достовірність інформації в публікаціях відповідальність несуть автори статті. Авторські матеріали не завжди віддзеркалюють точку зору редакції.
При передруку посилання обов'язкове.

Підписано до друку 24.09.2021

Ум. друк. арк. 13.95. Формат 60x84 1/8.

Тираж 500 прим. Зам. 71-3

Надруковано у ТОВ «505»

Україна, м. Житомир, вул. Мала Бердичівська, 17А

Тел.: +38063 101 22 33

Свідоцтво ДК № 5609 від 21.09.2017 р.

Medical Science of Ukraine

Медична наука України

2021. Т. 17, № 3

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

<https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2021>

Періодичність видання – 1 раз на квартал

ЗМІСТ

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

Зяблицев Д.С., Дядик О.О., Зяблицев С.В.
Активність ангіотензин-перетворюючого ферменту-2 при гострому легеневому запаленні

Гладких Ф.В. Оцінка лікувального ефекту комбінованого застосування кріоконсервованого екстракту плаценти та диклофенаку натрію при експериментальному ревматоїдному артриті за гематологічними показниками

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

Мальцев Д.В. Результати пошуку лабораторних ознак автоімунних реакцій до мозкових та позамозкових автоантигенів у дітей з розладами спектру аутизму, асоційованими з генетичним дефіцитом фолатного циклу

Тимченко М.Д., Тимченко С.В., Волосевич Л.І.
Вплив парентеральної вакцинації проти грипу на клітинний склад секрету ротоглотки та його мікробіоту у хворих на хронічні запальні захворювання верхніх дихальних шляхів

Shweta Patil, Sangita Phatale, Basavaraj Malipatil.
Correlation of glycosylated hemoglobin levels with auditory and visual reaction time in diabetics

Marushko Y.V., Hyshchak T.V., Todyka Y.I.
Prophylactic effect of a probiotic intervention in children prone to acute upper respiratory tract infections: a randomized controlled trial

Тепла І.В. Зв'язок показників росту плацент з масою дітей при народженні в дихоріальних діамніотичних двійнях

CONTENT

THEORETICAL MEDICINE

3 *Ziablitsev D.S., Dyadyk O.O., Ziablitsev S.V.* Activity of angiotensin-converting enzyme-2 in acute pulmonary inflammation

15 *Hladkykh F. V.* Evaluation of the therapeutic effect of the combined use of cryopreserved placenta extract and diclofenac sodium in experimental rheumatoid arthritis by hematological parameters

CLINICAL MEDICINE

22 *Maltsev D. V.* The results of the search for laboratory signs of autoimmune reactions to cerebral and extracerebral autoantigens in children with autism spectrum disorders associated with genetic deficiency of the folate cycle

38 *Timchenko M.D., Timchenko S.V., Volosevich L.I.* Effect of parenteral influenza vaccination on the cell composition and its microbiota of the oropharyngeal secretion in patients with chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract

44 *Shweta Patil, Sangita Phatale, Basavaraj Malipatil.* Correlation of glycosylated hemoglobin levels with auditory and visual reaction time in diabetics

51 *Marushko Y.V., Hyshchak T.V., Todyka Y.I.* Prophylactic effect of a probiotic intervention in children prone to acute upper respiratory tract infections: a randomized controlled trial

66 *Tepla I.V.* The relationship between placental growth rates and the birth weight in dichorionic diamniotic twins

<i>Chornopyshchuk R.M., Nagaichuk V.I., Gerashchenko I.I., Nazarchuk O.A., Sidorenkov S.A., Chepliaka O.M., Sidorenko L.A.</i> Clinical and microbiological substantiation of topical application of sorption hydrophilic/hydrophobic composition based on nanosilica in the treatment of patients with burns	76	<i>Chornopyshchuk R.M., Nagaichuk V.I., Gerashchenko I.I., Nazarchuk O.A., Sidorenkov S.A., Chepliaka O.M., Sidorenko L.A.</i> Clinical and microbiological substantiation of topical application of sorption hydrophilic/hydrophobic composition based on nanosilica in the treatment of patients with burns
ПРОФІЛАКТИЧНА МЕДИЦИНА		PREVENTIVE MEDICINE
<i>Korshun M.M., Martiianova Y.V.</i> Еколого-гігієнічна оцінка нових пестицидів для хімічного захисту зернових злакових культур	85	<i>Korshun M.M., Martiianova Y.V.</i> Ecological and hygienic assessment of new pesticides for grain cereals chemical protection
ОГЛЯДИ		REVIEW
<i>Lastivka I.V., Antsupva V.V., Babintseva A.H., Unhurian M.D., Ushko I.A.</i> Molecular-genetic aspects of Kabuki makeup syndrome. Review	93	<i>Lastivka I.V., Antsupva V.V., Babintseva A.H., Unhurian M.D., Ushko I.A.</i> Molecular-genetic aspects of Kabuki makeup syndrome. Review
ТЕХНОЛОГІЇ МЕДИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ		TECHNOLOGIES OF MEDICAL DIAGNOSTICS AND TREATMENT
<i>Vasylevki V., Stepanov I., Koval R., Sopotnyak M., Liutianska N., Sheyko V., Stavnychy T.</i> Machine learning algorithms implementation in the healthcare system as a prospective area for science, healthcare, and business	98	<i>Vasylevki V., Stepanov I., Koval R., Sopotnyak M., Liutianska N., Sheyko V., Stavnychy T.</i> Machine learning algorithms implementation in the healthcare system as a prospective area for science, healthcare, and business
<i>Elmoutawakkil N., Seffar A-E., Elmoutawakkil D., Hacib N., Bellemkhannate S.</i> 3D printing of a Lowell Makes mask in PLA	110	<i>Elmoutawakkil N., Seffar A-E., Elmoutawakkil D., Hacib N., Bellemkhannate S.</i> 3D printing of a Lowell Makes mask in PLA
ХРОНІКИ		CHRONIC
Микола Никифорович Зайко – визначний вчений і педагог	117	Mykola Nykyforovych Zaiko is an outstanding scientist and teacher

АКТИВНІСТЬ АНГІОТЕНЗИН-ПЕРЕТВОРЮЮЧОГО ФЕРМЕНТУ-2 ПРИ ГОСТРОМУ ЛЕГЕНЕВОМУ ЗАПАЛЕННІ¹Зяблицев Д.С. <https://orcid.org/0000-0002-2671-2343>²Дядик О.О. <https://orcid.org/0000-0002-9912-4286>¹Зяблицев С.В. <https://orcid.org/0000-0002-5309-3728>¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна²Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна

dzablicev8@gmail.com

Актуальність. Ангіотензин-перетворюючий фермент-2 (АСЕ2), який є вхідними воротами для коронавірусу, також є важливим компонентом тканинної ренин-ангіотензинової системи з низкою протизапальних ефектів. Відомо, що АСЕ2 експресується у легенях пацієнтів з коронавірусною пневмонією, але не ясно, як це залежить від стадій розвитку та вираженості запалення.

Ціль: встановити вплив гострого запалення на легеневу експресію ангіотензин-перетворюючого ферменту-2.

Матеріал та методи. Щурам лінії Вістар (n=20) з повним дотриманням біоетичних норм було проведено введення у трахею стерильної капронової нитки довжиною 2,5 см та товщиною 0,2 мм на глибину 2,5 см. Тварин спостерігали та виводили з експерименту на 7, 14, 21 і 28 добу, робили мікроскопічні та імуногістохімічні (моноклональні антитіла проти АСЕ2; clone 4G5.1; EMD Millipore Corporation; Temecula, CA US) дослідження.

Результати. Мікроскопічна картина свідчила про розвиток гострого бронхолегеневого запалення протягом першого тижня, формування перибронхіальних та альвеолярних абсцесів на другому тижні з початком розриву бронхопневмонії з організацією абсцесів на третьому тижні і розвитком дифузного фіброзу паренхіми та гіалінозу судин на четвертому тижні спостереження. Екссудативна фаза гострого запалення супроводжувалася пригніченням активності АСЕ2 у епітеліоцитах бронхів, альвеолоцитах II порядку та судинному ендотелії. При переході запалення у стадію проліферації та фіброзування активність АСЕ2 відновлювалася.

Висновок. Фазна зміна активності АСЕ2 може обумовлювати хвилеподібний рецидивуючий перебіг інфекції, оскільки збільшення кількості білка АСЕ2 при затуханні гострого запалення сприяє збільшенню інфікування клітин-мішеней.

Ключові слова: експериментальна бронхопневмонія, ангіотензин-перетворюючий фермент-2, імуногістохімія.

Актуальність. Ще після першої епідемії коронавірусної інфекційної хвороби (COVID) у 2003 році був ідентифікований функціональний рецептор, необхідний для проникнення коронавірусу до клітин господаря [17]. Їм виявився ангіотензин-перетворюючий фермент-2 (АСЕ2) [12, 15]. АСЕ2 має 805 амінокислот та є монокарбоксіпептидазою типу I, трансмембранним глікопротеїном, який перетворює ангіотензин I на неактивний ангіотензин 1-9 та ангіотензин II на ангіотензин 1-7 [15]. Останній протидіє таким ефектам ангіотензину II, як звуження судин, проліферація, фіброз і запалення [18]. У легенях при запаленні ангіотензин 1-7 пригнічує інфільтрацію запальних клітин, вивільнення прозапальних цитокінів, покращує оксигенацію, знижує апоптоз альвеолярного епітелію і пригнічує проліферацію та міграцію фібробластів [18, 26].

Таким чином, з одного боку, АСЕ2 є прямою мішенню для вторгнення коронавірусу, а, з іншого, як важливий компонент тканинної ренин-ангіотензинової системи, має низку захисних ефектів при гострому запаленні [28]. В цьому плані актуальним є питання про вплив гострого легеневого запалення на експресію АСЕ2.

У експериментальних моделях запалення легень найчастіше використовують гризунів та принципи

індукції патологічного процесу [10]. Патоген у дихальну систему вводиться шляхом вдихання аерозоллю, інтраназальної інстиляції або ендотрохеально [27]. Для розвитку експериментальної пневмонії у бактеріологічних моделях використовують аспірацію мікроорганізмів [1]. Визнаною не бактеріальною моделлю є введення сторонніх тіл у трахею, наприклад, капронової нитки, що супроводжується розвитком гострої аспіраційної бронхопневмонії [2]. Перевагами цієї моделі є легка відтворюваність, відсутність необхідності роботи із потенційно заразним матеріалом та надійне моделювання гострого запалення.

Ціль: визначити активність ангіотензин-перетворюючого ферменту-2 при розвитку гострого експериментального запалення легень.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення дослідження білі щурі лінії Вістар віком 6 місяців та вагою 200-220 г були розподілені на дві групи: 1-а – відтворення гострої аспіраційної бронхопневмонії шляхом введення стороннього тіла у трахею (n=20) та 2-а – хібнооперовані тварини (контроль, n=10). У 1-й групі за допомогою провідника (ін'єкційна голка) стерильну капронову нитку довжиною 2,5 см та товщиною 0,2 мм вводили на глибину

2,5 см у трахею, операційну рану ушивали [2]. У тварин 2-ї групи мобілізували трахею, проколювали її голкою, але нитку не вводили (контроль). Всіх тварин наркотизували тіопенталом (50 мг/кг).

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС з захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№1759-VI від 15.12.2009). Тварин тримали на стандартному раціоні в умовах віварію. Протягом одного місяця після операції визначали загальний стан тварин, ректальну температуру, ступень ціанозу, наявність задишки, частоту дихальних рухів (ЧДР), аускультативні прояви.

Для проведення морфологічних досліджень тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом. Розтинали грудну порожнину, легені відсепаровували. Шматочки тканини легені з різних ділянок фіксували в 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну (рН 7,4) протягом 24-36 годин. Після фіксування у формаліні за протоколом загальноприйнятої методики шматочки тканини заливали в парафін. З парафінових блоків на ротаційному мікромомі HM 325 (Thermo Shandon, Англія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2-3 мкм, які потім забарвлювали гематоксиліном і еозинном.

Для визначення експресії ACE2 проводили імуногістохімічне дослідження (ІГХД) з моноклональними антитілами проти ACE2 (anti-ACE2; clone 4G5.1; Sigma-Aldrich MABN59, replaces MAB5676), виробництва EMD Millipore Corporation; Temecula, CA US). Для проведення ІГХД зрізи поміщали на адгезивні скельця Super Frost Plus (Menzel, Німеччина). Для високотемпературної обробки епітопів антигенів використовували цитратний буфер з рН6, EDTA буфер

з рН8; застосовували систему детекції UltraVision Quanto HRP, хромоген ДАБ Quanto, виробництва Thermo Fisher Scientific (США).

Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили із використанням світлооптичних мікроскопів «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки даних «Axio Imager. A2» при збільшенні об'єктивів $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, біокулярної насадки $\times 1,5$ та окулярів $\times 10$ з камерою ERc 5s, «Carl Zeiss» Primo Star з камерою AxioCam105 color та світлооптичного мікроскопу «Olimpus BX 40» додатково обладнаним цифровою камерою «Olimpus C3030-ADU», програмним забезпеченням «Olimpus DP-Soft».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В перші дні після операції у тварин 1-ї групи розвивалася задишка, прослуховувалися поодинокі вологи хрипи. Ректальна температура коливалась в межах 37,6-37,8 $^{\circ}$ C, ЧДР – 72-102 за хвилину. На 3-4-у добу визначалися постійні вологи хрипи, дихання поверхневе, до 120 за хвилину, температура коливалась в межах 37,2-38,4 $^{\circ}$ C. Через тиждень спостерігався виражений ціаноз, дихання утруднене поверхневе нерегулярне з активним залученням додаткових дихальних м'язів, вислуховувалися виражені хрипи, крепітація. Температура тіла коливалась в межах 37,2-38,0 $^{\circ}$ C. На 2-4-му тижнях спостереження зазначені прояви прогресували, дихання було жорстким, утрудненим, вислуховувалися хрипи, крепітація, у всіх тварин виражений ціаноз.

При патоморфологічному дослідженні тканин легені на 7 добу в мікропрепаратах відзначалося повнокров'я судин, в тому числі й мікроциркуляторного русла, в частині ознаки мікротромбозу, стаз, місцями – екстазії венул (рис. 1).

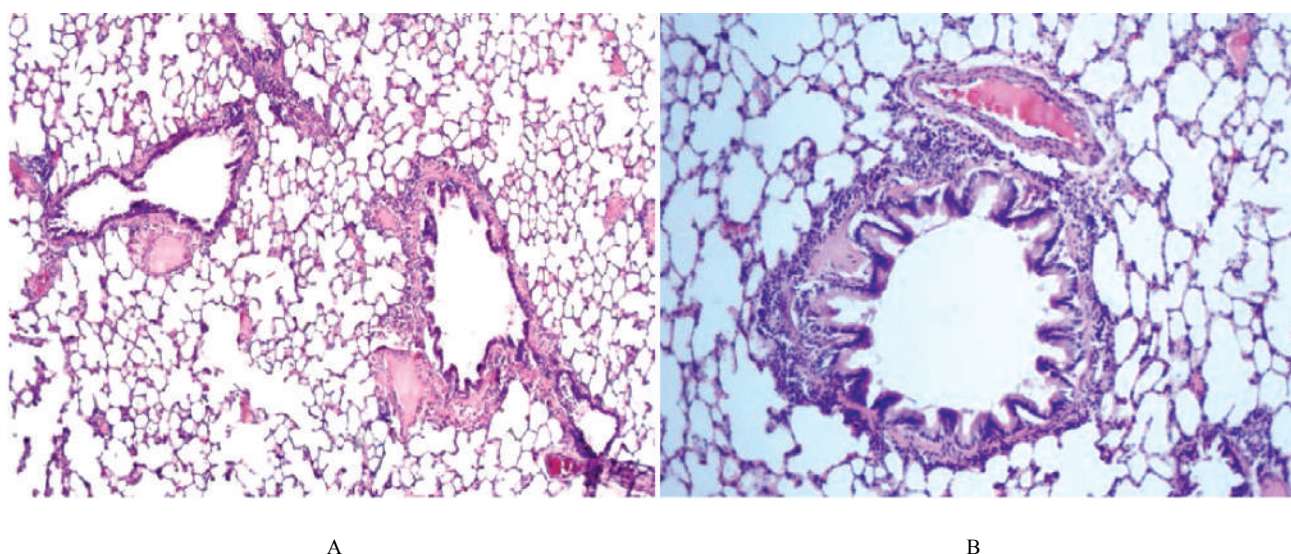


Рис. 1. Мікропрепарати легені щура. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 7-а доба. В судинах стаз, вогнищевий мікротромбоз і екстазії венул, емфізематозно розширені альвеоли, розриви міжальвеолярних перетинок. Забарвлення – гематоксиліном та еозинном. А $\times 50$; В $\times 100$

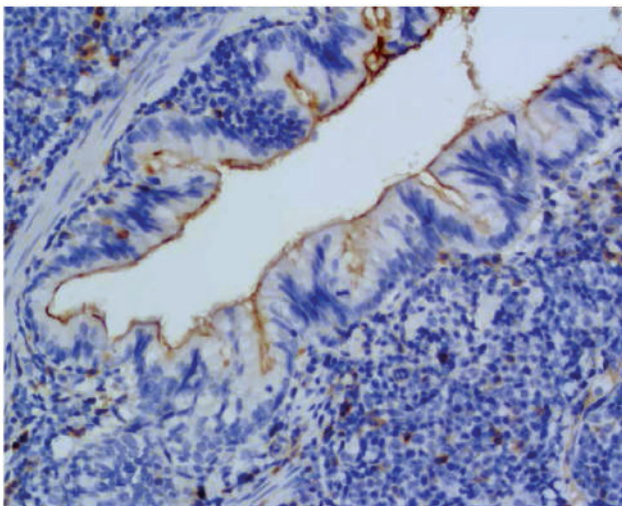
Спостерігались ознаки крайового стояння лейкоцитів у просвіті судин, невеликі локуси із явищами сладжу еритроцитів та фокальні діapedезні крововиливи. Стінка судинних структур середнього та дрібного калібру нерівномірно потовщена за рахунок набряку. Легенева паренхіма із явищами дистелектазів: ателектатично змінені ділянки (з повним перекриттям альвеолярних просвітів), що чергуються з емфізематозно ділатованими альвеолами, у цих зонах – із стоншенням та розривами міжальвеолярних перетинків (див. рис. 1B). У вогнищах емфіземи просвіти альвеол із запусіванням (оптично вільні від ексудату чи тканинного детриту). Сегментарно спостерігались компенсаторно-захисні реактивні зміни альвеолоцитів, переважно за рахунок епітеліоцитів II типу у вигляді гіперплазії. Просвіти бронхів з вогнищевими ознаками транзиторної бронхоектазії. Стінка бронхів інфільтрована переважно нейтрофільними лейкоцитами, з домішкою мононуклеарів. Слизова оболонка бронхів та бронхіол з ознаками дегенеративних змін та гіперсекреторної активності (за рахунок гіперплазії респіраторного війкового епітелію та келиховидних клітин), з осередками десквамації. Перибронхіально виражений інтерстиційний набряк та реактивна гіперплазія лімфоїдних фолікулів змішаного характеру.

ІГХД з маркером anti-ACE2 у структурах легень у контрольній групі показало позитивну експресію ACE2 (рис. 2A). Виражена експресія виявлялась на апікальній поверхні епітелію бронхів у вигляді дифузного забарвлення суцільної облямівки. У паренхімі легень та перибронхіально позитивна експресія спостерігалась в частині альвеолоцитів II порядку, в частині моноцитів, в ендотелії судин різного калібру.

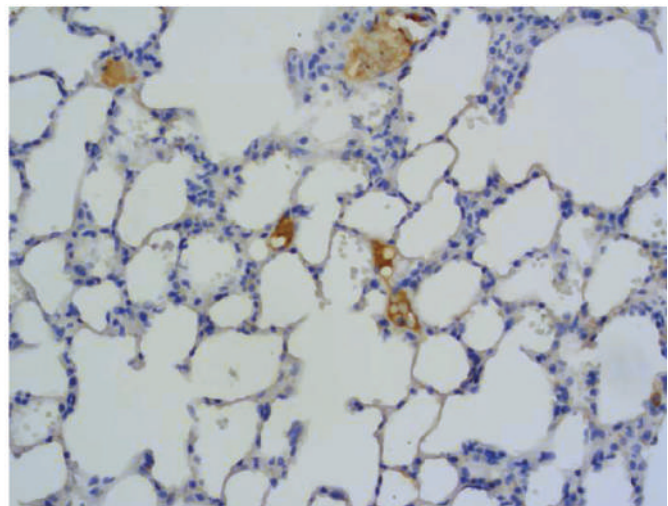
На 7-у добу розвитку запального процесу було відмічено суттєве зменшення інтенсивності експресії ACE2 в епітелії бронхів, переважно зі слабо вираженою позитивною реакцією у поодиноких клітинах (рис. 2B). Слід зазначити, що зникала експресія ACE2 в альвеолоцитах II порядку, в окремих клітинах зберігалась слабо виражена експресія ACE2. Натомість, експресія ACE2 у мононуклеарних клітинах в інтерстицію суттєво зростала.

При патоморфологічному дослідженні тканин легень на 14 день було знайдено порушення гістоархітектоніки органу за рахунок формування пневмо- і бронхогенних гострих абсцесів (рис. 3). Судинні зміни, в цілому, відповідали таким попереднього терміну. У альвеолах відмічався гнійний ексудат, реактивні зміни альвеолоцитів як I, так і II типів у вигляді гіперплазії. Реактивні зміни слизової оболонки бронхів та бронхіол зберігалися, відмічені протяжні поля десквамативних змін. Частина бронхіол з ознаками порушення цілісності та залученням у деструктивний процес прилеглих альвеолярних структур з формуванням осередків гнійного запалення – абсцесів, стінка яких сформована зруйнованими структурами легеневої паренхіми. Така морфологічна картина вказувала на розвиток гострої бронхопневмонії з формуванням гострих перибронхіальних та альвеолярних абсцесів на фоні гострої бронхопневмонії. Поряд з цим, на окремих ділянках відмічалось розростання молодого сполучної тканини.

ІГХД з маркером anti-ACE2 на 14 добу спостереження показало послаблення у порівнянні з контролем експресії білка ACE2 (рис. 4). Причому таке послаблення було характерне не тільки для клітин епітелію бронхів, але і для інтерстиціальних макрофагів, серед яких експресія зберігалась в поодиноких



A



B

Рис. 2. Мікропрепарати легень щура. ІГХД з моноклональним антитілом до ACE2. А – контроль; В – експериментальна аспіраційна пневмонія, 7-а доба. На А – позитивна експресія на апікальній поверхні бронхіального епітелію, позитивна експресія мононуклеарних клітин в інтерстиції та альвеолоцитах II порядку; на В – знижена інтенсивність експресії в епітелію бронхів, поодинокі позитивні альвеолоцити II порядку, позитивна експресія в мононуклеарних клітинах інтерстицію. $\times 200$

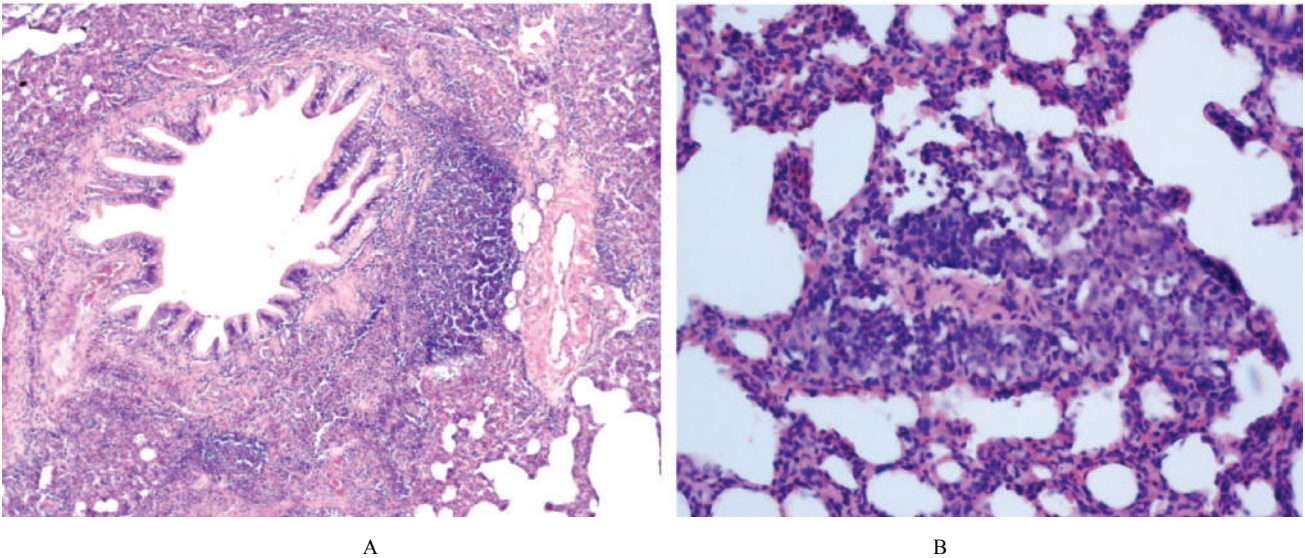


Рис. 3. Мікропрепарати легені щура. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 14-а доба. Міжальвеолярні перетинки набрякли, потовщені, рясно інфільтровані лімфоцитами, нейтрофільними лейкоцитами; у просвіті альвеол гнійний ексудат з домішкою моноцитів та лімфоцитів; бронх з порушеними стінками та перибронхіальною інфільтрацією, гіперплазія лімфоїдної тканини; формування перибронхіальних абсцесів. Забарвлення – гематоксилином та еозіном А×50; В×100

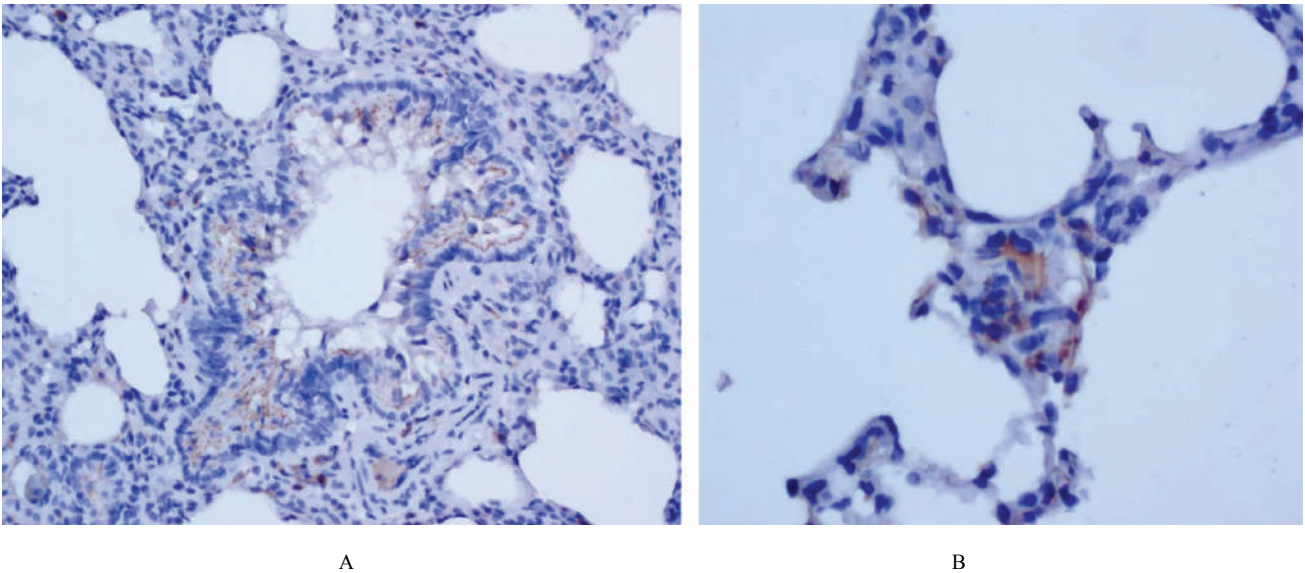
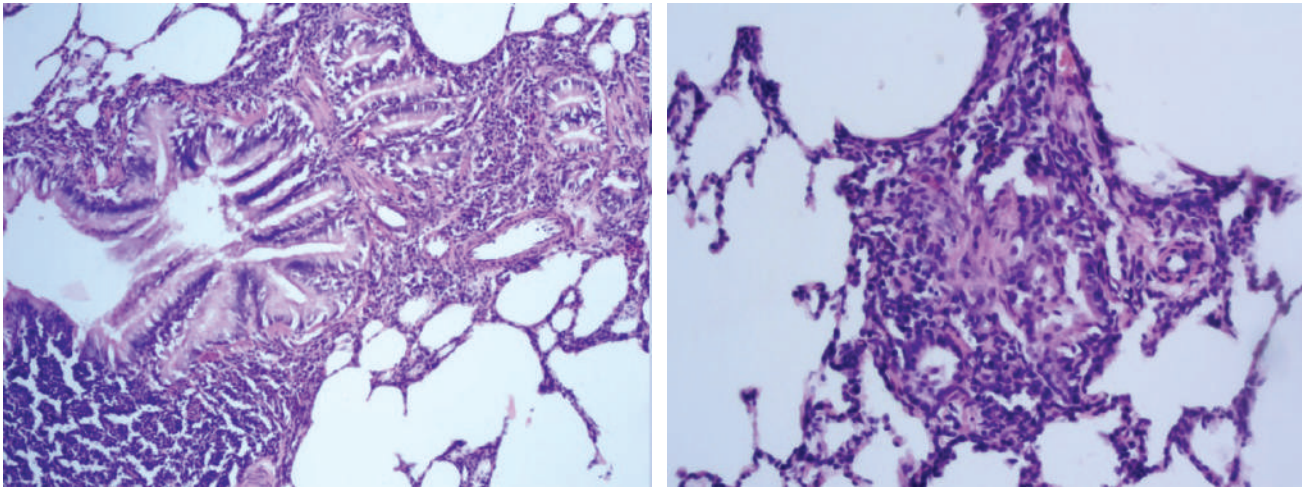


Рис. 4. Мікропрепарати легені щура. ІГХД з моноклональним антитілом до ACE2. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 14-а доба. Загальне зниження експресії із збереженням її в поодиноких макрофагах та окремих епітеліоцитах II порядку. А×200; В×400

крупного розміру клітинах. Нерівномірна, переважно слабо виражена експресія зберігалась у деяких альвеолоцитах II порядку.

На 21 день загальна гістоархітектоніка органу була порушена за рахунок сформованих пневмоніогенних (bronхогенних) абсцесів з початковими ознаками організації пневмонії (рис. 5). Відзначені зони з нерівномірним повнокров'ям судин мікроциркуляторного русла із вогнищевим мікротромбозом, екстазією венул, що чергувалися із зонами спадання судин та ішемізацією паренхіми органу. Стінка судин середнього та дрібного калібру дещо потовщена за рахунок набряку, дисмукоїдозу, початкових проявів фіброзу, в окремих судинах дрібного калібру – ознаки гіалінозу.

В паренхімі легень явища дистелектазів у вигляді ателектатично змінених ділянок (з повним перекриттям альвеолярних просвітів), міжальвеолярні перетинки набрякли, інфільтровані лімфоцитами, вогнищево – моноцитами та нейтрофільними лейкоцитами, спостерігалась активація фібробластів у вигляді ніжної фібрилярної сітки (фіброзування міжальвеолярних перетинок). Ознаки реактивних змін альвеолоцитів I та II порядку, що проявлялися гіперплазією та ініціальною проліферацією клітин. Перибронхіально відмічено формування ніжного фібрилярного матриксу перифокально до зон абсцедування. Слизова оболонка бронхів та бронхіол з ознаками дегенеративних змін, гіперсекреторної ак-



А

В

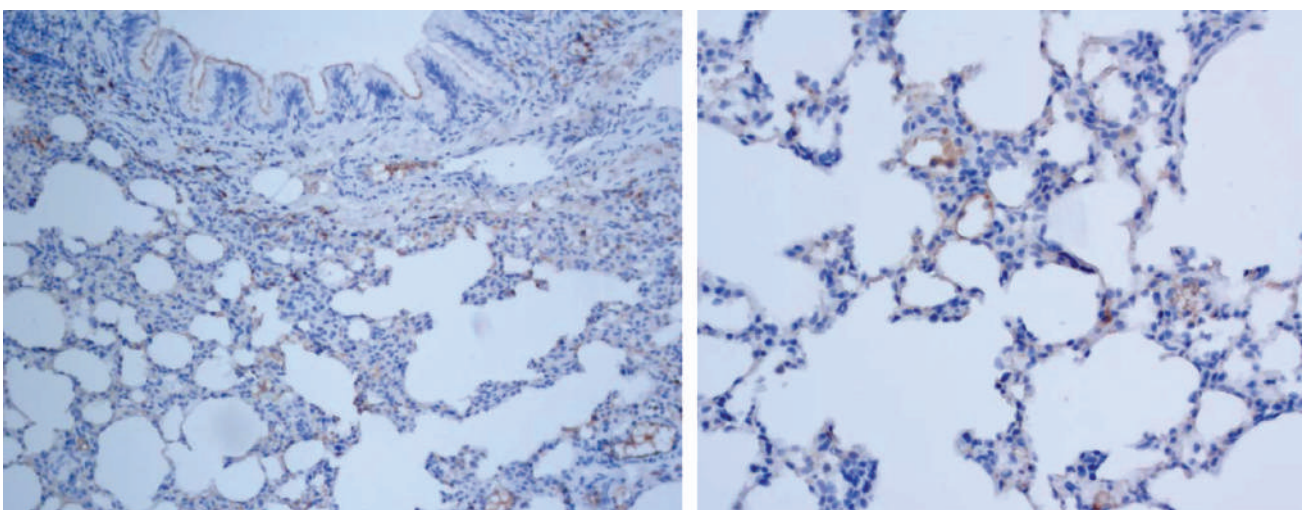
Рис. 5. Мікропрепарат легені щура. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 21-а доба. Деструктивні зміни бронхів та бронхіол з порушенням цілісності стінки, вогнищевим розростанням сполучної тканини; гіперсекреторна активність слизової оболонки бронхіального дерева; розростання сполучної тканини в ділянках запальних інфільтратів, гіаліноз судин мікроциркуляторного русла. Забарвлення гематоксиліном та еозіном. А×50; В×100

тивності, з протяжними полями десквамативних змін та з помірною кількістю змішаного ексудату у просвіті, який сформований слизом, тканинним детритом, нитками фібрину, серед якого дифузно розташовані нейтрофільні лейкоцити, лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги. Отже, морфологічна картина через 21 день свідчила про розрішення бронхопневмонії з організацією гострих перибронхіальних та альвеолярних абсцесів.

ІГХД з маркером anti-ACE2 на 21 добу спостереження, в цілому, показало тенденцію до відновлення інтенсивності експресії білка ACE2 у порівнянні з попередніми термінами (рис. 6). Майже на всьому протязі апікальна поверхня епітелію бронхів давала

позитивну експресію ACE2. В інтерстиції кількість позитивних моноцитів була невеликою, формувались скупчення таких клітин. У ділянках новоутвореної фіброзної тканини позитивної експресії ACE2 не виявлено. Встановлено, що в цій термін виражена експресія спостерігалась в ендотелії судин різного калібру. Як і на попередніх термінах, позитивна експресія ACE2 спостерігалась в поодиноких альвеолоцитах II порядку.

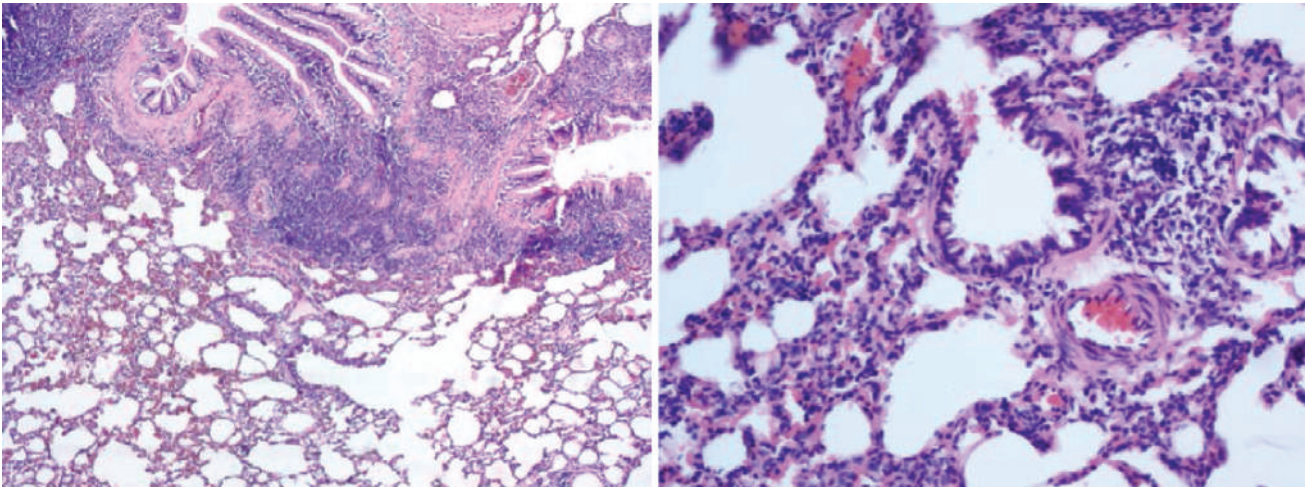
Через 28 днів загальна гістоархітектоніка легені була порушена за рахунок ознак організації пневмонії, переважно із фіброзом паренхіми, склерозуванням та гіалінозом судин (рис. 7). Відзначалося нерівномірне повнокров'я судин мікроциркулятор-



А

В

Рис. 6. Мікропрепарати легені щура. ІГХД з моноклональним антитілом до ACE2. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 21-а доба. Відновлення експресії бронхіального епітелію, скупчення імунопозитивних моноцитів, макрофагів в ділянках клітинних інфільтратів поза межами новоутвореної фіброзної тканини; позитивне забарвлення ендотелію судин, поодинокі позитивні альвеолоцити II порядку. А×100; В×200



А

В

Рис. 7. Мікропрепарат легені щура. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 28-а доба. Стінка бронхів набрякла, нерівномірно виражений фіброз; периваскулярне розростання сполучної тканини, в стінках частини судин відкладання гіаліну; ділянки фіброзування легеневої паренхіми. Забарвлення – гематоксилином та еозином. А×50; В×200

ного русла. Стінка судинних структур середнього та дрібного калібру потовщена переважно за рахунок набряку, нерівномірно вираженого фіброзу, в частині судин – гіалінозу.

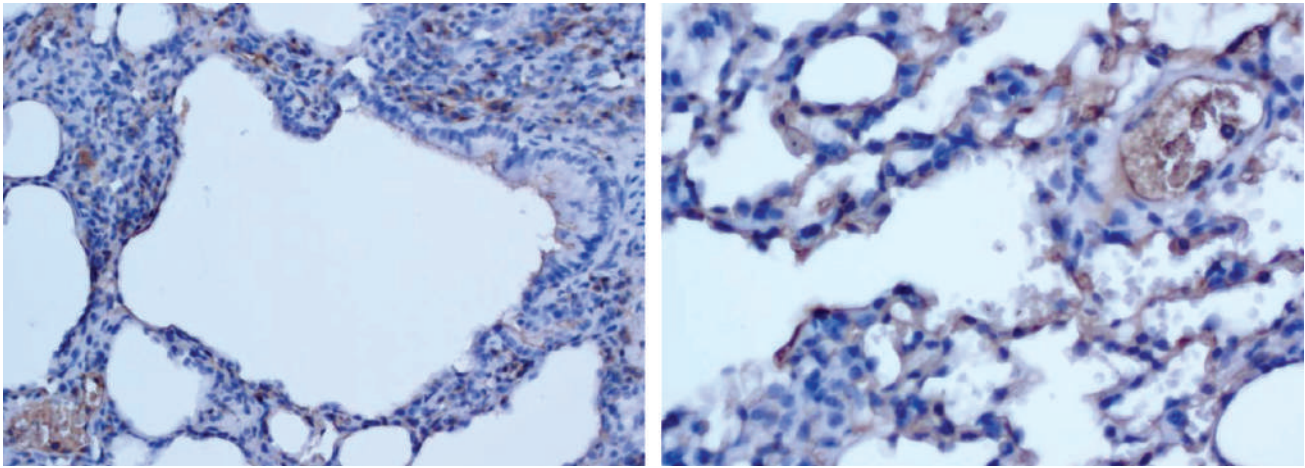
Паренхіма легень з явищами дистелектазів з ателектатично зміненими ділянками, з зонами повного перекриття альвеолярних просвітів; міжальвеолярні перетинки набряклі, інфільтровані лімфоцитами, невеликою кількістю нейтрофільних лейкоцитів, однак інфільтрація меншої щільності ніж через 14 і 21 день. Поряд з цим спостерігались ознаки фіброblastичної активності з появою фібрилярної сітки у переважній більшості міжальвеолярних перетинок, що свідчило на користь проявів ініціальної фази карніфікації легенів. У альвеолах незначний серозно-гнійний ексудат, ниті фібрину; емфізематозно дилатованих альвеол менше за площею, порівняно зі попередніми періодами. Зони абсцесів практично не визначалися. Слизова оболонка бронхів та бронхіол з ознаками нерізко виражених дегенеративних процесів, з гіперсекреторною активністю, з полями десквамативних змін та невеликою кількістю змішаного за характером ексудату. Перибронхіально та у зонах фіброзних змін наявні ділянки хронічного продуктивного запального процесу із розростанням сполучної тканини різного ступеня зрілості. Отже, патогістологічна картина на 28 день свідчила про розршення бронхопневмонії з організацією у вигляді фіброзу паренхіми та фіброзом та ділянками гіалінозу судин.

ІГХД з маркером anti-ACE2 на 28 добу спостереження показало відновлення інтенсивності експресії білку ACE2 у порівнянні з контролем і попередніми термінами дослідження (рис. 8). Епітелій бронхів на всьому протязі апікальної поверхні мав інтенсивну експресію у вигляді майже безперервної облямівки. У інтерстиції відзначалася велика кількість крупних

мононуклеарних та макрофагальних клітин з інтенсивною експресією. Відмічена виражена експресія в ендотіоцитах судин різного калібру. Переважна більшість альвеолоцитів II порядку мали інтенсивну експресію

Нами, за результатами клінічних спостережень за тваринами, визначено поступовий розвиток таких легневих симптомів, як задишка, прогресуючі вологі хрипи, крепітація, ціаноз. Патоморфологічно визначено набряк, геморагії, а згодом – розвиток фіброзу і карніфікації легень. Ці зміни вказували на розвиток протягом спостереження гострої пневмонії, з переходом у легневий фіброз. У дрібних видів гризунів (хом'яки, миші), дикі типи яких чутливі до вірусу SARS-CoV-2, також спостерігаються респіраторні симптоми, включаючи пневмонію, однак, відсутні гіпоксемічна дихальна недостатність, дисфункція позалегневих органів і летальність [7]. В жодній тварині не було виявлено цитокінової бурі або коагулопатії. Отже, співставлення клінічної картини дозволило провести певні аналогії у клінічній та патоморфологічній картині аспіраційної та SARS-CoV-2-асоційованої пневмонії у тварин.

Мікроскопічна картина легень при застосованій експериментальній моделі свідчила про розвиток гострого бронхолегеневого запалення протягом першого тижня, формування перибронхіальних та альвеолярних абсцесів на другому тижні з початком розршення бронхопневмонії з організацією абсцесів на третьому тижні і розвитком дифузного фіброзу паренхіми та гіалінозу судин на четвертому тижні спостереження. Розвиток аспіраційної пневмонії з введенням капронової нитки, в цілому, мав повільний перебіг та не супроводжувався гіперімунною реакцією, геморагічним запаленням та розвитком ГРДС, як це було показано для патологічного проце-



А

В

Рис. 8. Мікропрепарати легені щура. ІГХД з моноклональним антитілом до ACE2. Експериментальна аспіраційна пневмонія, 28-а доба. Інтенсивна дифузна експресія на апікальній поверхні бронхіального епітелію, велика кількість крупних позитивних клітин у інтерстиції, в міжальвеолярних перетинках, позитивне забарвлення ендотелію судин, позитивні альвеолоцити II порядку. А×100; В×200

су у легенях людини з COVID-19 [8, 24]. Хоча ми й отримували на ранніх термінах виражене ексудативне запалення, однак результати не дозволяли вважати, що введення капронової нитки викликає гіперергічну імунну відповідь по типу «цитокінового шторму».

У пацієнтів, які померли від дихальної недостатності при COVID-19, мало місце дифузне альвеолярне ушкодження з рясною периваскулярною інфільтрацією Т-лімфоцитами, тоді як при легкому перебігу захворювання мало місце важке ендотеліальне ушкодження та пошкодження клітинних мембран [3].

У наших дослідженнях показана наявність дистрофічних змін альвеолярного епітелію, активна лімфоїдна інфільтрація та порушення судин мікроциркуляторного русла міжальвеолярних перетинок. Отже, ми схильні вважати, що модель експериментальної аспіраційної пневмонії з введенням капронової нитки, відтворює легкий перебіг пневмонії у хворих на COVID-19. Натомість, щодо моделювання легеневого фіброзу, застосована експериментальна модель була досить ефективною.

Основним джерелом імуноспецифічного забарвлення на ACE2 у легенях тварин виявилася апікальна поверхня епітелію бронхів, де вона мала вигляд суцільної облямівки, альвеолоцити II порядку, поодинокі моноцити та судинний ендотелій. Аналогічні результати у щурів були отримані і у інших дослідженнях: у периферійних альвеолах досить інтенсивно забарвлювалися альвеолоцити II порядку та ендотелій [6, 21].

У людини експресія білку ACE2 була найвищою у регіонах синоназальної порожнини та легеневи альвеол, місцях передбачуваної вірусної передачі [19]. У легеневій паренхімі білок ACE2 був виявлений на апікальній поверхні невеликої кількості клітин альвеолярного епітелію типу II, причому він

не залежав від легеневи факторів ризику COVID-19. Апікальний розподіл експресії ACE2 у епітелії дихальних шляхів підтверджений й у інших дослідженнях. Саме така особливість експресії ACE2 сприяє проникненню та розмноженню вірусу [13].

У наших дослідженнях експресія ACE2 на 7 і 14 добу знижувалася і зберігалася у поодиноких клітинах епітелію бронхів та альвеолоцитах II порядку. Це відповідало експериментальним даним з мишакою моделлю гострого легеневого пошкодження [14].

За даними ІГХД, проведеного у людей, хворих на COVID-19 та загинувших на різних стадіях пошкодження легень (гостра ексудативна, підгостра проліферативна та пізня фіброзна), була продемонстрована присутність ACE2 у пошкоджених альвеолярних клітинах II типу, а також у новоутворених інтерстиціальних капілярах [5]. У всіх випадках визначалися пошкодження ендотелію, тромбоз і неоангіогенез.

Виражене дифузне пошкодження ендотелію при COVID-19 відмічено й у інших роботах [4], що вказує на трмбогенність цього захворювання. До речі, модель аспіраційної пневмонії дозволяє отримати виражену ендотеліальну дисфункцію з дифузним тромбоутворенням. Певна роль у цьому патологічному процесі може належати недостатності ACE2 та утворення ангіотензину 1-7 з переважанням протромбогенних ефектів ангіотензину II [4].

Висока експресія ACE2 відмічена й у перичитах мікросудин [11]. Широке залучення клітин судин мікроциркуляторного русла пояснює гіперзапалення, коагуляцію, судинну дисфункцію, тромбоемболію. У наших дослідженнях відмічено збільшення експресії ACE2 у мононуклеарних клітинах у легеневому інтерстиції на 7-у добу з наступним її зниженням. Наявність ACE2-імунопозитивного забарвлення імунних клітин інтерстицію (Т-лімфоцитів, макрофагів, ней-

трофілів і, навіть, фібробластів) відмічена й іншими дослідженнями [6, 9, 19].

У цьому плані можна відмітити експериментальні дані про те, що ангіотензин 1-7 здатний зменшувати експресію протизапальних цитокінів TNF- α та IL-6 та збільшувати експресію протизапальних цитокінів IL-4 та IL-10 за рахунок впливу на поляризацію макрофагів M1/M2 [20]. Відповідно, збільшення експресії ACE2 у макрофагах інтерстицію на 7-у добу, могло компенсувати протизапальні ефекти ангіотензину II, тоді як наступне зменшення – відбивало пригнічення цієї захисної реакції. У будь-якому разі отриманий результат вказує на необхідність подальших досліджень з диференціюванням фенотипу макрофагів у напрямку M1 або M2. Але, вже на даному етапі стає очевидним, що пригнічення експресії ACE2 має негативне значення, оскільки гальмує обмежуючий контроль ангіотензину 1-7 на запалення, проліферацію та мікроциркуляцію.

При COVID-19 таке пригнічення експресії ACE2 пов'язують з прямою дією S-білка та самого вірусу [18, 23]. Наші дані безпосередньо показали, що навіть за відсутності вірусної інфекції, експресія ACE2 в гостру фазу запалення знижується, що є додатковим фактором посилення запального пошкодження. У якості найбільш ймовірного регулятора експресії ACE2 може виступати інтерферон I [23], який опосередковує вроджену імунну відповідь проти вірусної інфекції шляхом прямого інгібування реплікації вірусу [16]. Він також пов'язує вроджений імунітет з адаптивним імунітетом для довгострокового захисту від повторних вірусних інфекцій [16].

Генна експресія ACE2 стимулюється людським інтерфероном, як *in vitro* з використанням епітеліальних клітин дихальних шляхів, так і *in vivo*: SARS-CoV-2 може пригнічувати інтерферонову регуляцію ACE2 для посилення інфекції [29]. Отже, зниження вмісту ACE2 при COVID-19, крім безпосередньої дії вірусу, може відбуватися за рахунок пригнічення інтерферону та зменшення експресії ACE2 [25].

На 21-у добу нами було визначено відновлення експресії ACE2 у порівнянні з попередніми термінами. Експресія ферменту визначена на апікальній поверхні епітелію бронхів, у поодиноких альвеолоцитах II типу, ендотелії судин, скупченнях мононуклеарів у інтерстиції. Ці зміни мали чітку тенденцію до наростання на 28-у добу, що супроводжувалося розрешенням бронхопневмонії з організацією абсцесів і розвитком дифузного фіброзу паренхіми. На наш погляд, такі результати пояснювалися, з одного боку, стиханням гострих проявів запалення з переходом його у стадію проліферації, а з іншого, – прогресуванням гіпоксії. Показано, що у первинних епітеліальних клітинах малих дихальних шляхів людини мРНК ACE2 та експресія білка індукувалися гіпоксією, також у пацієнтів з тривалим перебігом COVID-19 від-

мічено збільшення експресії ACE2 в альвеолоцитах типу II, що було індуковано гіпоксією [22].

Таким чином, проведені дослідження показали зв'язок перебігу гострого бронхолегеневого запалення у процесі розвитку експериментальної аспіраційної пневмонії з експресією ACE2. Показано, що ексудативна фаза гострого запалення супроводжувалася пригніченням експресії ACE2 у епітеліоцитах бронхів, альвеолоцитах II порядку та судинному ендотелії. При переході запалення у стадію проліферації та фіброзування експресія ACE2 відновлювалася. Виявлені зміни вказували на наявність факторів регуляції експресії ACE2 при гострому запаленні, які відрізняються від дії SARS-CoV-2 або його S-білка. До таких факторів може належати недостатність індукції інтерферону (раннє пригнічення експресії) та розвиток гіпоксії (стимуляція, що веде до відновлення активності) на пізніх стадіях. Останнє наводить на думку, що саме таке відновлення експресії ACE2 може обумовлювати хвилеподібний рецидивуючий перебіг інфекції, оскільки збільшення кількості білка ACE2 при затуханні гострого запалення сприяє збільшенню інфікування клітин (епітеліоцитів бронхів, ендотелію і альвеолоцитів II порядку).

ВИСНОВКИ

1. Введення стороннього тіла (капронової нитки) у трахею дозволило змодельовати гостру бронхопневмонію з поступовим розвитком ексудативного та проліферативного запалення; формуванням перибронхіальних та альвеолярних абсцесів з їх організацією та розвитком дифузного фіброзу паренхіми та гіалінозу судин.

2. Ексудативна фаза гострого запалення супроводжувалася пригніченням експресії ACE2 у епітеліоцитах бронхів, альвеолоцитах II порядку та судинному ендотелії. При переході запалення у стадію проліферації та фіброзування експресія ACE2 відновлювалася.

REFERENCES

1. Kubyshkin AV, Novikov N.Yu., Birkin AA, Nesterov EN. [Experimental model of acute lung injury]. *Tavrichesky medical and biological bulletin*. 2012;15(2) part 3(58):122-4. [in Russian]
View at: NBUV: <http://dspace.nbu.gov.ua/handle/123456789/45178>
URL: <http://dspace.nbu.gov.ua/bitstream/handle/123456789/45178/27-Kubyshkin.pdf?sequence=1>
2. Kubyshkin AV, Fomochkina II. Elastolytic activity of bronchoalveolar lavage in modeling the inflammatory process in the lungs. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2008;80(1):89-95. [in Russian]
View at: URL: http://ubj.biochemistry.org.ua/images/stories/pdf/2008/UBJ_N1_2008/Kubyshkin_80_1%20.pdf
3. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A,

- Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, Li WW, Li VW, Mentzer SJ, Jonigk D. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Jul 9;383(2):120-8. DOI: 10.1056/NEJMoa2015432. View at: Publisher Site: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2015432> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32437596/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7412750/>
4. Cipolloni L, Sessa F, Bertozzi G, Baldari B, Cantatore S, Testi R, D'Errico S, Di Mizio G, Asmundo A, Castorina S, Salerno M, Pomara C. Preliminary Post-Mortem COVID-19 Evidence of Endothelial Injury and Factor VIII Hyperexpression. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Aug 9;10(8):575. DOI:10.3390/diagnostics10080575. View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/8/575> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32784826/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460315/>
 5. Damiani S, Fiorentino M, De Palma A, Foschini MP, Lazzarotto T, Gabrielli L, Viale PL, Attard L, Riefolo M, D'Errico A. Pathological post-mortem findings in lungs infected with SARS-CoV-2. *J Pathol*. 2021 Jan;253(1):31-40. DOI: 10.1002/path.5549. View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.5549> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32930394/>
 6. Descamps G, Verset L, Trelcat A, Hopkins C, Lechien JR, Journe F, Saussez S. ACE2 Protein Landscape in the Head and Neck Region: The Conundrum of SARS-CoV-2 Infection. *Biology (Basel)*. 2020 Aug 18;9(8):235. DOI: 10.3390/biology9080235. View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/8/235> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32824830/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7465650/>
 7. Ehaideb SN, Abdullah ML, Abuyassin B, Bouchama A. Evidence of a wide gap between COVID-19 in humans and animal models: a systematic review. *Critical care (London, England)*. 2020;24(1):594. DOI: 10.1186/s13054-020-03304-8. View at: Publisher Site: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-020-03304-8> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33023604/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7537968/>
 8. Franks TJ, Chong PY, Chui P, Galvin JR, Lourens RM, Reid AH, Selbs E, McEvoy CP, Hayden CDL, Fukuoka J, Taubenberger JK, Travis WD. Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum Pathol*. 2003;34:743-8. DOI: 10.1016/s0046-8177(03)00367-8. View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0046817703003678> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14506633/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7119137/>
 9. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol*. 2004;203:631-7. DOI: 10.1002/path.1570. View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1570> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15141377/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167720/>
 10. Hau J. Animal Models for Human Diseases. In: Conn P.M. (eds) *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Humana Press, 2008. DOI: 10.1007/978-1-59745-285-4_1. View at: Publisher Site: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-59745-285-4_1
 11. Hikmet F, Méar L, Edvinsson Å, Micke P, Uhlén M, Lindskog C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol*. 2020 Jul;16(7):e9610. DOI: 10.15252/msb.20209610. View at: Publisher Site: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/msb.20209610> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32715618/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7383091/>
 12. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, Müller MA, Drosten Ch, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181:271-80. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052. View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302294> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142651/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102627/> URL: <https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674%2820%2930229-4.pdf>
 13. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, Farzan M, Wohlford-Lenane C, Perlman S, McCray PB Jr. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*. 2005 Dec;79(23):14614-21. DOI: 10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005. View at: Publisher Site: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16282461/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287568/>

14. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005 Aug;11(8):875-9. DOI: 10.1038/nm1267.
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/nm1267>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16007097/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095783/>
15. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581:215-20. DOI: 10.1038/s41586-020-2180-5.
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32225176/>
16. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):907-23. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.025.
View at: Publisher Site: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(19\)30142-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761319301426%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(19)30142-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761319301426%3Fshowall%3Dtrue)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30995506/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6839410/>
17. Li W, Moore MJ, Vasileva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426:450-4. DOI: 10.1038/nature02145.
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/nature02145>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14647384/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095016/>
18. Liu MY, Zheng B, Zhang Y, Li JP. Role and mechanism of angiotensin-converting enzyme 2 in acute lung injury in coronavirus disease 2019. *Chronic Dis Transl Med*. 2020 Jun;6(2):98-105. DOI: 10.1016/j.cdtm.2020.05.003.
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095882X20300426?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32550040/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7236734/>
19. Ortiz ME, Thurman A, Pezzulo AA, Leidinger MR, Klesney-Tait JA, Karp PH, Tan P, Wohlford-Lenane C, McCray PB Jr, Meyerholz DK. Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:102976. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102976.
View at: Publisher Site: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(20\)30352-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(20)30352-2/fulltext)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32971472/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7505653/>
20. Pan H, Huang W, Wang Z, Ren F, Luo L, Zhou J, Tian M, Tang L. The ACE2-Ang-(17)-Mas Axis Modulates M1/M2 Macrophage Polarization to Relieve CLP-Induced Inflammation via TLR4-Mediated NF- κ b and MAPK Pathways. *J Inflamm Res*. 2021 May 20;14:2045-60. DOI: 10.2147/JIR.S307801.
View at: Publisher Site: <https://www.dovepress.com/the-ace2-ang-17-mas-axis-modulates-m1m2-macrophage-polarization-to-rel-peer-reviewed-fulltext-article-JIR>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34045880/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8144186/>
21. Sato T, Ueha R, Goto T, Yamauchi A, Kondo K, Yamasoba T. Expression of ACE2 and TMPRSS2 Proteins in the Upper and Lower Aerodigestive Tracts of Rats: Implications on COVID 19 Infections. *NALaryngoscope*. 2021;131(3):E932-E939. DOI: 10.1002/lary.29132.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lary.29132>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32940922/>
22. Sturrock A, Zimmerman E, Helms M, Liou TG, Paine R 3rd. Hypoxia induces expression of angiotensin-converting enzyme II in alveolar epithelial cells: Implications for the pathogenesis of acute lung injury in COVID-19. *Physiol Rep*. 2021 May;9(9):e14854. DOI: 10.14814/phy2.14854.
View at: Publisher Site: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phy2.14854>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33991451/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8123561/>
23. Sui Y, Li J, Venzon DJ, Berzofsky JA. SARS-CoV-2 Spike Protein Suppresses ACE2 and Type I Interferon Expression in Primary Cells From Macaque Lung Bronchoalveolar Lavage. *Front Immunol*. 2021 Jun 4;12:658428. DOI: 10.3389/fimmu.2021.658428.
View at: Publisher Site: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.658428/full>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34149696/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8213020/>
24. Suster S, Moran AC. *Biopsy interpretation of the lung*. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer; 2013. 417 p.
View at: Publisher Site: <https://shop.lww.com/Biopsy-Interpretation-of-the-Lung/p/9781975136581>
25. Vieira C, Nery L, Martins L, Jabour L, Dias R, Simões E Silva AC. Downregulation of Membrane-bound An-

- giotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Receptor has a Pivotal Role in COVID-19 Immunopathology. *Curr Drug Targets*. 2021;22(3):254-81. DOI: 10.2174/1389450121666201020154033.
View at: Publisher Site: <https://www.eurekaselect.com/187037/article>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081670/>
26. Wiese O, Zemlin AE, Pillay TS. Molecules in pathogenesis: angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *J Clin Pathol*. 2021 May;74(5):285-90. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206954.
View at: Publisher Site: <https://jcp.bmj.com/content/74/5/285>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32759311/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7409947/>
27. Williams K, Roman J. Studying human respiratory disease in animals--role of induced and naturally occurring models. *The Journal of pathology*. 2016;238(2):220-32. DOI: 10.1002/path.4658.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.4658>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26467890/>
PubMed Central:
28. Yan T, Xiao R, Lin G. Angiotensin-converting enzyme 2 in severe acute respiratory syndrome coronavirus and SARS-CoV-2: A double-edged sword? *FASEB J*. 2020;34:6017-26. DOI: 10.1096/fj.202000782.
View at: Publisher Site: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.202000782>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32306452/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7264803/>
29. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, Cao Y, Yousif AS, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1016-35.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
View at: Publisher Site: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(20\)30500-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420305006%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30500-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420305006%3Fshowall%3Dtrue)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32413319/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7252096/>

Article history
Received: 15.08.2021
Revision requested: 30.08.2021
Revision received: 12.09.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

АКТИВНОСТЬ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА-2 ПРИ ОСТРОМ ЛЕГОЧНОМ ВОСПАЛЕНИИ

¹Зяблицев Д.С., ²Дядык А.А., ¹Зяблицев С.В.

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

²Национальный университет здравоохранения Украины имени П.Л. Шупика, Киев, Украина

dzablicev8@gmail.com

Актуальность. Ангиотензин-превращающий фермент-2 (ACE2), который является входными воротами для коронавируса, также является важным компонентом тканевой ренин-ангиотензиновой системы с рядом противовоспалительных эффектов. Известно, что ACE2 экспрессируется в легких пациентов с коронавирусной пневмонией, но не ясно, как это зависит от стадий развития и выраженности воспаления.

Цель – установить влияние острого воспаления на легочную экспрессию ангиотензин-превращающего фермента-2.

Материал и методы. Крысам линии Вистар (n=20) с соблюдением биоэтических норм было проведено введение в трахею стерильной капроновой нити длиной 2,5 см и толщиной 0,2 мм на глубину 2,5 см. Животных наблюдали и выводили из эксперимента на 7, 14, 21 и 28 сутки, проводили микроскопические и иммуногистохимические (моноклональные антитела против ACE2; clone 4G5.1; EMD Millipore Corporation; Temecula, CA US) исследования.

Результаты. Микроскопическая картина легких свидетельствовала о развитии острого бронхолегочного воспаления в течение первой недели, формирование перибронхиальных и альвеолярных абсцессов на второй неделе с началом разрешения бронхопневмонии с организацией абсцессов на третьей неделе и развитием диффузного фиброза паренхимы и гиалиноза сосудов на четвертой неделе наблюдения. Экссудативная фаза острого воспаления сопровождалась угнетением активности ACE2 в эпителиоцитах бронхов, альвеолоцитах II порядка и сосудистом эндотелии. При переходе воспаления в стадию пролиферации и фиброобразования активность ACE2 восстанавливалась.

Вывод. Обнаруженное фазное изменение активности ACE2 может обуславливать волнообразное рецидивирующее течение коронавирусной инфекции, поскольку увеличение количества белка ACE2 при затухании острого воспаления способствует увеличению инфицирования клеток-мишеней.

Ключевые слова: экспериментальная бронхопневмония, ангиотензин-превращающий фермент-2, иммуногистохимия.

ACTIVITY OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME-2 IN ACUTE PULMONARY INFLAMMATION

¹Ziablitsev D.S., ²Dyadyk O.O., ¹Ziablitsev S.V.¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine²Shupik National University of Healthcare of Ukraine, Kyiv, Ukraine

dzablicev8@gmail.com

Relevance. Angiotensin converting enzyme-2 (ACE2), which is the gateway to coronavirus, is also an important component of the tissue renin-angiotensin system with a number of anti-inflammatory effects. It is known that ACE2 is expressed in the lungs of patients with coronavirus pneumonia, but it is not clear how this depends on the stages of development and the severity of inflammation.

Objective: to establish the effect of acute inflammation on pulmonary expression of angiotensin-converting enzyme-2.

Material and methods. In Wistar rats (n=20), in compliance with bioethical standards, a sterile nylon thread 2.5 cm long and 0.2 mm thick to a depth of 2.5 cm was introduced into the trachea. The animals were observed and removed from the experiment at 7, 14, 21 and 28 days, microscopic and immunohistochemical (monoclonal antibodies against ACE2; clone 4G5.1; EMD Millipore Corporation; Temecula, CA US) studies were performed.

Results. The microscopic picture of the lungs indicated the development of acute bronchopulmonary inflammation during the first week, the formation of peribronchial and alveolar abscesses in the second week with the onset of resolution of bronchopneumonia with the organization of abscesses in the third week and the development of diffuse fibrosis of the parenchyma and vascular hyalinosis in the fourth week of observation. The exudative phase of acute inflammation was accompanied by inhibition of ACE2 activity in bronchial epithelial cells, type II alveolocytes and vascular endothelium. With the transition of inflammation to the stage of proliferation and fibrosis, ACE2 activity was restored.

Conclusion. The detected phase change in ACE2 activity can cause a wavy recurrent course of coronavirus infection, since an increase in the amount of ACE2 protein during attenuation of acute inflammation contributes to an increase in target cell infection.

Key words: experimental bronchopneumonia, angiotensin-converting enzyme-2, immunohistochemistry.

ОЦІНКА ЛІКУВАЛЬНОГО ЕФЕКТУ КОМБІНОВАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ ТА ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ РЕВМАТОЇДНОМУ АРТРИТІ ЗА ГЕМАТОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ

Гладких Ф.В. <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України,
Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна*

fedir.hladkykh@gmail.com

Актуальність. Кріоконсервованій екстракт плаценти (КЕП) підвищує стійкість слизової оболонки шлунково-кишкового тракту до пошкоджуючої дії нестероїдних протизапальних засобів. Превентивне введення КЕП послаблює ульцерогенну дію мелоксикаму, ібупрофену, диклофенаку натрію (ДН) та ін. Найвні дані про власну протизапальну активність КЕП, що може вдало поєднуватись із фармакологічними властивостями нестероїдних протизапальних засобів, покращуючи при цьому їх профіль безпечності.

Ціль: охарактеризувати лікувальну активність комбінованого застосування КЕП та ДН за даними гематологічних показників на моделі експериментального ревматоїдного артрити (РА).

Матеріали та методи. Дослідження проведені на 28 нелінійних лабораторних щурах. Щурів розділили на 4 групи: I (n=7) – інтактні щури; II (n=7) – щури з експериментальним РА; III (n=7) – щури з експериментальним РА, ліковані ДН; IV (n=7) – щури з експериментальним РА, ліковані ДН та КЕП. Ад'ювантний артрит моделювали шляхом субплантарного введення повного ад'юванту Фрейнда. Лікування проводили з 14 по 28 день. КЕП вводили на 14, 17, 20, 23 та 26 дні, ДН – щоденно. Дослідження крові проводили на 28 добу експерименту.

Результати. Комбіноване застосування КЕП та ДН супроводжується більш виразним нівелюванням ознак запалення з боку гематологічних показників – швидкість зсідання еритроцитів знизилась на 72,2 % ($p < 0,001$), а кількість лейкоцитів зменшилась на 54,8 % ($p < 0,001$) відносно показників щурів з ад'ювантним артритом без лікування. Відбулося нівелювання ознак анемії хронічного запалення – рівень гемоглобіну та еритроцитів збільшився ($p < 0,001$) на 17,6 % і 36,8 %, відповідно, щодо показників щурів з ад'ювантним артритом без лікування.

Висновки. Комбіноване застосування КЕП та ДН переважає за лікувальною активністю монотерапію вказаним нестероїдним протизапальним препаратом експериментального ревматоїдного артрити.

Ключові слова: кріоконсервованій екстракт плаценти, диклофенак натрію, нестероїдні протизапальні засоби, анемія хронічного запалення.

Актуальність. У світі ревматоїдний артрит (РА) має непересічне медико-соціальне значення, оскільки за відсутності ефективного лікування призводить до швидкої інвалідизації та скорочення тривалості життя пацієнтів [1, 2]. В Україні поширеність РА становить 340 випадків на 100 тис. дорослого населення, причому хвороба вражає переважно людей працездатного віку (20-50 років), що призводить до частої і тривалої госпіталізації. Лікування хворих на РА має бути комплексним із застосуванням різних груп лікарських засобів, локальної терапії, екстракорпоральних методів терапії, а за необхідності – хірургічної корекції суглобів, медичної і соціальної реабілітації [3, 4, 5].

На сьогоднішній день в лікуванні хворих на захворювання кістково-м'язової системи та сполучної тканини, зокрема артритів – остеоартриту, спонділоартриту, РА та ін., широко застосовуються нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ). Це обумовлено унікальним поєднанням протизапального, знеболюючого, жарознижуючого та антитромботичного ефектів, які

вдало перекривають практично увесь спектр симптомів, які характерні для ревматичних захворювань.

Проте, у всіх представників НПЗЗ є суттєвий недолік, який значно знижує їх терапевтичний потенціал, – можливість розвитку «клас-специфічних» небажаних реакцій [6, 7]. Відомо, що побічні ефекти НПЗЗ здебільшого обумовлені пригніченням ізоферменту циклооксигенази (ЦОГ) першого типу, внаслідок чого порушується синтез простагландинів E₂ та I₂, що обумовлює їх ульцерогенну дію на шлунково-кишковий тракт (ШКТ), порушення клубочкової фільтрації та секреції реніну та ін. Крім того, інгібування ЦОГ-шляху метаболізму арахідонової кислоти викликає гіперактивацію ліпооксигеназного та, як наслідок, – гіперпродукцію лейкотрієнів, які здатні викликати бронхоспазм та інші реакції гіперчутливості, інгібувати синтез тромбоксану A₂ і, відповідно – викликати підвищення ризику розвитку кровотеч [8].

Оскільки переважна більшість хворих на ревматичні захворювання потребує тривалого або пожит-

тевого застосування НПЗЗ, а кількість таких хворих прогресивно зростає через тенденцію до постаріння населення, то проблема покращення профілю безпечності вказаних препаратів привертає все більшу увагу дослідників у всьому світі [9]. Найзагрозливішим з усіх небажаних реакцій НПЗЗ по праву виступає їх токсична дія на слизову оболонку ШКТ. Відомо, що застосування НПЗЗ підвищує ризик ерозивно-виразкових ушкоджень ШКТ у 2-5 рази, а ризик перфорації або кровотеч – у 8 разів [5, 6].

У якості засобу, спроможного підвищувати стійкість слизової оболонки ШКТ до пошкоджуючої дії НПЗЗ, нашу увагу привернув вітчизняний біотехнологічний засіб – кріоконсервованій екстракт плаценти (КЕП) людини, який було створено науковцями Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (ІПКіК НАН України). Попередні дослідження показали, що превентивне введення КЕП може послаблювати ульцерогенну дію мелоксикаму та ін. [9]. В той же час в літературі наявні дані про власну протизапальну активність КЕП, що може вдало поєднуватись із фармакологічними властивостями НПЗЗ, покращуючи при тому його профіль безпечності.

Ціль: охарактеризувати лікувальну активність комбінованого застосування кріоконсервованого екстракту плаценти та диклофенаку натрію за даними гематологічних показників на моделі експериментального ревматоїдного артриту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 28 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200-220 г, які утримувались в умовах віварію ІПКіК НАН України, розділених на 4 групи:

I – інтактні щури (n=7);

II група (контрольна група) – щури з експериментальним РА (n=7);

III група (n=7) – щури з експериментальним РА, ліковані диклофенаком натрію (ДН);

IV група (n=7) – щури з експериментальним РА, ліковані ДН та КЕП.

Модель хронічного імунного запалення. Для відтворення умов введення щурам НПЗЗ, відповідних їх клінічному застосуванню, нами було обрано модель експериментального РА – ад'ювантний артрит (АА) у щурів, яка має всі морфофункціональні ознаки РА та супроводжується типовою реакцією, основною ланкою якої є Т-клітинний імунітет. АА моделювали шляхом субплантарного введення повного ад'юванту Фрейнда (ПАФ) (Thermo Fisher Scientific, США) в задню праву кінцівку з розрахунку 0,1 мл на щура [10]. ПАФ вміщує вакцину БЦЖ (*BCG – Bacillus Calmette-Guerin*), або полісахариди, отримані з мікобактерій туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*), складні жирні кислоти (деривати ланоліну), олії та

емульгатор у співвідношенні: 10 мл ПАФ = 5 мл безводного ланоліну + 15 мл вазелінової олії + 50 мг вбитої нагріванням вакцини БЦЖ. Використання ПАФ сприяє індукції гіперчутливості уповільненого типу та розвитку аутоімунних процесів. Гостра фаза запального аутоімунного процесу триває до 14 доби, далі спостерігається генералізація (або маніфестація) АА, що характеризується розповсюдженням набряків на численні суглоби, в тому числі – суглоби контрлатеральної лапи, ураженням різних органів та систем, проявами морфофункціональних змін. З 28-30 доби відбувається хронізація запального процесу. День введення ад'юванту вважали як «0» день експерименту.

Режим застосування і дозування досліджуваних препаратів. Лікування АА проводилось з 14 по 28 день. Препарат КЕП «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» (ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини», Україна), згідно інструкції, застосовується у пацієнтів парентерально в разовій дозі 1,8 мл. Відповідно разова доза для щурів становить: $(1,8 \text{ мл} / 70 \text{ кг}) \times 6,35 = 0,16 \text{ мл/кг}$ маси тіла [10, 11]. Перед застосуванням препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» разову дозу (0,16 мл/кг) екстемпорально (*ex tempore* – за потребою) розводили у 0,9 % розчині NaCl (Дарниця, Україна) з розрахунку 0,1 мл 0,9 % NaCl / 100 г маси тіла та вводили внутрішньом'язово (в/м). КЕП по 0,16 мл/кг маси тіла вводили в/м з інтервалом 2 дні (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 14, 17, 20, 23 та 26 дні, що відповідало інструкції до його клінічного застосування – в/м по 1,8 мл з інтервалом 2-3 доби курсом 1-5 ін'єкцій [12].

Диклофенак натрію (Здоров'я, Україна) вводили щоденно внутрішньошлунково (в/шл) в дозі, яка дорівнювала ЕД50 за протизапальною активністю – 8 мг/кг у вигляді емульсії на полісорбаті Twin-80 [13]. Зазначена доза відповідає разовій дозі для людини 88 мг (1,25 мг/кг), що узгоджується з клінічними рекомендаціями про використання ДН у хворих по 75-100 мг/добу при його тривалому застосуванні та у 1,7 рази нижче за його максимальну добову дозу 150 мг [13].

На 28 добу тварин виводили з експерименту. Зразки змішаної (венозної та артеріальної) крові після декапітації тварин відбирали у пробірки з попередньо внесеним антикоагулянтом (двох-заміщеною калійною сіллю етилен-діаміно-тетраоцтової кислоти – K2 EDTA). Гематологічні дослідження проводили із визначенням наступних показників: еритроцити ($\times 10^{12}/\text{л}$), гемоглобін (г/л), тромбоцити ($\times 10^9/\text{л}$), швидкість зсідання еритроцитів (ШОЕ, мм/год.), лейкоцити ($\times 10^9/\text{л}$) з лейкоцитарною формулою (гранулоцити, лімфоцити, моноцити, %).

Біоетичні аспекти дослідження. Всі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами виконано з урахуванням вимог належної лабораторної

практики «GLP» (Good Laboratory Practice), відображених в настанові «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затвердженій Наказом МОЗ України № 95 від 16 лютого 2009 р. і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18 березня 1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, Наказу МОЗ України № 944 від 14 грудня 2009 р. «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». До початку експерименту щури впродовж 14 діб перебували в умовах карантину (Наказ № 755 від 12.08.1997 р. «Структура та утримання експериментальних біологічних клінік»), після чого проводилась рандомізація на групи по 7 особин в кожній із подальшим утриманням в умовах стандартного водно-харчового раціону (Наказ № 163 від 10.03.1996 р. «Про добові норми годування лабораторних тварин та продуцентів») з вільним доступом (*ad libitum*) до води та їжі [10].

Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комітетом з біоетики при ІПКіК НАН України (Протокол № 2 від 11 березня 2020 р.).

Статистична обробка результатів. Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel 2003; 2013» (Microsoft Corporation, CLIA) за допомогою розширення «Real Statistics» (<http://www.real-statistics.com/>). Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію Шапіро-Вілкі (*Shapiro-Wilk test*, $n < 50$). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (*Levene's test*). Для оцінки значущості виявлених відмінностей досліджуваних показників за різних умов експерименту проводили статистичний аналіз з використанням параметричних або непараметричних критеріїв.

При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t-критерієм Ст'юдента. При ненормальному розподілі принаймні однієї з груп незалежних величин відмінності між ними визначали попарно за непараметричним ранговим U – критерієм Манна-Уїтні (*Mann-Whitney*).

Вірогідність відмінностей між відсотковими частками якісних параметрів в альтернативній формі визначали за значенням F-критерію кутового перетворення Фішера (*F-test*). Отримані значення порівнювали з критичними значеннями при рівні вірогідності вище 95,0 % ($p \leq 0,05$) та вище 99,0 % ($p \leq 0,01$).

Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді $M \pm m$ ($M \pm SE$), де M – се-

реднє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного, або M (95 % ДІ: 5% – 95%), де 95 % ДІ: – 95 % довірчий інтервал (Confidence interval – CI). При ненормальному розподілі отриманих величин дані представлено у вигляді Me [LQ; UQ], де Me – медіана, [LQ; UQ] – верхня межа нижнього (першого) квартиля (lower quartile – LQ) та нижня межа верхнього (третього) квартиля (upper quartile – UQ) [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На 28 день експерименту на тлі розвитку системного аутоімунного запалення у щурів відмічено статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання ШОЕ у 4,5 рази, та кількості лейкоцитів у 2,4 рази відносно показників інтактних щурів. Ці показники становили відповідно 18,0 [15,5; 22,5] мм/год та $16,4 \pm 0,9 \times 10^9$ /л (рис. 1, 2).

Монотерапія ДН призвела до статистично вірогідного ($p < 0,01$) зниження ШОЕ на 50,0 % та кількості лейкоцитів на 29,4 % ($p < 0,01$) відносно показників щурів контрольної групи. Комбіноване застосування ДН та КЕП призвело до найвиразнішої регресії гематологічних показників запалення – ШОЕ знизилась на 72,2 % ($p < 0,001$), а кількість лейкоцитів – зменшилась на 54,8 % ($p < 0,001$) відносно показників щурів з АА без лікування (рис. 1, 2).

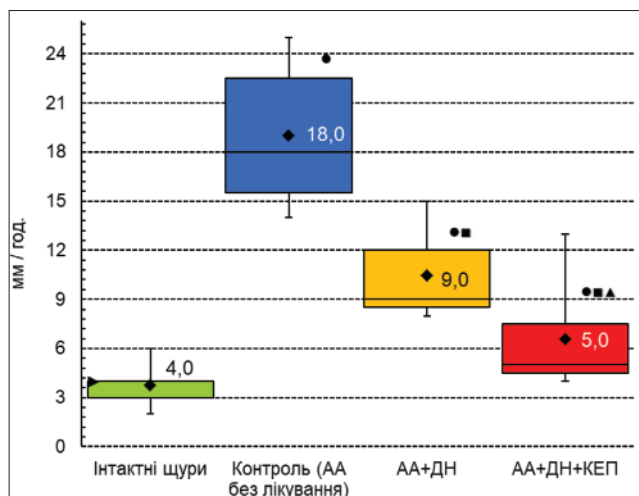


Рис. 1. Вплив ДН та його комбіації з КЕП на ШОЕ в периферичній крові у щурів з АА на 28 добу експерименту

Примітки. Розподіл величин ненормальний. Бокси включають результати від 25-го до 75-го перцентилію, вертикальні лінії за межами боксів – мінімальне та максимальне значення. Горизонтальна лінія всередині боксу – медіана (▶ – медіана дорівнює 25 (75) перцентилію, ◆ – середнє значення; ● – $p < 0,05$ відносно показників інтактних щурів, ■ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з АА без лікування; ▲ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з АА лікованих ДН.

Оцінка змін з боку лейкоцитарної формули показала, що на тлі розвитку АА у щурів відмічено статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання долі грануло-

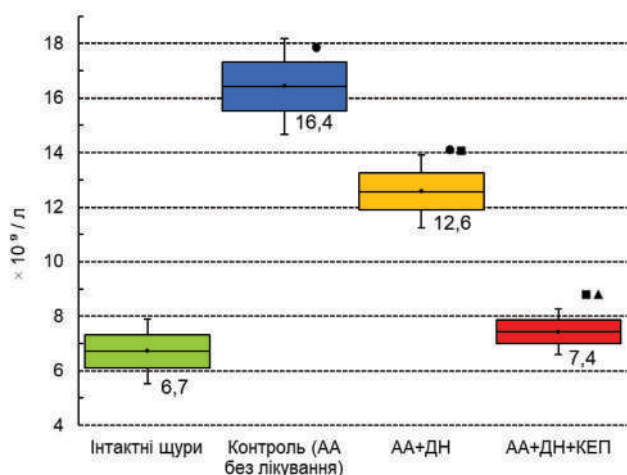


Рис. 2. Вплив ДН та його комбіації з КЕП на кількість лейкоцитів в периферичній крові у щурів з АА на 28 добу експерименту

Примітки. Розподіл величин кожної групи вибіркової сукупності нормальний. Бокси включають значення стандартної похибки середнього арифметичного, вертикальні лінії за межами боксів – 95 % довірчий інтервал. Горизонтальна лінія всередині боксу – середнє арифметичне значення; ● – $p < 0,05$ відносно показників інтактних щурів; ■ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з АА без лікування; ▲ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з АА лікованих ДН.

цитів у 2,1 рази та пропорційне зниження кількості лімфоцитів ($p < 0,001$) в 1,6 рази відносно показників інтактних щурів. Застосування ДН та ДН з КЕП призводило до відновлення пропорційності лейкоцитарної формули – на тлі комбінованого застосування ДН з КЕП доля гранулоцитів практично співставлялась з показниками інтактних тварин та становила відповідно $24,1 \pm 1,8$ % та $21,9 \pm 0,9$ % (табл. 1).

Встановлено, що розвиток АА у щурів супроводжується статистично вірогідним ($p < 0,001$) зниженням вмісту гемоглобіну на 14,7 % щодо показників інтактних щурів, рівень гемоглобіну склав відповідно

$121,0 \pm 3,08$ г/л (табл. 2), а також зниженням кількості еритроцитів на 28,8 %.

Монотерапія ДН призвела до статистично вірогідного збільшення рівня гемоглобіну ($p < 0,01$) на 8,6 %, а також до збільшення кількості еритроцитів ($p = 0,01$) на 19,3 % щодо показників тварин контрольної групи.

Комбіноване застосування ДН і КЕП призвело до повного нівелювання ознак анемії хронічного запалення – рівень гемоглобіну та еритроцитів статистично достовірно ($p < 0,001$) збільшився на 17,6 % і 36,8 %, відповідно, щодо показників щурів з АА без лікування.

Виявлені зміни узгоджуються з даним літератури, що анемія при РА вважається симптомом основного запального захворювання [14, 15]. Хоча запалення відіграє домінуючу роль в патогенезі цього виду анемії, участь в її розвитку можуть брати й інші чинники, такі як хронічна втрата крові з виразкових дефектів слизової оболонки, викликаних прийомом НПЗЗ. Відповідно, поширеність анемії безпосередньо пов'язана з тяжкістю основного захворювання і тривалістю прийому нестероїдних препаратів [16].

Результати ряду досліджень показали, що розвиток анемії при РА може бути пов'язаний зі здатністю прозапальних цитокінів порушувати утворення еритроцитів [16]. Одним з механізмів цього може бути перерозподіл заліза – зниження кількості Fe^{2+} , необхідного для синтезу гему в сироватці крові при достатньому його вмісті в депо. Під впливом прозапальних цитокінів – інтерлейкіну (ІЛ)-1 і фактора некрозу пухлини α відбувається надмірна активація сидерофагів, при якій посилюється фагоцитоз і блокується їх здатність передачі заліза в еритроблестах [14, 15, 16]. ІЛ-6 є основним індуктором синтезу гепсидину, що є негативним регулятором як вивільнення заліза з макрофагів, так і всмоктування заліза

Таблиця 1

Вплив диклофенаку натрію та його комбіації з кріоконсервованим екстрактом плаценти на показники лейкоцитарної формули периферичної крові щурів з ад'ювантним артритом на 28 добу експерименту,

Група		Показник, $M \pm m$ (95% ДІ)		
		Гранулоцити, %	Лімфоцити, %	Моноцити, %
I	Інтактні щури (n=7)	$21,9 \pm 0,91$ (95% ДІ: 20,1-23,6)	$70,6 \pm 0,72$ (95% ДІ: 69,2-72,0)	$7,6 \pm 0,65$ (95% ДІ: 6,3-8,8)
II	Контроль (АА без лікування) (n=7)	$46,4 \pm 1,04$ (95% ДІ: 44,4-48,5) $p_{1-2} < 0,001$	$43,6 \pm 1,13$ (95% ДІ: 41,4-45,8) $p_{1-2} < 0,001$	$10,0 \pm 1,41$ (95% ДІ: 7,2-12,8) $p_{1-2} = 0,14$
III	АА + ДН (n=7)	$33,4 \pm 1,80$ (95% ДІ: 29,9-37,0) $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	$56,7 \pm 1,19$ (95% ДІ: 54,4-59,0) $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	$9,9 \pm 2,29$ (95% ДІ: 5,4-14,4) $p_{1-3} = 0,36$ $p_{2-3} = 0,96$
IV	АА + ДН + КЕП (n=7)	$24,1 \pm 1,81$ (95% ДІ: 20,6-27,7) $p_{1-4} = 0,3$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,01$	$63,9 \pm 0,91$ (95% ДІ: 62,1-65,6) $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$	$12,0 \pm 1,65$ (95% ДІ: 8,8-15,2) $p_{1-4} = 0,03$ $p_{2-4} = 0,38$ $p_{3-4} = 0,46$

Вплив диклофенаку натрію та його комбінації з кріоконсервованим екстрактом плаценти на рівень гемоглобіну та кількість еритроцитів і тромбоцитів периферичної крові щурів з ад'ювантним артритом на 28 добу експерименту

Група		Показник		
		Гемоглобін, г/л M±m (95% ДІ)	Еритроцити, ×10 ¹² /л Me [LQ; UQ]	Тромбоцити, ×10 ⁹ /л Me [LQ; UQ]
I	Інтактна (n=7)	141,9±2,23 (95% ДІ: 137,5-146,2)	8,0 [5,5; 9,1]	178 [175; 179]
II	Контроль (АА без лікування) (n=7)	121,0±3,08 (95% ДІ: 126,1-136,8) p ₁₋₂ < 0,001	5,7 [4,9; 6,2] p ₁₋₂ = 0,07	189 [188; 191] p ₁₋₂ < 0,001
III	АА + ДН (n=7)	131,4±2,72 (95% ДІ: 126,1-136,8) p ₁₋₃ < 0,01 p ₂₋₃ = 0,03	6,8 [6,3; 7,1] p ₁₋₃ = 0,3 p ₂₋₃ = 0,01	180 [179; 182] p ₁₋₃ = 0,06 p ₂₋₃ < 0,01
IV	АА + ДН + КЕП (n=7)	142,3±3,75 (95% ДІ: 134,9-149,6) p ₁₋₄ = 0,9 p ₂₋₄ < 0,001 p ₃₋₄ = 0,04	7,8 [7,6; 8,5] p ₁₋₄ = 0,4 p ₂₋₄ < 0,001 p ₃₋₄ < 0,001	173 [171; 175] p ₁₋₄ = 0,048 p ₂₋₄ < 0,001 p ₃₋₄ < 0,01

в тонкій кишці. Результатом дії гепсидину є блокада заліза в клітинах системи мононуклеарних фагоцитів, гепатоцитах та ентероцитах, порушення передачі заліза трансферину і швидкий розвиток гіпоферремії. Таким чином, проблема хронічного запалення – це надпродукція гепсидину, який порушує нормальний метаболізм заліза, що в кінцевому підсумку призводить до розвитку анемії [15, 16].

ВИСНОВКИ

Комбіноване застосування кріоконсервованого екстракту плаценти та диклофенаку натрію супроводжується більш виразним нівелюванням ознак запалення з боку гематологічних показників – швидкість зсідання еритроцитів знизилась на 72,2 % (p<0,001), а кількість лейкоцитів зменшилась на 54,8 % (p<0,001) відносно показників щурів з ад'ювантним артритом без лікування. Відбулося нівелювання ознак анемії хронічного запалення – рівень гемоглобіну та еритроцитів збільшився (p<0,001) на 17,6 % і 36,8 %, відповідно, щодо показників щурів з ад'ювантним артритом без лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи відділу експериментальної кріомедицини ІПКіК НАН України «Деструктивні та відновні процеси в тканинах *in vivo* після дії низьких температур та біологічно активних речовин» (№ 2.2.6.113, шифр 2.2.6.113, номер державної реєстрації 0117U001049, термін виконання: 2017-2021 рр.

Конфлікт інтересів. Автор рукопису свідомо за-свідчує відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чиї

продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Інформація про фінансування. Фінансування видатками Державного бюджету України.

REFERENCES

- Anikin GS, Stozhkova IV, Kukes VG. NSAIDs: safety from the point of evidence-based medicine. *Consilium Medicum*. 2017; 19: 28-32. [in Ukrainian] DOI: 10.26442/2075-1753_19.7.2.28-32
View at: Cyberleninka: <https://cyberleninka.ru/article/n/nesteroidnye-protivovospalitelnye-preparaty-bezopasnost-s-pozitsii-dokazatelnoy-meditsiny>
URL: <https://omnidocor.ru/upload/iblock/8d2/8d2f-96c2485deaf5dc49676a474b6b90.pdf>
- Wasserman A. Rheumatoid Arthritis: Common Questions About Diagnosis and Management. *American Family Physician*. 2018;97(7):455-62.
View at: Publisher Site: <https://familydoctor.org/condition/rheumatoid-arthritis/>
Semanticscholar: <https://www.semanticscholar.org/paper/Rheumatoid-Arthritis%3A-Common-Questions-About-and-Wasserman/ad88a50ea1281388fc02bad089055e2f142657e3>
- Woude D, Helm-van Mil HM. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2018; 32 (2): 174-87. DOI: 10.1016/j.berh.2018.10.005.
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521694218300688?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30527425/>
- Otón T, Carmona L. The epidemiology of established rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical*

- Rheumatology. 2019; 33 (5): 101477. DOI: 10.1016/j.berh.2019.101477.
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521694219301731?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31987685/>
5. Ghosh N, Kolade OO, Shontz E, Rosenthal Y, Zuckerman JD, Bosco JA 3rd, Virk MS. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Their Effect on Musculoskeletal Soft-Tissue Healing: A Scoping Review. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2019; 7 (12): e4. DOI: 10.2106/JBJS.RVW.19.00055.
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/jbjsreviews/Abstract/2019/12000/Nonsteroidal_Anti_Inflammatory_Drugs_NSAIDs_and.2.aspx https://journals.lww.com/jbjsreviews/Abstract/2019/12000/Nonsteroidal_Anti_Inflammatory_Drugs_NSAIDs_and.2.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31851037/>
 6. Cunningham K, Candelario DM, Angelo LB. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Updates on Dosage Formulations and Adverse Effects. *Orthopaedic Nursing*. 2020; 39 (6):408-13. DOI: 10.1097/NOR.0000000000000713.
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/orthopaedicnursing/Abstract/2020/11000/Nonsteroidal_Anti_Inflammatory_Drugs_Updates_on.12.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33234913/>
 7. Satybaldyev AM, Karateev AE. What is safer for the gastrointestinal-tract: Coxibs or meloxicam? *Modern Rheumatology*. 2017; 11 (1): 72-8. [in Russian]. DOI: 10.14412/1996-7012-2017-1-72-78.
View at: Publisher Site: <https://mrj.ima-press.net/mrj/article/view/742>
Cyberleninka: <https://cyberleninka.ru/article/n/chto-bezopasnee-dlya-zheludochno-kishechno-trakta-koksiby-ili-meloksikam>
 8. Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2012; 11 (1): 52-64. DOI: 10.2174/187152312803476255.
View at: Publisher Site: <https://www.eurekaselect.com/102932/article>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22934743/>
 9. Hladkykh FV, Chyzh MO. Modulation of meloxicam-induced changes in gastrointestinal and motor activity of the stomach by applying placenta cryoextract. *Proceedings of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences*. 2021; 64 (1): 84-94. DOI: 10.25040/ntsh2021.01.08.
View at: Publisher Site: <https://mspss.org.ua/index.php/journal/article/view/400>
 10. Stefanov OV. Preclinical studies of drugs: guidelines. Kyiv: Avicenna; 2001. 527 p. [in Ukrainian].
View at: Publisher Site: <https://www.twirpx.com/file/537410/>
 11. Rybolovlev UR, Rybolovlev RS. Dosage of substances for mammals by constants of biological activity. *Reports of the USSR Academy of Sciences*. 1979; 247 (6): 1513-6. [in Russian].
 12. Goltsev AN, ed. *Placenta: cryopreservation, clinical use*. Kharkiv, 2013. 268 p. [in Russian].
View at: URL: <http://elib.umsa.edu.ua/jspui/bitstream/umsa/3692/3/kniga.pdf>
 13. Karateev AE, Nasonov EL, Ivashkin VT, Martynov AI, Yakhno NN, Arutyunov GP, Alekseeva LI, Abuzarova GR, Evseev MA, Kukushkin ML, Kopenkin SS, Lila AM, Lapina TL, Novikova DS, Popkova TV, Rebrov AP, Skorobogatykh KV, Chichasova NV. Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical guideline. Rheumatology Science and Practice*. 2018; 56: 1-29. [in Russian]. DOI: 10.14412/1995-4484-2018-1-29.
View at: Publisher Site: <https://rsp.mediar-press.net/rsp/article/view/2536>
 14. Chen Y, Xu W, Yang H, Shao M, Xu S, Deng J, Gao X, Liu H, Shuai Z, Xu S, Pan F. Serum Levels of Hepcidin in Rheumatoid Arthritis and Its Correlation with Disease Activity and Anemia: A Meta-analysis. *Immunological Investigations*. 2021; 50 (2-3): 243-58. DOI: 10.1080/08820139.2020.1742731.
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08820139.2020.1742731?journalCode=iimm20>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32216485/>
 15. Sato H, Takai C, Kazama JJ, Wakamatsu A, Hasegawa E, Kobayashi D, Kondo N, Nakatsue T, Abe A, Ito S, Ishikawa H, Kuroda T, Suzuki Y, Narita I. Serum hepcidin level, iron metabolism and osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 9882. DOI: 10.1038/s41598-020-66945-3.
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-66945-3>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3255299/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7303107/>
 16. Sahebari M, Rezaieyazdi Z, Hashemy SI, Khorasani S, Shahgordi S, Alizadeh MK, Ghaeni A, Khodashahi M. Serum hepcidin level and rheumatoid arthritis disease activity. *European Journal of Rheumatology*. 2018; 6 (2): 76-80. DOI: 10.5152/eurjrheum.2018.18114.
View at: Publisher Site: <https://eurjrheumatol.org/en/serum-hepcidin-level-and-rheumatoid-arthritis-disease-activity-133197>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31365340/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6467328/>

Article history

Received: 21.07.2021

Revision requested: 12.08.2021

Revision received: 10.09.2021

Accepted: 24.09.2021

Published: 30.09.2021

ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНОГО ЭФФЕКТА КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ И ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ ПО ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

Гладких Ф.В.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины,
Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии и онкологии им. С.П. Григорьева
Национальной академии медицинских наук Украины», Харьков, Украина*

fedir.hladkykh@gmail.com

Актуальность. Криоконсервированный экстракт плаценты (КЭП) повышает устойчивость слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта к повреждающему действию нестероидных противовоспалительных средств. Превентивное введение КЭП ослабляет ulcerогенное действие мелоксикама, ибупрофена, диклофенака натрия (ДН) и др. Есть данные о собственной противовоспалительной активности КЭП, что может удачно сочетаться с фармакологическими свойствами нестероидных противовоспалительных средств, улучшая при этом их профиль безопасности.

Цель: охарактеризовать лечебную активность комбинированного применения КЭП и ДН по данным гематологических показателей на модели экспериментального ревматоидного артрита (РА).

Материалы и методы. Исследования проведены на 28 нелинейных лабораторных крысах. Крыс разделили на 4 группы: I (n = 7) – интактные крысы; II (n = 7) – крысы с экспериментальным РА; III (n = 7) – крысы с экспериментальным РА, леченые ДН; IV (n = 7) – крысы с экспериментальным РА, леченые ДН и КЭП. Адьювантный артрит моделировали путем субплантарного введения полного адьюванта Фрейнда. Лечение проводили с 14 по 28 день. КЭП вводили в 14, 17, 20, 23 и 26 дни, ДН – ежедневно. Исследование крови проводили на 28 сутки эксперимента.

Результаты. Комбинированное применение КЭП и ДН сопровождается более выразительным нивелированием признаков воспаления со стороны гематологических показателей – скорость оседания эритроцитов снизилась на 72,2 % (p<0,001), а количество лейкоцитов уменьшилось на 54,8 % (p<0,001) относительно показателей крыс с адьювантным артритом без лечения. Произошло нивелирование признаков анемии хронического воспаления – уровень гемоглобина и эритроцитов увеличился (p<0,001) на 17,6% и 36,8%, соответственно, относительно показателей крыс с адьювантным артритом без лечения.

Выводы. Комбинированное применение КЭП и ДН превосходит по лечебной эффективности монотерапию указанным нестероидным противовоспалительным препаратом экспериментального ревматоидного артрита.

Ключевые слова: криоконсервированный экстракт плаценты, диклофенак натрия, НПВП, анемия хронического воспаления

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECT OF THE COMBINED USE OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT AND DICLOFENAC SODIUM IN EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS BY HEMATOLOGICAL PARAMETERS

Hladkykh F. V.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
State of Organization «Grigoriev Institute of Medical Radiology and Oncology of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine*

fedir.hladkykh@gmail.com

Relevance. Cryopreserved placenta extract (CPE) increase the resistance of the mucous membrane of the gastrointestinal tract to the damaging effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Preventive administration of CPE can reduce the ulcerogenic effect of meloxicam, ibuprofen, diclofenac sodium (DS) and others. There is evidence of CPE's own anti-inflammatory activity, which can be successfully combined with the pharmacological properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, while improving their safety profile.

Objective: to characterize the therapeutic activity of the combined use of CPE and DS according to hematological parameters in the model of experimental rheumatoid arthritis (RA).

Materials and methods. Studies were performed on 28 nonlinear laboratory rats. The rats were divided into 4 groups: I (n = 7) – intact rats; II (n = 7) – rats with experimental RA; III (n = 7) – rats with experimental RA, treated with DN; IV (n = 7) – rats with experimental RA, treated with DN and CPE. Adjuvant arthritis was modeled by subplantar administration of complete Freund's adjuvant. Treatment was performed from 14 to 28 days. CPE was administered on days 14, 17, 20, 23 and 26, and DS – daily. Blood tests were performed on day 28 of the experiment.

Results. The combined use of CPE and DS is accompanied by a more pronounced leveling of inflammatory signs by hematological parameters – erythrocyte clotting rate decreased by 72.2% (p<0.001), and the number of leukocytes decreased by 54.81% (p<0.001) relative to rats with adjuvant arthritis without treatment. There was a leveling of signs of anemia of chronic inflammation – the level of hemoglobin and erythrocytes increased (p<0,001) by 17.6% and 36.8%, respectively, relative to rats with adjuvant arthritis without treatment.

Conclusions. The combined use of CPE and DS is superior in therapeutic activity to monotherapy with this nonsteroidal anti-inflammatory drug of experimental rheumatoid arthritis.

Keywords: cryopreserved placenta extract, diclofenac sodium, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, chronic inflammatory anemia

РЕЗУЛЬТАТИ ПОШУКУ ЛАБОРАТОРНИХ ОЗНАК АВТОІМУННИХ РЕАКЦІЙ ДО МОЗКОВИХ ТА ПОЗАМОЗКОВИХ АВТОАНТИГЕНІВ У ДІТЕЙ З РОЗЛАДАМИ СПЕКТРУ АУТИЗМУ, АСОЦІЙОВАНИМИ З ГЕНЕТИЧНИМ ДЕФІЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛУ

Мальцев Д.В. <https://orcid.org/0000-0002-6615-3072>

Інститут експериментальної і клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

dmaltsev@ukr.net

Актуальність. Результати п'яти мета-аналізів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень свідчать про асоціацію генетичного дефіциту фолатного циклу (ГДФЦ) і розладів спектру аутизму (РАС) у дітей. Особливу роль в патогенезі енцефалопатії у дітей з РАС, пов'язаними з ГДФЦ, відводять автоімунним механізмам.

Ціль: вивчити структуру автоімунних реакцій у дітей з РАС, пов'язаними з ГДФЦ, згідно з накопиченою дотепер доказовою базою, і вивчити асоціацію ознак автоімунітету з виявленими мікроорганізмами для покращання розуміння патогенезу енцефалопатії та удосконалення алгоритмів діагностики, моніторингу і лікування.

Матеріали і методи. Ретроспективно проаналізовано медичні дані 225 дітей віком від 2 до 9 років з ГДФЦ, у яких відзначалися клінічні прояви РАС (183 хлопчиків і 42 дівчинки). Діагноз РАС був виставлений дитячими психіатрами за критеріями DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) та ICD-10 (The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) (досліджувана група; ДГ). До контрольної групи (КГ) віднесли 51 клінічно здорову дитину (37 хлопчиків та 14 дівчаток) аналогічного вікового розподілу, які не страждали на ГДФЦ та РАС.

Патогенні поліморфні варіанти генів фолатного циклу визначали методом ПЛІР з рестрикцією (Сінево, Україна). Автоантитіла до антигенів нейронів підкіркових гангліїв ЦНС в сироватці крові визначали за допомогою панелі Каннігем (Moleculera Labs, Inc, США). Сироваткові автоантитіла до нейронів мезолімбічної системи ідентифікували за допомогою ELISA (MDI Limbach Berlin GmbH, Німеччина). Автоімунізацію до мієліну оцінювали за титром сироваткових автоантитіл до основного білку мієліна (ІФА) та ознаками сенсibilізації нейтрофілів та CD8+ Т-лімфоцитів до автоантигенів білої речовини півкуль (cell-based assay; лабораторія нейроімунології Інституту нейрохірургії НАМН України). Сироваткові автоантитіла до ядер клітин сполучної тканини та білків попереково-посмугованих м'язів визначали за допомогою вестерн-блот (Сінево; Україна). Для визначення вірогідності відмінностей між показниками у групах спостереження використовували параметричний Т-критерій Ст'юдента з показником довірчої ймовірності р та непараметричний критерій – число знаків Z за Урбахом Ю.В. Для вивчення асоціацій між досліджуваними показниками застосовували показник відношення шансів (odds ratio, OR) та 95% довірчий інтервал (95% CI).

Дослідження виконувалося як фрагмент науково-дослідної роботи на замовлення МОЗ України (№ держреєстрації 0121U107940).

Результати. Позитивні результати панелі Каннігем мали місце в 32%, лабораторні ознаки автоімунізації до нейронів мезолімбічної системи – 36%, до мієліну білої речовини півкуль – 43%, автоантигенів ядер клітин сполучної тканини – 53%, білків попереково-посмугованих м'язів – 48% випадків серед дітей ДГ (в цілому – 68% випадків; $p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Серологічні ознаки автоімунізації до автоантигенів підкіркових гангліїв півкуль великого мозку були асоційовані тільки зі *Streptococcus pyogenes* та *Yersinia*, до нейронів мезолімбічної системи – EBV, HHV-6, HHV-7, *Toxoplasma* та TTV, до мієліну ЦНС – EBV, HHV-6, HHV-7, *Yersinia* та TTV, до ядер клітин сполучної тканини та попереково-посмугованих м'язів – EBV, HHV-6, HHV-7, *Yersinia* та TTV.

Висновки. У дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, відзначаються лабораторні ознаки мікроб-індукованої автоімунізації до ряду мозкових та позамозкових автоантигенів, яка впливає на стан психічного і фізичного здоров'я пацієнтів і є потенційним об'єктом ефективних терапевтичних втручань.

Ключові слова: герпесвіруси, стрептокок, PANDAS, автоімунний лімбічний енцефаліт, антинуклеарні автоантитіла.

Актуальність. Результати п'яти мета-аналізів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень свідчать про асоціацію генетичного дефіциту фолатного циклу (ГДФЦ) і розладів спектру аутизму (РАС) у дітей [16, 24, 33, 34, 38]. Показано, що біохімічні порушення, викликані ГДФЦ, призводять до ураження імунної системи з індукцією імунодефіциту і пов'язаної з цим імунної дизрегуляції [23]. Як зазначають Hughes H.K. зі співавт., у систематичному огляді, присвяченому феномену порушення роботи імунної системи у дітей з РАС, в таких випадках від-

значається абберантний цитокіновий профіль, відхилення у абсолютній і відносній кількості імунокомпетентних клітин та їх субпопуляцій, ознаки нейрозапалення, порушення роботи системи адаптивного та природженого імунітету, дисбаланс імуноглобулінів різних класів та ознаки автоімунітету [14].

Наразі відомо щонайменше 3 незалежних імуноопосередкованих механізми ураження ЦНС при ГДФЦ, зумовлених персистуючою імунною дисфункцією, що роблять суттєвий внесок в формування енцефалопатії з клінічною картиною РАС. Йдеться про

розвиток нейротропних опортуністичних та умовно патогенних інфекцій [30], автоімунних реакцій до нейронів та мієліну півкуль великого мозку [5, 8, 44, 45], системного та пов'язаного з цим інтрацеребрального асептичного запалення, зумовленого імунною дизрегуляцією [22, 39]. Пригнічення або усунення імунозалежних механізмів пошкодження ЦНС видається перспективною стратегією лікування PAC у дітей з ГДФЦ [21].

Особливу роль в патогенезі енцефалопатії у дітей з PAC відводять автоімунним механізмам. Такі уявлення ґрунтуються на ряді наукових доказів.

По-перше, результати низки контрольованих клінічних досліджень вказують на аномальне виявлення у пацієнтів з PAC автоантитіл до нейронів ЦНС, валідованих раніше як маркери автоімунних енцефалітів, що не відзначаються у здорових дітей [4]. Так, Rout U.K. зі співавт. виявили автоантитіла до мозкового антигену GAD65 (GADA) серед дітей з аутизмом у 15% випадків, аутистичним спектром – у 27% випадків і в жодній здоровій дитини групи контролю [36]. Ці автоантитіла є визнаним лабораторним маркером так званого аутоімунного анти-GAD65 лімбічного енцефаліту, що приводить до розвитку ряду важких порушень психіки у дітей і дорослих [4, 29]. У той же час, Fyfe R.E. зі співавт. ідентифікували антитіла до рецепторів фолієвої кислоти нейронів головного мозку у дітей з PAC, що вказує на гетерогенність проявів антимозкового автоімунітету в таких випадках [8]. Cabanlit M. зі співавт. встановили асоціацію PAC і наявності автоантитіл до автоантигенів нейронів гіпоталамусу і таламусу [5].

По-друге, існує ряд описів гострого розвитку клінічних проявів PAC після початку верифікованого гострого аутоімунного лімбічного енцефаліту у дітей і досягнення клінічного поліпшення в результаті специфічного лікування аутоімунної хвороби. Так, González-Toro M.C. зі співавт. повідомили про два випадки аутоімунного анти-NMDA лімбічного енцефаліту у дітей, клінічні прояви яких відповідали симптомам PAC [12]. Kiani R. зі співавт. також доповіли про швидкий аутистичний регрес при розвитку аутоімунного анти-NMDA лімбічного енцефаліту у дитини [15].

По-третє, в експериментах на тваринах показана здатність антимозкових автоантитіл, які відзначаються у дітей з PAC, пошкоджувати головний мозок у піддослідних щурів, кроликів та мавп, індукуючи розлади поведінки, що нагадують прояви PAC у людей. Так, Gonzalez-Gronow M. зі співавт. показали, що каталітичні автоантитіла IgG і IgA, виділені з крові пацієнтів з аутизмом, порушують процеси гіпокампальної нейропластичності у щурів, індукуючи патологічний патоморфологічний феномен, подібний на скроневий медіанний склероз (mesial temporal sclerosis) [11], що відзначається у багатьох дітей з

PAC згідно з результатами клінічного дослідження Monge-Galindo L. зі співавт. [25]. В інших дослідженнях показано, що після введення автоантитіл, отриманих з крові дітей з PAC, у макак-резус розвиваються виразні поведінкові порушення, які дуже нагадують такі при аутизмі у людей [10]. Mostafa G.A., Al-Ayadhi L.Y. не тільки виявили підвищений титр автоантитіл до гангліозиду M1 нервової тканини у дітей з PAC, але і продемонстрували кореляцію між титром цих автоантитіл і важкістю психічних розладів у пацієнтів [27].

По-четверте, при PAC продемонстрували клінічну ефективність кількох препаратів з доведеною протизапальною та імунomodуючою дією, дані про які узагальнені в систематичному огляді Marchezan J. зі співавт. [21], включаючи інфліксимаб [19] та нормальний в/в імуноглобулін людини [20], механізм терапевтичного ефекту яких пов'язують саме з пригніченням антинейронального автоімунітету і пов'язаного з цим інтрацеребрального запалення в організмі пацієнта.

Опортуністичні та умовно патогенні мікроорганізми, які реактивуються в умовах імунодефіциту, викликаного ГДФЦ [23], можуть бути причетні до індукції антимозкового автоімунітету у дітей з розладами PAC за посередництвом феномену молекулярної мімікрії [9]. Moga M. зі співавт. в контрольованому дослідженні виявили аномально високі титри антитіл до вірусу простого герпесу 2 типу у дітей з PAC, які були асоційовані з автоантитілами до мозкових антигенів (77% – проти мигдалеподібного тіла, 70% – проти хвостатого ядра, 47,5% – проти мозочка і стовбура мозку, 45% – проти гіпокампів, 40% – проти мозолистого тіла і 17,5% – проти кори півкуль великого мозку) [26]. Singh V.K. зі співавт. встановили асоціацію високої серопозитивності до вірусу кори і вірусу герпесу 6 типу людини і аномально великого титру автоантитіл до основного білка мієліну та білку філаментів аксонів нейронів ЦНС у дітей з PAC [45]. В іншому дослідженні авторами показана перехресна реактивність між антикоровими та античерв'яковими антитілами та автоантитілами проти основного білка мієліну півкуль великого мозку у дітей з аутистичним синдромом [44]. Індукцію перехресно-реагуючих антитіл можуть провокувати різноманітні суперантигени мікроорганізмів в умовах імунодефіциту, зумовленого ГДФЦ [23]. Vojdani A. зі співавт. показали, що у дітей з PAC пептиди *Chlamydia pneumoniae*, M-протеїн стрептококів і бутірофілін молока призводять до продукції неповноцінних специфічних антитіл з перехресною реактивністю, здатних розпізнавати не тільки мікробні і харчові антигени, але і деякі молекули нервової тканини, зокрема – основний білок мієліну, мієлін-асоційований глікопротеїн, мієліновий олігодендроцитарний протеїн, білки нейрофіламентів і тубуліну [47].

Тому пошук ознак автоімунітету у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, є важливим завданням сучасної нейроімунології, вирішення якого може надати корисну інформацію про імунозалежні шляхи ураження ЦНС з формуванням клінічного фенотипу РАС та раціональні підходи до імуномодулюючого лікування для пригнічення антимозкових автоімунних реакцій з потенційними нейропротекторними ефектами у цих пацієнтів.

Ціль: вивчити структуру автоімунних реакцій у дітей з РАС, пов'язаними з ГДФЦ, згідно з накопиченою дотепер доказовою базою, і вивчити асоціацію ознак автоімунітету з виявленими мікроорганізмами для покращання розуміння патогенезу енцефалопатії та удосконалення алгоритмів діагностики, моніторингу і лікування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для досягнення поставленої мети ретроспективно проаналізовано дані медичних карток 225 дітей віком від 2 до 9 років з ГДФЦ, у яких відзначалися клінічні прояви РАС (183 хлопчиків і 42 дівчинки). Усі вони були пацієнтами спеціалізованої нейроімунологічної клініки Vivere (реєстраційне досьє від 22.12.2018 №10/2212-М). Отримання даних для дослідження та обробка матеріалу проводилася згідно договору № 150221 від 15.02.2021р., та висновку комісії біоетичної експертизи (протокол № 140 від 21.12.2020 р. НМУ імені О.О. Богомольця). Клінічний діагноз РАС був виставлений дитячими психіатрами за критеріями DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) та ICD-10 (The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems).

Патогенні поліморфні варіанти генів фолатного циклу визначали методом ПЛР з рестрикцією (Сінево, Україна) на підставі виявлення заміни нуклеотидів MTHFR C677T у моноформі (68 пацієнтів), а також – у поєднанні з іншими замінами нуклеотидів – MTHFR A1298C, MTRR A66G і/або MTR A2756G (157 осіб). Ці особи склали досліджувану групу (ДГ).

До контрольної групи (КГ) віднесли 51 клінічно здорову дитину (37 хлопчиків та 14 дівчаток) аналогічного вікового розподілу, які не страждали на ГДФЦ та РАС.

Оцінювали відомі механізми імуноопосередкованого ураження ЦНС у дітей з РАС згідно з накопиченими дотепер доказами у контрольованих клінічних дослідженнях, опублікованих у рецензованих періодичних медичних виданнях, що цитуються в електронних наукометричних базах даних PubMed і Embase. Відповідно до цього, проводили аналіз результатів визначення панелі Каннінгем (Cunningham Panel™; Moleculera Labs, Inc, США) з метою ідентифікації автоантитіл до антигенів нейронів підкіркових гангліїв ЦНС в сироватці крові, включаючи вимірювання специфічних IgG до дофамінових рецепторів 1 і 2 типів, лізогангліозиду

та тубуліну (ELISA) та оцінку активності Са-залежної кальмодулінкінази в нейронах діагностичної культури після контакту з сироваткою крові пацієнта (cell-based assay; CBA), що відповідає сучасним вимогам до лабораторної діагностики PANS/PITANDS/PANDAS (pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome/ pediatric infection-triggered autoimmune neuropsychiatric disorder/ pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections) у дітей згідно з даними огляду Dop D. зі спів. [7]. Результати нещодавнього контрольованого клінічного дослідження Shimasaki С. зі співавт. доводять релевантність результатів панелі Каннінгем у діагностиці автоімунних субкортикальних енцефалітів у дітей [43]. Оцінювали результати серологічних досліджень сироватки крові на предмет виявлення специфічних антинейрональних автоантитіл до автоантигенів гіпокампів, які валідовані наразі як лабораторні маркери автоімунних лімбічних енцефалітів у дітей і дорослих, а саме – автоантитіл до глутамінокислої декарбоксилази (GADA), калієвих каналів нейронів, амфіфізину, NMDA-рецепторів нейронів, GABA, CV2, Yo, Ri, Ma, Hu, AMPAR 1 і 2 (ELISA; MDI Limbach Berlin GmbH, Німеччина), що відповідає сучасним підходам до діагностики автоімунних лімбічних енцефалітів у людей [29]. Зокрема, таку діагностику проводили відповідно до даних систематичного огляду Budhram A. зі співавт., присвяченому всебічному аналізу інформативності валідованих методів параклінічної діагностики автоімунних лімбічних енцефалітів у сучасній популяції [4].

Автоімунізацію до мієліну визначали за сироватковою концентрацією автоантитіл до основного білку мієліну (ІФА) та ознаками нейросенсибілізації до мієліну з боку нейтрофілів та CD8+ цитотоксичних Т-лімфоцитів (CBA; відділ нейроімунології Інституту нейрохірургії НАМН України), як рекомендують Singh V.K. зі співавт. [44, 45]. Автоантитіла до позамозкових автоантигенів вимірювали за допомогою методу вестерн-блот у лабораторії Сінево (Україна), що відповідає загальноновизнаним підходам у сучасній ревматології [17, 48]. Зокрема, аналізували результати “ANA-профілю”, що включав визначення специфічних IgG до автоантигенів ядер клітин сполучної тканини nRMP/Sm, Smith antigen, RNP-70 -A та -C, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CEN-pB, PCNA, dsDNA, Nucleosomes, Histones, Rib P-protein, AMA-M-2 та “Міозитного профілю” з вимірюванням специфічних IgG до автоантигенів попереково-посмугованих м'язів Mi-2, Ku, PM-Scl, Jo-1, PL-7, PL-12 та Ro-52 в сироватці крові. Ознаки системного запалення оцінювали за сироватковою концентрацією ФНП-альфа (N до 8,1 пг/мл; ІФА; Сінево, Україна) згідно з даними систематичного огляду Masi A. зі співавт. [22].

Статистичну обробку матеріалу проводили шляхом порівняльного і структурного аналізів. Для визначення вірогідності відмінностей між показниками

у групах спостереження використовували параметричний Т-критерій Ст'юдента з показником довірчої ймовірності p та непараметричний критерій – число знаків Z , за Урбахом Ю.В. Вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$ і $Z < Z_{0,05}$. Для вивчення асоціацій між досліджуваними показниками застосовували показник відношення шансів (odds ratio, OR) та 95% довірчий інтервал (95% CI). Для проведення статистичних розрахунків користувалися програмою Microsoft Excel.

Дослідження виконувалося як фрагмент науково-дослідної роботи на замовлення МОЗ України (№ держреєстрації 0121U107940).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У пацієнтів ДГ були ідентифіковані лабораторні ознаки всіх п'яти досліджуваних видів автоімунітету до мозкових та позамозкових автоантигенів з різним механізмом розвитку та мішенями автоагресії, про які повідомляли раніше у результатах розрізних і несистематизованих клінічних досліджень, присвячених оцінці автоімунізації як у дітей з РАС, так і в пацієнтів з ГДФЦ.

Лабораторні ознаки автоімунітету виявлені серед дітей ДГ в 68% випадків, причому щонайменше у двох третин із них відзначалося поєднання кількох різних автоімунних реакцій, а в третині – комбінація одразу трьох або чотирьох різних проявів автоімунітету. Ці дані відрізняються від аналогічних результатів в КГ, де було виявлено ознаки автоімунних реакцій

лише в 13% випадків ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$), а комбінації різних автоімунних реакцій – в 3% випадків ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Таким чином, для дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, в цілому характерні лабораторні ознаки автоімунітету до досліджуваних мозкових та позамозкових автоантигенів, що не є типовими для здорових дітей аналогічного гендеру і віку. Можна говорити про аномальний синдром порушеного підтримання імунної толерантності до антигенів власного організму у пацієнтів ДГ.

Хоча зареєстровані випадки лабораторних ознак автоімунізації до позамозкових автоантигенів в ДГ були дещо частішими, ніж до мозкових автоантигенів, однак вірогідної різниці між питомою вагою зазначених видів автоімунітету не відзначалося ($p > 0,05$; $Z > Z_{0,05}$).

Розподіл пацієнтів ДГ ($n = 225$) у порівнянні з КГ ($n = 51$) за виявленими лабораторними ознаками автоімунізації до різних досліджуваних автоантигенів організму пацієнта наведений на рис. 1. Відповідно до виявлених 5 видів автоімунітету ДГ поділили на 5 підгруп. До 1-ї підгрупи ДГ увійшли пацієнти з лабораторними ознаками автоімунізації до підкіркових гангліїв ($n = 72$), до 2-ї – нейронів мезолімбічної системи ($n = 81$), до 3-ї – мієліну півкуль великого мозку ($n = 97$), до 4-ї – ядер клітин сполучної тканини ($n = 119$), а до 5-ї – попереково-посмугованих м'язів ($n = 108$).

Появу ознак автоімунних реакцій можна пояснити станом імунної дизрегуляції, зумовленою імунде-

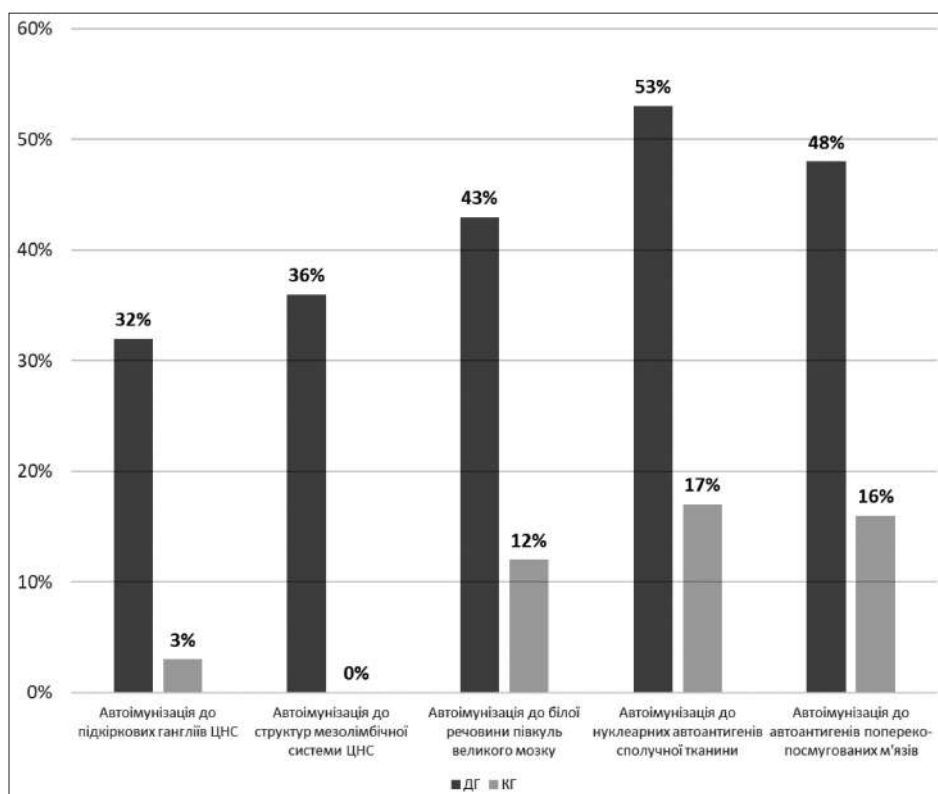


Рис. 1. Структура ДГ ($n = 225$) у порівнянні з КГ ($n = 51$) за лабораторними ознаками автоімунізації до різних автоантигенів організму пацієнта

фіцитом, який, як показали раніше, відзначається у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ [23]. Ці дані узгоджуються з чисельними повідомленнями і результатами контрольованих клінічних досліджень про виявлення лабораторних ознак імунізації до різноманітних автоантигенів у дітей з РАС [5, 8, 44, 45], а також – даними нещодавнього систематичного огляду, де узагальнені накопичені дані щодо автоімунітету серед зазначеної категорії пацієнтів [14]. Водночас, отримані результати відповідають сучасній доказовій базі щодо асоціації ГДФЦ з підвищеним ризиком розвитку ряду автоімунних хвороб протягом онтогенезу, включаючи автоімунітет до автоантигенів ЦНС [28] та сполучної тканини [40].

Таким чином, згідно з накопиченими дотепер результатами сепаратного аналізу і РАС, і ГДФЦ окремо один від одного асоційовані з ознаками автоімунітету до мозкових та позамозкових автоантигенів, тому виявлення в даному дослідженні аналогічної асоціації при сукупному аналізі у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, видається закономірним і узгодженим з поточною доказовою базою результатів рандомізованих контрольованих клінічних досліджень у зазначеній царині.

Позитивні результати панелі Каннінгем мали місце в 32% випадків серед дітей ДГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Переважали позитивні результати вимірювання активності кальмодулінкінази (65% випадків в цій підгрупі), рідше зустрічалися автоантитіла до дофамінових рецепторів 1 типу та тубуліну (47% та 42% відповідно). Автоантитіла до лізогангліозиду та

дофамінових рецепторів 2 типу були визначені лише в 23% і 17% серед дітей цієї підгрупи. Комбінації різних автоантитіл до автоантигенів підкіркових гангліїв відзначалися майже у всіх випадках (94% випадків цієї підгрупи) (рис. 2).

Наявність антоантитіл до дофамінових рецепторів 1 і 2 типів у сироватці крові була асоційована з ознаками виразної гіперактивності та гіперзбудливості, до тубуліну – проявами обсесивно-компульсивного синдрому, до лізогангліозиду – гіперкінезами за типом тиків, міоклоній і/або дистонії, а аномально підвищена активність кальмодулінкінази – клінічними ознаками активації симпатичної вегетативної нервової системи ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$), що свідчить про неоднаковий вплив різних автоантитіл до автоантигенів підкіркових гангліїв ЦНС на клінічні симптоми психічної хвороби у дітей ДГ і може бути використано у діагностичному та прогностичному плані при клінічному веденні таких дітей.

Автоантитіла до автоантигенів нейронів мезолімбічної системи скроневих часток півкуль великого мозку в сироватці крові відзначалися у 81 із 225 пацієнтів ДГ (36% випадків), тоді як в КГ такі автоантитіла не були ідентифіковані в жодному випадку ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Автоантитіла до GADA мали місце у ДГ у 48% випадків серед дітей цієї підгрупи, до калієвих каналів нейронів – у 39% випадків. Також зрідка зустрічалися автоантитіла до амфіфізину (3 особи, 5%), NMDA-рецепторів нейронів (3 особи, 5%) та молекули CV2 (2 особи, 3% випадків) (рис. 3). Не було жодного пацієнта в ДГ, у якого була комбінація зазначених

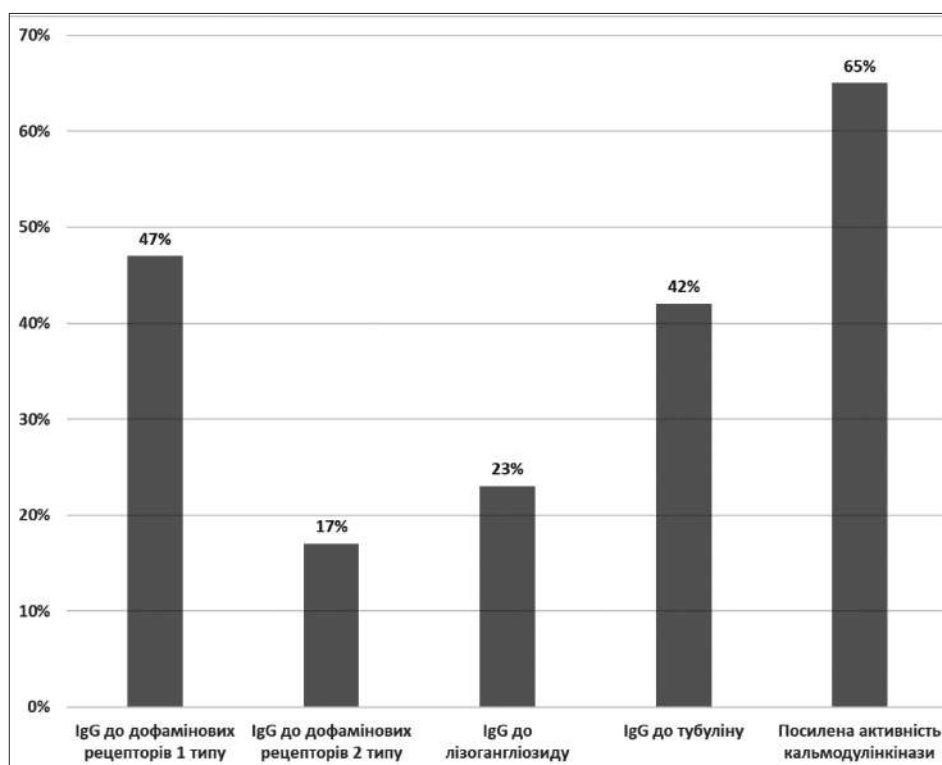


Рис. 2. Структура підгрупи 1 ДГ (n = 72) за типом сироваткових автоантитіл до автоантигенів підкіркових гангліїв ЦНС

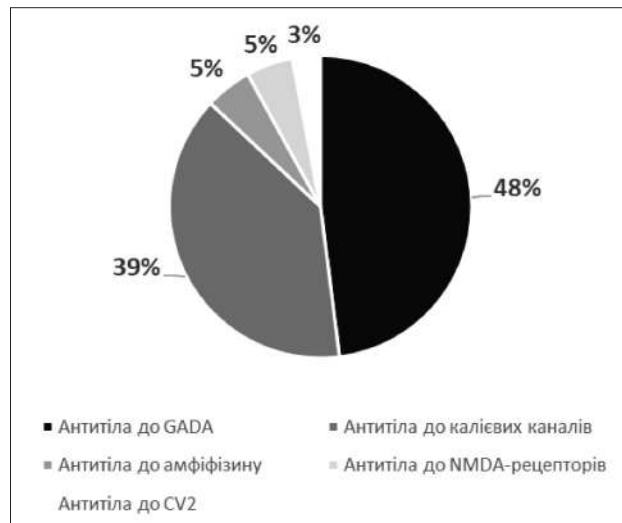


Рис. 3. Структура підгрупи 2 ДГ (n = 81) за типом сироваткових антитіл до автоантигенів нейронів мезолімбічної системи скроневої частки півкуль великого мозку

автоантитіл, що є відмінністю від результатів вивчення автоантитіл до автоантигенів підкіркових гангліїв ЦНС, де були характерні комбінації автоантитіл до різних автоантигенів субкортикальних нейронів ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Наявність таких автоантитіл у сироватці крові була асоційована з виразнішими проявами гіперактивності та гіперзбудливості дитини на момент звернення, анамнестичними вказівками на епізоди перенесених психозів, наявністю епілептичного синдрому та глибшим когнітивним зниженням особистості ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Лабораторні ознаки аутоімунізації до автоантигенів білої речовини півкуль великого мозку відзначалися в 43% випадків серед дітей ДГ, що було вірогідно частіше, ніж в КГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Здебільшого мали місце антитіла до основного білку мієліну (69% випадків у цій підгрупі), які розглядаються нині як провідний чинник пошкодження білої речовини

півкуль у пацієнтів з розсіяним склерозом [1]. Рідше відзначалися позитивні результати оцінки клітинних механізмів автоагресії до автоантигенів мієліну білої речовини півкуль великого мозку – ознаки сенсibiliзації CD8+ цитотоксичних Т-лімфоцитів до мієліну та нейросенсибилізації нейтрофілів (24% і 32% випадків відповідно) (рис. 4). Комбінації різних аутоімунних реакцій мали місце у кожного четвертого пацієнта цієї підгрупи, що вірогідно менше, ніж у пацієнтів з ознаками аутоімунізації до автоантигенів підкіркових гангліїв ЦНС ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$), однак більше, ніж у дітей з підгрупи аутоімунізації до автоантигенів мезолімбічної системи скроневої частки півкуль великого мозку ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Наявність таких автоантитіл у сироватці крові була асоційована з виразнішими МР-проявами лейкоенцефалопатії та фізикальними ознаками ураження пірамідних та мозочкових провідникових шляхів, що клінічно проявлялися у вигляді симптомів цен-

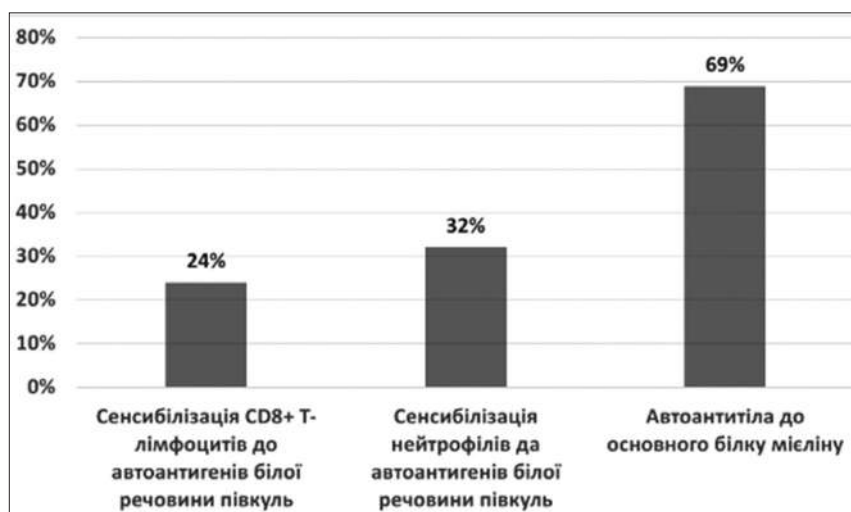


Рис. 4. Структура підгрупи 3 ДГ (n = 97) за типом сироваткових антитіл до автоантигенів мієліну білої речовини півкуль великого мозку

тральних парезів і/або пірамідної недостатності та статико-динамічної мозочкової атаксії відповідно ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Отримані дані узгоджуються як з результатами контрольованих клінічних досліджень, що вказують на асоціацію ГДФЦ з підвищеним ризиком розвитку розсіяного склерозу, пов'язаного з аутоімунізацією до автоантигенів мієліну півкуль великого мозку [28], так і з даними наукових робіт щодо аномально часто го виявлення лабораторних проявів антимієлінового аутоімунітету у дітей з РАС [44, 45].

Лабораторні ознаки аутоімунітету до автоантигенів сполучної тканини за визначенням різних видів автоантитіл до нуклеарних білків відзначалися в 53% випадків серед дітей ДГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Переважали позитивні результати визначення автоантитіл до RNP-70 -А та -С, РМ-ScI, PCNA та АМА-М-2, які мали місце у більшості випадків серед пацієнтів цієї підгрупи ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Рідше зустрічалися автоантитіла до nRMP/Sm, Smith antigen, Ro-52, SS-B, Scl-70, Jo-1, CEN-pB, dsDNA, Nucleosomes, Histones, Rib P-protein, кожен з яких був зареєстрований не більше, ніж в третині випадків серед пацієнтів цієї підгрупи (рис. 5). Майже завжди мали місце комбінації різних автоантитіл до нуклеарних автоантигенів сполучної тканини у одного пацієнта.

Ці сироваткові автоантитіла були пов'язані з анамнестичними вказівками на епізоди перенесених артритів і/або персистуючих артралгій та міалгій у дітей ДГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Саме серед пацієнтів цієї підгрупи зареєстровано всі 11 випадків МР-ознак дифузної васкулопатії дрібних церебральних артерій, які відзначалися в ДГ. Отримані дані узгоджуються з результатами рандомізованих контрольованих клінічних досліджень щодо асоціації ГДФЦ з підвищеним ризиком розвитку ревматичних хвороб, включаючи системний червоний вовчак, для якого характерна продукція антинуклеарних автоантитіл [40].

Лабораторні ознаки аутоімунізації до автоантигенів попереково-посмугованих м'язів мали місце в 48% випадків серед пацієнтів ДГ, майже завжди – у вигляді комбінацій різних антим'язових автоантитіл, тоді як в КГ позитивні результати оцінки аутоімунізації до м'язів зареєстровані лише в 15% випадків, здебільшого – у вигляді поодиноких позитивних результатів ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Переважали сироваткові автоантитіла до Mi-2, Ku та РМ-ScI, тоді як автоантитіла до Jo-1, PL-7, PL-12 та Ro-52 зустрічалися майже вдвічі рідше в ДГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$) (рис. 6).

Поява таких автоантитіл у сироватці крові була асоційована з анамнестичними вказівками щодо минулих періодів млявості та обмеження рухомості і/

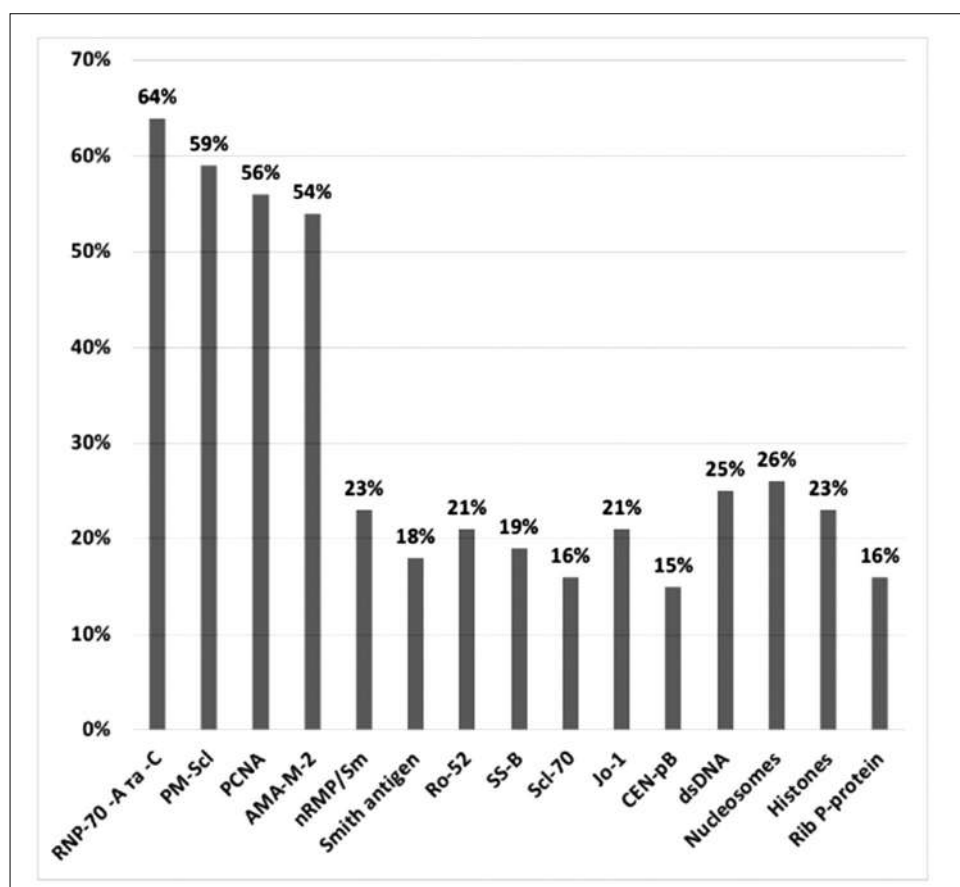


Рис. 5. Структура підгрупи 4 ДГ (n = 119) за типом сироваткових автоантитіл до нуклеарних автоантигенів сполучної тканини

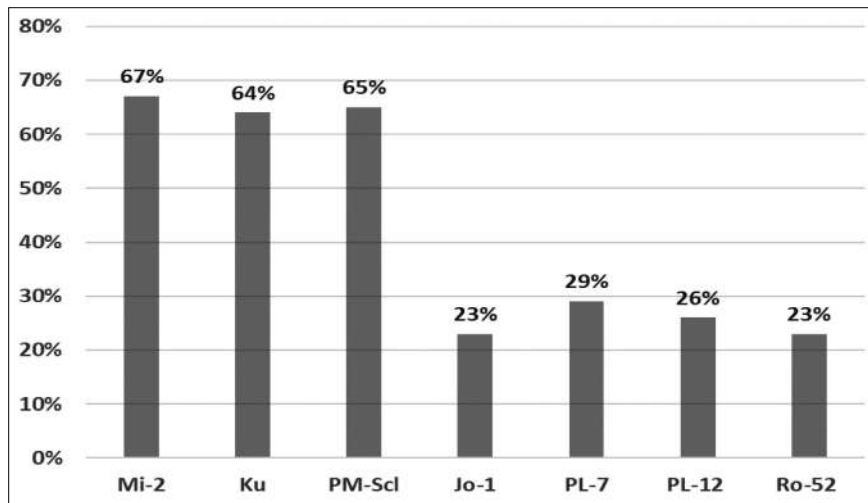


Рис. 6. Структура підгрупи 5 ДГ (n = 108) за типом сироваткових аутоантитіл до аутоантигенів попереково-посмугованих м'язів

або проявами міозитів різних груп попереково-посмугової мускулатури, а також – глибшими порушеннями розвитку дрібної моторики кистей у дітей ДГ ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). У цій підгрупі мало місце виразніше зниження сили скелетних м'язів у осіб з ознаками ураження пірамідних провідникових шляхів ЦНС ($p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$).

Якщо говорити про механізм розвитку аутоімунних реакцій у пацієнтів з РАС, асоційованими з ГДФЦ, то згідно з накопиченими дотепер доказами вважають, що тригерами аутоімунітету виступають здебільшого деякі опортуністичні та умовно патогенні мікробні агенти, контроль над якими аномально послаблено через наявність імунної дисфункції, зумовленої ГДФЦ [23]. Існують підстави вважати, що різні мікроорганізми чинять неоднаковий вплив на розвиток аутоімунних реакцій, а ідентифікація

зв'язків між видом мікроорганізму та типом пов'язаного аутоімунного ураження може бути корисним для раціонального планування лабораторних та інструментальних параклінічних обстежень, проведення моніторингу і прогнозування, а також – підбору адекватної терапії. Результати вивчення асоціацій між мікробними агентами, які відзначаються у дітей з РАС, пов'язаними з ГДФЦ, та зареєстрованими лабораторними ознаками аутоімунітету наведені у таблиці.

Як видно з даних таблиці, різні мікроорганізми були по-різному асоційовані з лабораторними ознаками тих чи інших аутоімунних реакцій серед дітей ДГ. Щодо *Candida albicans*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycoplasma pneumoniae* і *Chlamydia pneumoniae* не було виявлено жодних асоціацій, тому ці дані не були включені в таблицю. EBV з-поміж інших досліджува-

Таблиця

Результати вивчення асоціації (OR; 95% CI) мікробних агентів і лабораторних ознак аутоімунних реакцій серед пацієнтів ДГ (n=225)

Показник	Аутоімунізація до підкіркових гангліїв	Ат до мезолімбічної системи мозку	Аутоімунізація до білої речовини півкуль	Ат до нуклеарних антигенів сполучної тканини	Ат до попереково-посмугованих м'язів
EBV	1,0643; 0,5112 - 2,2156	2,3061; 1,2038 - 4,4177*	5,1506; 2,4717 - 10,7329*	3,1157; 1,6156 - 6,0087*	3,0172; 1,5664 - 5,8118*
HHV-6	0,9903; 0,4773 - 2,0546	3,2356; 1,6637 - 6,2926*	3,1130; 1,5662 - 6,1873*	2,9229; 1,5192 - 5,6237*	2,4596; 1,2851 - 4,7076*
HHV-7	1,1922; 0,5693 - 2,4968	2,6248; 1,3633 - 5,0535*	2,8632; 1,449 - 5,6576*	2,5750; 1,3417 - 4,9421*	2,3861; 1,2478 - 4,5628*
Streptococcus	13,2407; 6,2118 - 28,223*	1,7667; 0,911 - 3,4262	1,6045; 0,8461 - 3,0426	1,7961; 0,9453 - 3,4125	1,7855; 0,9398 - 3,3923
Borrelia	5,9325; 2,8312 - 12,4308*	1,9146; 0,9902 - 3,7021	2,5071; 1,3093 - 4,8007*	3,3750; 1,7376 - 6,5555*	4,7884; 2,4216 - 9,4686*
Toxoplasma	1,7113; 0,8933-3,2785	2,2475; 1,1773 - 4,2907*	1,3977; 0,7383 - 2,6462	1,7457; 0,9193 - 3,3150	1,9436; 1,0215 - 3,6982
TTV	1,8214; 0,9487 - 3,4967	2,1202; 1,0915 - 4,1184*	2,1656; 1,1350 - 4,1321*	2,0165; 1,0586 - 3,8412*	2,1821; 1,1439 - 4,1627*

Примітка. * - $\alpha = 0,05$

них мікробних агентів був найтісніше асоційований з розвитком автоімунних реакцій у дітей ДГ. Так, EBV був асоційований з лабораторними ознаками автоімунних реакцій до автоантигенів мезолімбічної системи півкуль великого мозку, білої речовини півкуль великого мозку, ядер клітин сполучної тканини та попереково-посмугованих м'язів. Зокрема, ідентифікація EBV збільшує шанси виявити позитивні лабораторні ознаки автоімунізації до мієліну білої речовини півкуль великого мозку щонайменше в 5 разів, до нуклеарних та м'язових автоантигенів – в 3 рази, а до білків нейронів мезолімбічної системи мозку – в 2 рази. Це відповідає накопиченим дотепер доказам щодо участі цього вірусу у ролі тригера при розвитку автоімунітету в організмі людини. Лідуючу роль цього вірусу можна пов'язати з ширшим арсеналом механізмів індукції зриву імунної толерантності до антигенів власного організму. Зокрема, EBV використовує не тільки механізм молекулярної мімікрії, як й більшість інших досліджуваних мікроорганізмів, а й поліклональну активацію В-лімфоцитів [1]. Результати мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Li Z.X. зі спів. вказують, що EBV є тригером розвитку автоімунної реакції при системному червоному вовчаку у людей, лабораторним маркером якого є антинуклеарні автоантитіла, що згідно з результатами даного дослідження відзначаються у більшості дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ [17]. Дані мета-аналізу і систематичного огляду рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Almohmeed Y.H. зі спів. підтверджують, що EBV асоційований з розвитком автоімунної реакції при розсіяному склерозі, коли відзначаються лабораторні ознаки автоімунізації до автоантигенів мієліну білої речовини півкуль великого мозку, що відповідають результатам оцінки відповідної автоімунізації у дітей ДГ [1]. Результати контрольованих клінічних досліджень вказують на роль EBV як тригера розвитку автоімунної реакції при автоімунних лімбічних енцефалітах [42] та дерматоміозиті [48], при яких відзначаються позитивні результати визначення автоантитіл відповідно до автоантигенів нейронів мезолімбічної системи ЦНС та антим'язових автоантитіл у сироватці крові, що були ідентифіковані у пацієнтів ДГ. Ці дані повністю пояснюють виявлений паттерн асоціації EBV з лабораторними ознаками автоімунізації у дітей ДГ.

Аналогічні докази накопичені наразі щодо асоціацій інших досліджуваних мікроорганізмів і специфічного мікробного спектру, характерного для імунodefіциту, пов'язаного з ГДФЦ, з автоімунними реакціями до мозкових та позамозкових автоантигенів.

Так, HHV-6 і HHV-7 мали подібний з EBV розподіл асоціацій з лабораторними ознаками автоімунізації до автоантигенів, що можна пояснити біологічною спорідненістю цих мікробних агентів,

однак шанси виявлення тих чи інших автоімунних порушень при позитивних результатах вірусологічних тестів з ідентифікації HHV-6 і HHV-7 були нижчими, ніж у випадку реактивації EBV. Присутність цих вірусів в реактивованому стані підвищували шанси виявити серологічні лабораторні ознаки автоімунізації до мозкових автоантигенів щонайменше в 3 рази, а до позамозкових автоантигенів – в 2-2,5 рази. Відповідно до цього, результати мета-аналізу рандомізованих контрольованих клінічних досліджень Rogmoammad A. зі спів. вказують, що HHV-6 є тригером зриву імунної толерантності до автоантигенів білої речовини півкуль великого мозку при розсіяному склерозі, при якому відзначаються аналогічні лабораторні маркери автоімунізації до мієліну ЦНС, що і серед дітей ДГ [32]. Broccolo F. зі спів., виявивши селективну реактивацію HHV-6 серед пацієнтів з автоімунними хворобами сполучної тканини і м'язів, для яких характерним є аномальний синтез відповідно антинуклеарних та антим'язевих автоантитіл, обґрунтували роль цього в якості тригера розвитку автоімунної реакції в цих випадках [3]. Встановлено, що трансольфакторна міграція HHV-6 до нейронів гіпокампів [13] та подальша експресія на цих клітинах вірусних білків сприяє автоімунізації до автоантигенів нейронів мезолімбічної системи скроневих часток півкуль великого мозку з розвитком автоімунного лімбічного енцефаліту [31], хоча й описані HHV-6-індуковані форми інфекційних лімбічних енцефалітів у людей [41]. Linnola J.J. зі спів. у спеціально спланованому клінічному дослідженні вказали на симультантне виявлення ДНК HHV-6 та автоантитіл до NMDA- і GABA-рецепторів нейронів гіпокампів в цереброспінній рідині у пацієнтів з ознаками лімбічного енцефаліту, що вказує на змішаний механізм ураження ЦНС у багатьох пацієнтів [18]. Відповідно до цього, Venâncio P. зі спів. описали показовий клінічний випадок розвитку автоімунного лімбічного енцефаліту, при якому тригером розвитку автоімунної реакції до нейронів гіпокампів була реактивована HHV-7-інфекція [46].

Streptococcus pyogenes був асоційований тільки з лабораторними ознаками автоімунного субкортикального енцефаліту, маючи вузький спектр асоціацій з-поміж інших досліджуваних патогенів, однак виявлена асоціація була найтіснішою серед усіх виявлених у даному клінічному дослідженні. Зокрема, ідентифікація *Streptococcus pyogenes* була пов'язана зі зростанням шансів виявити автоантитіл до нейронів підкіркових ядер півкуль великого мозку в сироватці крові пацієнта ДГ щонайменше в 13 разів. Ці дані відповідають сучасній концепції PANDAS у дітей [7].

Borrelia продемонструвала комбінований паттерн асоціацій, демонструючи деякі спільні властивості з герпесвірусами, збільшуючи шанси ідентифікації ознак автоімунних реакцій до автоантигенів мієліну

білої речовини півкуль великого мозку, ядер клітин сполучної тканини та білків попереково-посмугованих м'язів в 2, 3 і 4 рази відповідно. Однак, на відміну від герпесвірусів, асоціації з лабораторними ознаками автоімунних лімбічних енцефалітів не відзначалося. В той самий час, *Borrelia* подібно до *Streptococcus pyogenes* демонструвала асоціацію з лабораторними ознаками PANS/PITANDS/PANDAS, збільшуючи шанси виявлення позитивних результатів панелі Каннінгем щонайменше в 5 разів. Ці дані відповідають результатам нещодавнього систематичного огляду, підготовленого Rhee H. зі спів., в якому борреліоз позиціонується як другий за частотою після *Streptococcus pyogenes* тригер розвитку антинейрональної автоімунної реакції при субкортикальних автоімунних енцефалітах у людей, що позначаються акронімами PANS/PITANDS/PANDAS [35].

Toxoplasma gondii мала найвужчий і найслабший патер асоціацій з досліджуваними ознаками автоімунітету, збільшуючи шанси виявлення автоантитіл до автоантігенів гіпокампів ЦНС в сироватці крові пацієнта ДГ в щонайменше 2 рази. Відповідно до цього, Cai X. зі спів. повідомили про розвиток гострого лімбічного анти-NMDA-енцефаліту з порушенням психічної діяльності при реактивації токсоплазменної інфекції, причому повне усунення клінічних симптомів автоімунної хвороби відбулося після 10-денного курсу азитроміцину для пригнічення репродукції токсоплазми без використання імуносупресивної терапії з приводу автоімунної реакції проти нейронів ЦНС [6].

TTV продемонстрував розподіл асоціацій, подібний до такого у герпесвірусів, що було пов'язано з одночасним виявленням цих вірусів у одного пацієнта в більшості випадків і, можливо, певною взаємодією між зазначеними інфекційними агентами. Так, Borkosky S.S. зі спів. показали, що EBV стимулює репродуктивну активність TTV, що сприяє сильнішому впливу цього вірусу на зрив імунної толерантності до мієліну білої речовини півкуль великого мозку при розсіяному склерозі [2]. Однак виявлені зв'язки TTV з лабораторними ознаками автоімунітету були слабкими – на рівні двократного зростання ризику розвитку автоімунітету при реактивації цього опортуністичного агенту з персистуючого стану. Якщо про роль TTV у якості тригера при розсіяному склерозі [37] та автоімунних лімбічних енцефалітах [31] вже повідомляли раніше, то дані щодо асоціації цього вірусу з автоімунізацією до позамозкових автоантігенів – ядер клітин сполучної тканини та білків попереково-посмугованих м'язів – вважаємо новою, оскільки не знайшли відповідної інформації в доступній науковій літературі.

Таким чином, серологічні ознаки автоімунізації до автоантігенів підкіркових гангліїв півкуль великого мозку були асоційовані тільки зі *Streptococcus pyogenes* та *Borrelia*, демонструючи тісні зв'язки між

досліджуваними феноменами, тоді як лабораторні ознаки інших автоімунних реакцій мали ширший паттерн асоціацій з мікробами досліджуваного спектру, які в цілому були слабшими, ніж при позитивних результатах панелі Каннінгем. Так, лабораторні ознаки автоімунних лімбічних енцефалітів були асоційовані з EBV, HHV-6, HHV-7, *Toxoplasma* та TTV, а автоімунної демієлінізації в білій речовині півкуль великого мозку – з EBV, HHV-6, HHV-7, *Borrelia* та TTV. Лабораторні ознаки автоімунізації до позамозкових автоантігенів в цілому демонстрували ширший паттерн асоціацій з досліджуваними мікроорганізмами порівняно з автоантігенами головного мозку, однак тіснота таких асоціацій була меншою. Так, автоантитіла до автоантігенів ядер клітин сполучної тканини та білків попереково-посмугованих м'язів були асоційовані з EBV, HHV-6, HHV-7, *Borrelia* та TTV, однак не з *Toxoplasma gondii* та *Streptococcus pyogenes*.

ВИСНОВКИ

Отримані дані дозволяють говорити про наявність лабораторних ознак синдрому порушеної імунної толерантності у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, що можна пояснити відомим станом імунної дисрегуляції в таких випадках [23]. Ідентифіковано п'ять різних видів автоімунітету з відмінними механізмами і мішенями автоагресії, три з яких спрямовано проти автоантігенів сірої і білої речовини ЦНС, включаючи антигени гіпокампів, субкортикальних гангліїв та мієліну півкуль великого мозку, а два – до позамозкових білків ядер клітин сполучної тканини та попереково-посмугованих м'язів. У розвитку енцефалопатії у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, можуть робити внесок не тільки автоімунні реакції до мозкових автоантігенів, однак й позамозковий автоімунітет. Зокрема, імунізація до ядерних автоантігенів сполучної тканини може призводити до розвитку васкулопатії церебральних артерій, а автоімунне ураження попереково-посмугової мускулатури – посилювати прояви пірамідної недостатності. Кожен з виявлених видів автоімунітету пов'язаний з відмінними клініко-радіологічними симптомами, найбільш ймовірно, впливаючи на рівень фізичного і психічного здоров'я дітей. Дослідження асоціацій проливає світло на потенційні механізми автоімунізації у дітей з РАС, асоційованими з ГДФЦ, демонструючи зв'язки між певними видами автоімунітету та реактивованими опортуністичними й умовно патогенними мікроорганізмами специфічного спектру з відомими властивостями здійснювати зрив імунної толерантності до антигенів власного організму в умовах імуносупресії. Ідентифіковані ознаки автоімунних реакцій можуть бути об'єктом ефективних терапевтичних втручань, спрямованих на досягнення прогресу у психічному і фізичному розвитку дітей з РАС, асоційованими з

ГДФЦ, шляхом досягнення нейропротекції за рахунок пригнічення антимозкового автоімунітету, що слід перевірити у спеціально спланованих клінічних дослідженнях.

REFERENCES

- Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013;8(4):e61110. DOI: 10.1371/journal.pone.0061110. View at: Publisher Site: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061110> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23585874/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3621759/>
- Borkosky SS, Whitley C, Kopp-Schneider A, Hausen H, de Villiers E-M. Epstein-Barr virus stimulates torque teno virus replication: a possible relationship to multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(2): e32160. DOI: 10.1371/journal.pone.0032160. View at: Publisher Site: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032160> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22384166/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3285200/>
- Broccolo F, Drago F, Cassina G, Fava A, Fusetti L, Matteoli B, Ceccherini-Nelli L, Sabbadini MG, Lusso P, Parodi A, Malnati MS. Selective reactivation of human herpesvirus 6 in patients with autoimmune connective tissue diseases. *J. Med. Virol.* 2013; 85(11): 1925-34. DOI: 10.1002/jmv.23670. View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.23670> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23983182/>
- Budhram A, Leung A, Nicolle MW, Burneo JG. Diagnosing autoimmune limbic encephalitis. *CMAJ*. 2019; 191(19): E529-E534. DOI: 10.1503/cmaj.181548. View at: Publisher Site: <https://www.cmaj.ca/content/191/19/E529> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31085562/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6520067/>
- Cabanlit M, Wills S, Goines P, Ashwood P, Van de Water J. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 107: 92-103. DOI: 10.1196/annals.1381.010. View at: Publisher Site: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1196/annals.1381.010> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17804536/>
- Cai X, Zhou H, Xie Y, Yu D, Wang Z, Ren H. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with acute *Toxoplasma gondii* infection: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(7): e9924. DOI: 10.1097/MD.00000000000009924. View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/02160/Anti_N_methyl_D_aspartate_receptor_encephalitis.47.aspx PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29443773/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839864/>
- Dop D, Marcu IR, Padureanu R, Niculescu CE, Padureanu V. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections. *Exp. Ther. Med.* 2021; 21(1): 94. DOI: 10.3892/etm.2020.9526. View at: Publisher Site: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.9526> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33363605/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7725005/>
- Frye RE, Sequeira JM, Quadros EV, James SJ, Rossignol DA. Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry*. 2013; 18(3): 369-81. DOI:10.1038/mp.2011.175. View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/mp2011175> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22230883/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578948/>
- Fujinami RS. Molecular mimicry that primes for autoimmunity which is triggered by infection. *Mol. Psychiatry*. 2002; 7(2): S32-33. DOI: 10.1038/sj.mp.4001173. View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/4001173?proof=t+target%3D>
- Gesundheit B, Rosenzweig JP, Naor D, Lerer B, Zachor DA, Procházka V, Melamed M, Kristt DA, Steinberg A, Shulman C, Hwang P, Koren G, Walfisch A, Passweg JR, Snowden JA, Tamouza R, Leboyer M, Farge-Bancel D, Ashwood P. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *J. Autoimmun.* 2013; 44: 1-7. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.05.005. View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896841113000735?via%3Dihub> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23867105/>
- Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Francos R, Cuchacovich S, Blanco A, Sandoval R, Gomez CF, Valenzuela JA, Ray R, Pizzo SV. Catalytic autoantibodies against myelin basic protein (MBP) isolated from serum of autistic children impair in vitro models of synaptic plasticity in rat hippocampus. *J. Neuroimmunol.* 2015; 287: 1-8. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2015.07.006. View at: Publisher Site: [https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728\(15\)30008-4/fulltext](https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728(15)30008-4/fulltext) PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26439953/>
- González-Toro MC, Jadraque-Rodríguez R, Semperé-Pérez Á, Martínez-Pastor P, Jover-Cerdá J, Gómez-Gosálvez F. [Anti-NMDA receptor encephalitis: two paediatric cases]. *Rev. Neurol.* 2013; 57(11): 504-8. [in Spanish] View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24265144/>

13. Harberts E, Yao K, Wohler JE, Maric D, Ohayon J, Henkin R, Jacobson S. Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2011; 108(33): 13734-9. DOI: 10.1073/pnas.1105143108.
View at: Publisher Site: <https://www.pnas.org/content/108/33/13734>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21825120/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158203/>
14. Hughes HK, Ko EM, Rose D, Ashwood P. Immune Dysfunction and Autoimmunity as Pathological Mechanisms in Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2018; 12: 405. DOI: 10.3389/fncel.2018.00405.
View at: Publisher Site: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00405/full>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30483058/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6242891/>
15. Kiani R, Lawden M, Eames P, Critchley P, Bhaumik S, Odedra S, Gumber R. Anti-NMDA-receptor encephalitis presenting with catatonia and neuroleptic malignant syndrome in patients with intellectual disability and autism. *BJ Psych. Bull*. 2015; 39(1): 32-5. DOI: 10.1192/pb.bp.112.041954.
View at: Publisher Site: <https://www.cambridge.org/core/journals/bjpsych-bulletin/article/anti-nmdareceptor-encephalitis-presenting-with-catatonia-and-neuroleptic-malignant-syndrome-in-patients-with-intellectual-disability-and-autism/A730ADD66527D49A0C8B8FDA64D1F806>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26191422/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495827/>
16. Li Y, Qiu S, Shi J, Guo Y, Li Z, Cheng Y, Liu Y. Association between MTHFR C677T/A1298C and susceptibility to autism spectrum disorders: a meta-analysis. *BMC Pediatr*. 2020; 20(1): 449. DOI: 10.1186/s12887-020-02330-3.
View at: Publisher Site: <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-020-02330-3>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32972375/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7517654/>
17. Li ZX, Zeng S, Wu HX, Zhou Y. The risk of systemic lupus erythematosus associated with Epstein-Barr virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Med*. 2019; 19(1): 23-36. DOI: 10.1007/s10238-018-0535-0.
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10238-018-0535-0>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30361847/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6394567/>
18. Linnola JJ, Binnicker MJ, Majed M, Klein CJ, McKeeon A. CSF herpes virus and autoantibody profiles in the evaluation of encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm*. 2016; 3(4): e245. DOI: 10.1212/NXI.0000000000000245.
View at: Publisher Site: <https://nn.neurology.org/content/3/4/e245>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27308306/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4897981/>
19. Maltsev D, Natrus L. [The effectiveness of infliximab in autism spectrum disorders associated with folate cycle genetic deficiency]. *Psychiatry, Psychotherapy and Clinical Psychology*. 2020; 11(3): 583-94. [in Russian]
View at: Publisher Site: <https://psihea.recipe.by/ru/?editions=2020-tom-11-n-3>
URL: https://psihea.recipe.by/ru/?editions=2020-tom-11-n-3&group_id=item_1&article_id=line_3
20. Maltsev DV. [High-dose i/v immunoglobulin therapy efficiency in children with autism spectrum disorders associated with genetic deficiency of folate cycle enzymes]. *Likars'ka Sprava*. 2017; (8): 8-24. [in Russian]
View at: Publisher Site: <https://liksprava.com/index.php/journal/article/view/126>
21. Marchezan J, Winkler Dos Santos EA, Deckmann I, Dos Santos Riesgo R. Immunological Dysfunction in Autism Spectrum Disorder: A Potential Target for Therapy. *Neuroimmunomodulation*. 2018; 25(5-6): 300-19. DOI: 10.1159/000492225.
View at: Publisher Site: <https://www.karger.com/Article/FullText/492225>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30184549/>
22. Masi A, Quintana DS, Glozier N, Lloyd AR, Hickie IB, Guastella AJ. Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry*. 2015; 20(4): 440-6. DOI: 10.1038/mp.2014.59
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/mp201459>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24934179/>
23. Mead J, Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol. Lett*. 2015; 163(1): 49-55. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.11.006.
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247814002600?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25448709/>
24. Mohammad NS, Shruti PS, Bharathi V, Prasad CK, Husain T, Alrokayan SA, Naik U, Devi ARR. Clinical utility of folate pathway genetic polymorphisms in the diagnosis of autism spectrum disorders. *Psychiatr. Genet*. 2016; 26(6): 281-6. DOI: 10.1097/YPG.0000000000000152.
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/psychgenetics/Abstract/2016/12000/Clinical_utility_of_folate_pathway_genetic.5.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27755291/>
25. Monge-Galindo L, Pérez-Delgado R, López-Pisón J, Lafuente-Hidalgo M, Olmo-Izuzquiza IR, Peña-Segura

- JL. [Mesial temporal sclerosis in paediatrics: its clinical spectrum. Our experience gained over a 19-year period]. *Rev. Neurol.* 2010; 50(6): 341-8. [in Spanish]
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20309832/>
26. Mora M, Quintero L, Cardenas R, Suárez-Roca H, Zavala M, Montiel N. [Association between HSV-2 infection and serum anti-rat brain antibodies in patients with autism]. *Invest. Clin.* 2009; 50(3): 315-26. [in Spanish]
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19961054/>
27. Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. Increased serum levels of anti-ganglioside M1 auto-antibodies in autistic children: relation to the disease severity. *J. Neuroinflammation.* 2011; 8(1): 39. DOI:10.1186/1742-2094-8-39
View at: Publisher Site: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-8-39>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21513576/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104945/>
28. Naghibalhossaini F, Ehyakonandeh H, Nikseresht A, Kamali E. Association Between MTHFR Genetic Variants and Multiple Sclerosis in a Southern Iranian Population. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2015; 4(2): 87-93.
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261797/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4499570/>
29. Nepal G, Shing KY, Yadav JK, Rehrig JH, Ojha R, Huang DY, Gajurel BP. Efficacy and safety of rituximab in autoimmune encephalitis: A meta-analysis. *Acta Neurol. Scand.* 2020; 142(5): 449-59. DOI: 10.1111/ane.13291.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ane.13291>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32484900/>
30. Nicolson GL, Gan R, Nicolson NL, Haier J. Evidence for Mycoplasma spp., Chlamydia pneumoniae, and human herpes virus-6 coinfections in the blood of patients with autistic spectrum disorders. *J. Neurosci Res.* 2007; 85(5): 1143-8. DOI: 10.1002/jnr.21203
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.21203>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17265454/>
31. Perlejewski K, Pawelczyk A, Bukowska-Oško I, Rydzanicz M, Dzieciatkowski T, Paciorek M, Makowiecki M, Cortés KC, Grochowska M, Radkowski M, Laskus T. Search for Viral Infections in Cerebrospinal Fluid From Patients With Autoimmune Encephalitis. *Open Forum Infect. Dis.* 2020; 7(11): ofaa468. DOI: 10.1093/ofid/ofaa468.
View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/ofid/article/7/11/ofaa468/5919166>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33209955/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7643957/>
32. Pormohammad A, Azimi T, Falah F, Faghiloo E. Relationship of human herpes virus 6 and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J. Cell Physiol.* 2018; 233(4): 2850-62. DOI: 10.1002/jcp.26000.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.26000>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28631829/>
33. Pu D, Shen Y, Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. *Autism Res.* 2013; 6(5): 384-92. DOI: 10.1002/aur.1300.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aur.1300>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23653228/>
34. Rai V. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: evidence of genetic susceptibility. *Metab. Brain Dis.* 2016; 31(4): 727-35. DOI: 10.1007/s11011-016-9815-0.
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11011-016-9815-0>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26956130/>
35. Rhee H, Cameron DJ. Lyme disease and pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS): an overview. *Int. J. Gen. Med.* 2012; 5: 163-74. DOI: 10.2147/IJGM.S24212.
View at: Publisher Site: <https://www.dovepress.com/lyme-disease-and-pediatric-autoimmune-neuropsychiatric-disorders-assoc-peer-reviewed-fulltext-article-IJGM>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22393303/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3292400/>
36. Rout UK, Mungan NK, Dhossche DM. Presence of GAD65 autoantibodies in the serum of children with autism or ADHD. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry.* 2012; 21(3): 141-7. DOI: 10.1007/s00787-012-0245-1
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00787-012-0245-1>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22323074/>
37. Saberi A, Akhondzadeh S, Kazemi S. Infectious agents and different course of multiple sclerosis: a systematic review. *Acta Neurol. Belg.* 2018; 118(3): 361-77. DOI: 10.1007/s13760-018-0976-y.
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13760-018-0976-y>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30006858/>
38. Sadeghiyeh T, Dastgheib SA, Mirzaee-Khoramabadi K, Morovati-Sharifabad M, Akbarian-Bafghi MJ, Poursharif Z, Mirjalili SR, Neamatzadeh H. Association of MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms with susceptibility to autism: A systematic review and meta-analysis. *Asian J Psychiatr.* 2019; 46: 54-61. DOI: 10.1016/j.ajp.2019.09.016.
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1876201819303260?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31614268/>

39. Saghazadeh A, Ataenia B, Keynejad K, Abdolalazadeh A, Hirbod-Mobarakeh A, Rezaei N. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude. *J. Psychiatr. Res.* 2019; 115: 90-102. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.05.019
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022395619301542?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31125917/>
40. Salimi S, Keshavarzi F, Mohammadpour-Gharehbagh A, Moodi M, Mousavi M, Karimian M, Sandoughi M. Polymorphisms of the folate metabolizing enzymes: Association with SLE susceptibility and in silico analysis. *Gene.* 2017; 637: 161-72. DOI: 10.1016/j.gene.2017.09.037.
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037811917307552?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28943344/>
41. Santoro JD, Hemond CC. Human herpesvirus 6 associated post-transplant acute limbic encephalitis: Clinical observations of biomarkers for risk of seizure in a pediatric population. *Transpl. Infect. Dis.* 2019; 21(1): e13003. DOI: 10.1111/tid.13003.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tid.13003>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30256500/>
42. Schwenkenbecher P, Skripuletz T, Lange P, Dürr M, Konen FF, Möhn N, Ringelstein M, Menge T, Friese MA, Melzer N, Malter MP, Häusler M, Thaler FS, Stangel M, Lewerenz J, Sühs K-W. Intrathecal Antibody Production Against Epstein-Barr, Herpes Simplex, and Other Neurotropic Viruses in Autoimmune Encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2021; 8(6): e1062. DOI: 10.1212/NXI.0000000000001062.
View at: Publisher Site: <https://nn.neurology.org/content/8/6/e1062>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34429365/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8387013/>
43. Shimasaki C, Frye RE, Trifiletti R, Cooperstock M, Kaplan G, Melamed I, Greenberg R, Katz A, Fier E, Kem D, Traver D, Dempsey T, Latimer ME, Cross A, Dunn JP, Bentley R, Alvarez K, Reim S, Appleman J. Evaluation of the Cunningham Panel in pediatric autoimmune neuropsychiatric disorder associated with streptococcal infection (PANDAS) and pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome (PANS): Changes in antineuronal antibody titers parallel changes in patient symptoms. *J. Neuroimmunol.* 2020; 339: 577138. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2019.577138.
View at: Publisher Site: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572819303522>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31884258/>
44. Singh VK, Lin SX, Newell E, Nelson C. Abnormal measles-mumps-rubella antibodies and CNS autoimmunity in children with autism. *J. Biomed. Sci.* 2002; 9(4): 359-64. DOI: 10.1007/BF02256592
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02256592>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12145534/>
45. Singh VK, Lin SX, Yang VC. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1998; 89(1): 105-8. DOI: 10.1006/clin.1998.4588
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0090122998945883?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9756729/>
46. Venâncio P, Brito MJ, Pereira G, Vieira JP. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with positive serum antithyroid antibodies, IgM antibodies against mycoplasma pneumoniae and human herpesvirus 7 PCR in the CSF. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2014; 33(8): 882-3. DOI: 10.1097/INF.0000000000000408.
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2014/08000/Anti_N_methyl_D_aspartate_Receptor_Encephalitis.26.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25222311/>
47. Vojdani A, Campbell AW, Anyanwu E, Kashanian A, Bock K, Vojdani E. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, Chlamydia pneumoniae and Streptococcus group A // *J. Neuroimmunol.* 2002; 129(1-2): 168-77. DOI: 10.1016/s0165-5728(02)00180-7
View at: Publisher Site: [https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728\(02\)00180-7/fulltext](https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728(02)00180-7/fulltext)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12161033/>
48. Zheng Q, Zhu K, Gao CN, Xu Y-P, Lu M-P. Prevalence of Epstein-Barr virus infection and characteristics of lymphocyte subsets in newly onset juvenile dermatomyositis. *World J. Pediatr.* 2021; 17(2): 205-9. DOI: 10.1007/s12519-019-00314-7.
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12519-019-00314-7>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31549298/>
PubMed Central:
URL:

Article history
Received: 01.09.2021
Revision requested: 10.09.2021
Revision received: 20.09.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОИСКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИЗНАКОВ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ К МОЗГОВЫМ И ВНЕМОЗГОВЫМ АУТОАНТИГЕНАМ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ СПЕКТРА АУТИЗМА, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА

Мальцев Д.В.

Институт экспериментальной и клинической медицины Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

dmaltsev@ukr.net

Актуальность. Результаты пяти мета-анализов рандомизированных контролируемых клинических исследований свидетельствуют об ассоциации генетического дефицита фолатного цикла (ГДФЦ) и расстройств спектра аутизма (РАС) у детей. Особую роль в патогенезе энцефалопатии у детей с РАС, связанными с ГДФЦ, отводят аутоиммунным механизмам.

Цель: изучить структуру аутоиммунных реакций у детей с РАС, связанных с ГДФЦ, согласно накопленной доказательной базе и определить ассоциации лабораторных признаков аутоиммунитета и выявленных микроорганизмов для улучшения понимания патогенеза энцефалопатии и совершенствования алгоритмов диагностики, мониторинга и лечения.

Материалы и методы. Ретроспективно проанализированы медицинские данные 225 детей в возрасте от 2 до 9 лет с ГДФЦ, у которых отмечались клинические проявления РАС (183 мальчика и 42 девочки). Диагноз РАС был выставлен детскими психиатрами по критериям DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) и ICD-10 (The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) (исследуемая группа; ИГ). В контрольную группу (КГ) отнесли 51 клинически здорового ребенка (37 мальчиков и 14 девочек) аналогичного возрастного и гендерного распределения, не страдающих ГДФЦ и РАС.

Патогенные полиморфные варианты генов фолатного цикла определяли методом ПЦР с рестрикцией (Синево, Украина). Аутоантитела к аутоантигенам нейронов подкорковых ганглиев ЦНС в сыворотке крови определяли при помощи панели Каннингем (Moleculera Labs, Inc, США). Сывороточные аутоантитела к нейронам мезолимбической системы мозга идентифицировали путем ELISA (MDI Limbach Berlin GmbH, Германия). Аутоиммунизацию к миелину оценивали по титру сывороточных аутоантител к основному белку миелина (ИФА) и признакам сенсibilизации нейтрофилов и CD8+ Т-лимфоцитов к аутоантигенам белкового вещества полушарий (cell-based assay; лаборатория нейроиммунологии Института нейрохирургии АМН Украины). Сывороточные аутоантитела к ядрам клеток соединительной ткани и белкам поперечно-полосатых мышц определяли при помощи анализа вестерн-блот (Синэво; Украина).

Для определения достоверности различий между показателями в группах наблюдения использовали параметрический Т-критерий Стьюдента с показателем доверительной вероятности p и непараметрический критерий – число знаков Z по Урбаху Ю.В. Для изучения ассоциаций между исследуемыми показателями применяли показатель отношения шансов (odds ratio, OR) и 95% доверительный интервал (95% CI).

Исследование выполнялось как фрагмент научно-исследовательской работы по заказу МЗ Украины (№ госрегистрации 0121U107940).

Результаты. Положительные результаты панели Каннингем имели место в 32%, лабораторные признаки аутоиммунизации к нейронам мезолимбической системы – 36%, миелину белого вещества полушарий – 43%, аутоантигенам ядер клеток соединительной ткани – 53%, белкам поперечно-полосатых мышц – 48% случаев среди детей ИГ (в целом – 68% случаев; $p < 0,05$; $Z < Z_{0,05}$). Серологические признаки аутоиммунизации к аутоантигенам подкорковых ганглиев полушарий большого мозга были ассоциированы со Streptococcus ruogenes и Borrelia, к нейронам мезолимбической системы – EBV, HHV-6, HHV-7, Тохорlasma и TTV, к миелину ЦНС – EBV, HHV-6, HHV-7, Borrelia и TTV, к ядрам клеток соединительной ткани и поперечно-полосатых мышц – EBV, HHV-6, HHV-7, Borrelia и TTV.

Выводы. У детей с РАС, ассоциированными с ГДФЦ, отмечаются лабораторные признаки микроб-индуцированной аутоиммунизации к ряду мозговых и внемозговых аутоантигенов, которая влияет на состояние психического и физического здоровья пациентов и является потенциальным объектом эффективных терапевтических вмешательств.

Ключевые слова: герпесвирусы, стрептококк, PANDAS, аутоиммунный лимбический энцефалит, антинуклеарные аутоантитела.

THE RESULTS OF THE SEARCH FOR LABORATORY SIGNS OF AUTOIMMUNE REACTIONS TO CEREBRAL AND EXTRACEREBRAL AUTOANTIGENS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS ASSOCIATED WITH GENETIC DEFICIENCY OF THE FOLATE CYCLE

Maltsev DV

Institute of Experimental and Clinical Medicine at the O'Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

dmaltsev@ukr.net

Relevance. The results of five meta-analyzes of randomized controlled clinical trials indicate an association between genetic deficiency of the folate cycle (GDFC) and autism spectrum disorders (ASD) in children. Autoimmune mechanisms play a special role in the pathogenesis of encephalopathy in children with ASD associated with GDFC.

Objective: to study the structure of autoimmune reactions in children with ASD associated with GDFC, according to the accumulated evidence base and to identify associations of laboratory signs of autoimmunity and microorganisms to improve understanding of encephalopathy pathogenesis and diagnostic, monitoring and treatment algorithms.

Materials and methods. The medical data of 225 children aged 2 to 9 years with GDFC, who had clinical manifestations of ASD (183 boys and 42 girls) were retrospectively analyzed. The diagnosis of ASD was made by child psychiatrists according to the criteria DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders) and ICD-10 (The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) (study group; SG). The control group (CG) included 51 clinically healthy children (37 boys and 14 girls) of similar age and gender distribution who did not suffer from GDFC and ASD.

Pathogenic polymorphic variants of folate cycle genes were determined by PCR with restriction (Sinevo, Ukraine). Autoantibodies to autoantigens of CNS subcortical ganglion neurons in blood serum were determined using a Cunningham panel (Molecular Labs, Inc, USA). Serum autoantibodies to neurons of the mesolimbic system of the brain were identified by ELISA (MDI Limbach Berlin GmbH, Germany). Autoimmunization to myelin was assessed by serum autoantibody titer to basic myelin protein (ELISA) and signs of neutrophil and CD8+ T-lymphocyte sensitization to hemispheric white matter autoantigens (cell-based assay; department of neuroimmunology at the Neurosurgery Institute; Ukraine). Serum autoantibodies to nuclei of connective tissue cells and striated muscle proteins were determined by western blot analysis (Sinevo, Ukraine).

To determine the significance of the differences between the indicators in the observation groups, we used the Student's parametric T-test with the confidence probability p and the nonparametric criterion – the number of signs Z according to Urbach Yu. V. The odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (95% CI) were used to study the associations between the studied indicators.

The study was performed as a fragment of research work commissioned by the Ministry of Health of Ukraine (№ state registration 0121U107940).

Research. Positive results of the Cunningham panel occurred in 32%, laboratory signs of autoimmunization to neurons of the mesolimbic system – 36%, myelin of white matter of the hemispheres – 43%, nuclei autoantigens of connective tissue cells – 53%, proteins of striated muscles – 48% of cases among children SG (in general – 68% of cases; $p < 0.05$; $Z < Z_{0.05}$). Serological signs of autoimmunization to autoantigens of the subcortical ganglia of the cerebral hemispheres were associated with *Streptococcus pyogenes* and *Borrelia*, to neurons of the mesolimbic system – EBV, HHV-6, HHV-7, *Toxoplasma* and TTV, to CNS myelin – EBV, HHV-6, HHV-7, *Borrelia* and TTV, to the nuclei of connective tissue cells and striated muscles – EBV, HHV-6, HHV-7, *Borrelia* and TTV.

Conclusions. In children with ASD associated with GDFC laboratory signs of microbial-induced autoimmunity to a number of cerebral and extracerebral autoantigens has been evaluated, which affects the mental and physical health of patients and is a potential target for effective therapeutic interventions.

Key words: herpesviruses, *Streptococcus*, PANDAS, autoimmune limbic encephalitis, antinuclear autoantibodies.

ВПЛИВ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЇ ВАКЦИНАЦІЇ ПРОТИ ГРИПУ НА КЛІТИННИЙ СКЛАД СЕКРЕТУ РОТОГЛОТКИ ТА ЙОГО МІКРОБІОТУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ЗАПАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

^{1,2}Тимченко М.Д. <https://orcid.org/0000-0002-2734-604X>

²Тимченко С.В. <https://orcid.org/0000-0001-8308-4243>

²Волосевич Л.І. <https://orcid.org/0000-0002-3840-724X>

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

²ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України», Київ, Україна

timchenkomd@gmail.com

Актуальність. До останнього часу залишаються недостатньо висвітленими питання про зміни імунологічних та мікробіологічних показників стану ротоглотки у вакцинованих проти вірусних інфекцій.

Ціль: визначити вплив парентеральної вакцинації проти грипу на клітинний та мікробний склад секрету ротоглотки у хворих з хронічними запальними захворюваннями верхніх дихальних шляхів з наявністю у крові анамнестичних антитіл до вакцинальних штамів вірусів.

Матеріали та методи. Досліджено зразки ротоглоткового секрету 18 хворих на хронічні запальні захворювання верхніх дихальних шляхів, до та через 3, 12 і 36 тижнів після щеплення інактивованою спліт-вакциною проти грипу, та 25 донорів. В зразках визначали клітинний склад осаду та проводили мікробіологічне дослідження секрету ротоглотки.

Результати. Через 3 та 12 тижнів після щеплення у вакцинованих хворих достовірно змінювались відносні показники надходження до секрету ротоглотки лімфоцитів та складу його мікробіоти при збереженні її загальної кількості. Через 36 тижнів клітинний склад та представництво патогенної і умовно патогенної мікрофлори практично повертались до вихідного рівня при істотному зростанні загальної чисельності мікробіоти.

Висновки. Парентеральне введення інактивованої спліт-вакцини особам з хронічними запальними захворюваннями верхніх дихальних шляхів з наявністю в крові анамнестичних антитіл до вакцинальних штамів вірусів супроводжується одночасним тимчасовим збільшенням представництва лімфоцитів з одночасним зменшенням чисельності транзиторної мікрофлори у складі секрету ротоглотки.

Ключові слова: секрет ротоглотки, лімфоцити, мікрофлора.

Актуальність. Клінічні дослідження ефекту від проведеної вакцинації проти грипу у своїй більшості спрямовані на оцінку досягнутого протівірусного стерилізуючого імунітету. І значно менша кількість робіт торкається впливу проведеного щеплення на механізми неспецифічної резистентності та зменшення захворюваності вакцинованих пацієнтів на бактеріальні інфекції [1, 2]. Однак питання щодо поствакцинального стану хворих на супутні хронічні захворювання залишаються актуальними, особливо сьогодні, при нових викликах для людства, спричинених пандемією. Оскільки на сьогодні все ще мало відомо про вплив клітин імунної системи на мікробіоту ротової порожнини [3], нами було оцінено клітинний та мікробний склад змішаної слини у пацієнтів в різні терміни після сезонного парентерального щеплення інактивованою вакциною проти грипу. Виходячи з того, що основним джерелом надходження лімфоцитів (Лф) до складу змішаної слини є лімфоїдна тканина, у дослідженні брали участь пацієнти із збереженими структурами лімфоутворень глоткового кільця Вальдеєра-Пирогова та наявністю апендикса.

Ціль: визначення впливу парентеральної вакцинації проти грипу у різні терміни після щеплення на клітинний та мікробний склад секрету ротоглотки хворих з хронічними запальними захворюваннями верхніх дихальних шляхів, при наявності у них в крові анамнестичних антитіл до вакцинальних штамів вірусів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 18 хворих на хронічні запальні захворювання (ХЗЗ) верхніх дихальних шляхів (ВДШ) працездатного віку обох статей, серед яких у 9 діагностували хронічний риносинусит, у 5 – хронічний тонзиліт, у 4 – хронічний фарингіт. Протягом 1 року перед дослідженням їм не робили будь-яких щеплень. Хворих на ХЗЗ обстежували до вакцинації та через 3, 12 та 36 тижнів після неї. Контрольну групу склали 25 донорів. Всі хворі та клінічно здорові особи контрольної групи мали санований стан ротової порожнини. Від кожного обстеженого отримували зразки секрету ротоглотки (СР) у відповідності з раніше розробленими рекомендаціями [4].

Відносний клітинний склад СР підраховували шляхом мікроскопічного дослідження мазків клітинного осаду [4].

Якісний склад мікрофлори СР хворих на ХЗЗ ВДШ визначали за її морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями за стандартними методиками [5, 6, 7, 8]. Кількісні мікробіологічні параметри оцінювали за сумарним вмістом мікроорганізмів, виділених з 1 мл СР (як сумарний десятковий логарифм кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в мл – lg КУО/мл) та за відсотком патогенної та умовно патогенної (транзитornoї) мікрофлори (ТМФ) від сумарного вмісту виділених з СР мікроорганізмів. До ТМФ відносили: *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*, *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, а також *Candida* spp. у кількості ≥ 3 lg КУО/мл. Резидентними (непатогенними) вважали *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., а також *Candida* spp. у кількості ≤ 2 lg КУО/мл.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням двобічних непараметричних критеріїв «U» Манна-Уїтні та «T» Вілкоксона за допомогою пакету програмного забезпечення для біометричних досліджень WinPEPI.

Результати наведено у вигляді значень медіани (Me) та процентилей (P25-P75). Кількість проведених досліджень позначали як n. Відмінності у значеннях Me вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Всі процедури, яких дотримувались, відповідали етичним стандартам відповідального комітету

з питань експериментів на людях (інституційним та національним та Гельсінкській декларації 1975 року, переглянутої у 2000 році) та затвержені комітетом з етики ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України». Інформована згода на участь у дослідженні була отримана від усіх пацієнтів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слизова оболонка ВДШ, що омивається змішаною слиною, є першим захисним бар'єром організму від респіраторних інфекцій. Тому зміни, що відбуваються на її поверхні, можуть помітно впливати на захищеність організму від дії потрапляючих на неї вірусів та бактерій.

Визначення відносного клітинного складу СР у різні терміни після введення вакцини (табл. 1) не виявили достовірних зрушень кількісного представництва епітеліоцитів та поліморфноядерних лейкоцитів (ПЯЛ) на різних строках дослідження. Кількість Лф до вакцинації також не відрізнялась від такої у донорів.

Між тим, і через 3, і через 12 тижнів після щеплення у вакцинованих осіб достовірно зростає відсоток Лф, як у порівнянні з невакцинованими донорами, так і відносно показників кожного окремого хворого до та після вакцинації: відповідно $pT < 0,01$ через 3 та $pT < 0,05$ через 12 тижнів. Однак, на 36-му тижні вакцинального процесу кількість цих клітин у СР хворих почала зменшуватись і вже істотно не відрізнялась як від значень контролю, так і від їх довакцинального рівня.

Такий результат імовірно був пов'язаний із неспецифічною локальною реакцією на системне антигенне навантаження при вакцинації. І ця реакція, на наш погляд, могла бути спрямованою на підсилення

Таблиця 1

Клітинний склад секрету ротоглотки у хворих на хронічні запальні захворювання верхніх дихальних шляхів до та у різні строки після парентерального введення вакцини проти грипу

Клітини	Статистичні показники	Вміст клітин, %				Донори
		Хворі на ХЗЗ ВДШ				
		Строки відносно вакцинації				
		До	Через 3 тижні	Через 12 тижнів	Через 36 тижнів	
	N	18	18	17	16	25
Епітеліо-цити	Me	91,50	88,50	89,00	84,50	95,00
	P25-P75	85,00-98,00	81,00-96,00	80,00-93,50	78,00-92,00	84,00-96,00
ПЯЛ	Me	7,50	9,00	6,00	11,00	4,00
	P25-P75	2,00-12,00	2,00-12,00	4,00-12,50	3,50-18,50	2,00-10,50
Лімфо-цити	Me	1,00	3,00*	3,00**	2,50	1,00
	P25-P75	0-3,00	1,00-6,00	2,00-5,00	1,00-4,50	0-2,00

Примітка. Достовірність розбіжностей з контролем: * – $pU < 0,01$; ** – $pU < 0,001$.

захисту поверхні слизової оболонки від патогенних чинників інфекційної природи. Для обґрунтування цього твердження в ті ж самі строки після вакцинації досліджувалась можливість змін у складі мікробіоти секрету ротоглотки.

Було показано, що хоча загальний вміст мікроорганізмів у секреті ротоглотки хворих на ХЗЗ ВДШ до та протягом 12 тижнів після щеплення суттєво не відрізнявся від такого у донорів (табл. 2), вміст ТМФ у СР хворих на ХЗЗ ВДШ до вакцинації в середньому був несуттєво вище такого у донорів (табл. 3). Через 3 тижні після щеплення відсоток ТМФ зменшувався – недостовірно відносно донорів, але суттєво порівняно із рівнем до вакцинації ($pT < 0,05$). Такий результат досягався переважно за рахунок зменшення чисельності *S. pneumoniae* та *S. aureus*.

Через 12 тижнів після щеплення представництво ТМФ в СР також залишалось суттєво меншим, ніж було до вакцинації ($pT < 0,05$). Тобто, кількість бактеріальних патогенів в СР зменшувалася одночасно із збільшенням присутності у СР Лф.

Разом із цим, зменшення чисельності Лф у СР вакцинованих хворих на ХЗЗ ВДШ через 36 тижнів після введення вакцини супроводжувалось зростан-

ням як загальної чисельності мікрофлори у змішаній слині (табл. 2), так і представництва ТМФ порівняно із донорами (табл. 3). Останній показник хоча статистично достовірно перевищував такий у донорів, але практично майже повернувся до довакцинального рівня.

Давно відомий феномен еміграції лейкоцитів на поверхню слизової оболонки вже тривалий час розглядається у зв'язку із функціонуванням лімфоутворень ВДШ, зокрема при хронічному тонзиліті, коли внаслідок патологічного процесу на поверхні мигдаликів замість Лф починають переважати ПЯЛ [9, 10]. На роль лімфоутворень глоткового кільця Вальдеєра-Пирогова у надходженні Лф до змішаної слини вказують і результати спеціально проведених досліджень [11, 12, 13]. При цьому мигдалики беруть участь у захисті поверхні ВДШ від патогенних чинників, зокрема, бактеріального походження, а у відповідь на парентеральну вакцинацію проти сезонного грипу в них спостерігаються зміни у субпопуляційному складі Лф [14]. Тобто, цілком слушним може бути припущення, що і вихід Лф до СР є одним з проявів загальної відповіді лімфоїдної тканини організму на контакт з антигенним матеріалом.

Таблиця 2

Загальний вміст мікроорганізмів у секреті ротоглотки хворих на хронічні запальні захворювання верхніх дихальних шляхів до та в різні строки після введення вакцини проти грипу

Статистичні показники	Вміст мікроорганізмів, Іг КУО/мл				
	Хворі на ХЗЗ ВДШ				
	Строки відносно вакцинації				Донори
	До	Через 3 тижні	Через 12 тижнів	Через 36 тижнів	
N	18	11	15	16	25
Me	44,06	48,32	47,94	56,21**	45,21
P25-P75	37,75-53,36	37,57-58,15	45,36-58,98	46,32-66,36	35,81-55,00

Примітка. Достовірність розбіжностей з контролем: * – $pU < 0,05$; ** – $pU < 0,01$.

Таблиця 3

Відносний вміст транзиторної мікрофлори у секреті ротоглотки хворих на хронічні запальні захворювання верхніх дихальних шляхів до та в різні строки після введення вакцини проти грипу

Статистичні показники	Вміст транзиторної мікрофлори, %				
	Хворі на ХЗЗ ВДШ				
	Строки відносно вакцинації				Донори
	До	Через 3 тижні	Через 12 тижнів	Через 36 тижнів	
n	18	11	15	16	25
M	20,17	10,66	14,64	22,49	16,05
Me	21,20	8,10	16,20	21,61*	12,70
P25-P75	11,50-31,64	0-19,30	9,39-18,00	16,14-27,20	8,62-26,04

Примітка. Достовірність розбіжностей з контролем: * – $pU < 0,05$; ** – $pU < 0,01$.

При вивченні розвитку вакцинального імунітету у хворих на ХЗЗ ВДШ нами дійсно було виявлено тимчасове збільшення міграції лімфоїдних клітин до СР з максимумом на 12 тижні вакцинального процесу після парентерального введення інактивованої вакцини проти грипу, що містила у собі вірусні гемаглютиніни, до яких у крові обстежених пацієнтів ще до проведення сезонної вакцинації вже виявлялись анamnестичні антитіла. При цьому збільшення у клітинному складі СР відсотка Лф у вакцинованих осіб супроводжувалось одночасним зменшенням у складі мікробіоти змішаної слини частки ТМФ.

Відомо, що імунна система людини здатна регулювати мікробіоту ротової порожнини завдяки бар'єрній дії на поверхні слизової оболонки sIgA, і склад мікробіоти може бути змінений шляхом імунізації. Поряд із цим є дані досліджень, що демонструють, як і вроджені, і адаптивні імунні клітини відіграють ключову роль у впливі на мікробіоту кишечника, але мало що відомо про їх дію на мікробіоту ротової порожнини [3]. Саме тому отримані нами результати можуть розглядатись як новітні, що вказують на потенційну роль Лф, мігруючих з поверхні слизової оболонки, в її захисті від патогенів бактеріального походження. При цьому зазначений ефект не є специфічним, оскільки обумовлюється парентеральним введенням не бактеріальних, а вірусних антигенів і спрямовується не взагалі на всі мікроорганізми СР, а лише ті, що становлять загрозу виникнення інфекційного захворювання.

ВИСНОВКИ

1. При парентеральній вакцинації інактивованою спліт-вакциною проти грипу хворих на хронічні запальні захворювання верхніх дихальних шляхів із збереженими лімфоутвореннями глоткового кільця Вальдеєра-Пирогова, що вже мають у крові клінічно значимі титри антитіл до гемаглютининів вакцинальних штамів вірусів грипу А і В, достовірно збільшується міграція Лф до секрету ротоглотки протягом 12 тижнів після щеплення.

2. Цей процес супроводжується істотним зменшенням представництва у змішаній слині транзиторної мікрофлори без зрушень загального рівня бактеріального обсіменіння цієї біологічної рідини.

3. Через 36 тижнів після щеплення вихід лімфоцитів з поверхні слизової оболонки починає зменшуватись, а загальна чисельність мікробіоти та частка серед неї патогенних та умовно патогенних бактерій зростають, що вказує на тимчасовий імуностимулюючий ефект від проведеної вакцинації, одним з проявів якого є вплив на міграцію лімфоїдних клітин за межі слизової оболонки верхніх дихальних шляхів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

REFERENCES

1. Bouvier N.M. The Future of Influenza Vaccines: A Historical and Clinical Perspective. *Vaccines* (Basel). 2018. 6(3): 58. DOI: 10.3390/vaccines6030058
View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/2076-393X/6/3/58>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30200179/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6160951/>
2. Smith A.M., Huber V.C. The Unexpected Impact of Vaccines on Secondary Bacterial Infections Following Influenza. *Viral Immunol.* 2018. 31(2): 159-73. DOI: 10.1089/vim.2017.0138
View at: Publisher Site: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2017.0138>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29148920/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863092/>
3. Fidel Jr PL, Moyes D, Samaranyake L, Hagensee ME. Interplay between oral immunity in HIV and the microbiome. *Oral Dis.* 2020 Sep; 26 (Suppl 1): 59-68. DOI: 10.1111/odi.13515
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/odi.13515>
4. Zabolotnij D., Mel'nikov O., Timchenko S., Zabolotna D. [Pre-treatment of oropharyngeal secretion in ailments on chronic ignition and allergic diseases of upper dysfunctional paths: Method. recommendations]. Kyiv: AMSU, Ministry of Health of Ukraine. 2008. 34 p. [in Ukrainian]
5. Pokrovskij VI, Pozdeev OK. [Medical microbiology]. Moscow: GEOTAR MEDICINE. 2010. 768 p. [in Russian]
View at: Publisher Site: <http://www.geotar.ru/lots/Q0112307.html>
Studentlibrary: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970415306.html>
6. Men'shikov V. [Clinical laboratory analytics]. Moscow: Agat-Med. 2008. 815 p. [in Russian]
View at: Publisher Site: <https://www.booksmed.com/gematologiya/682-klinicheskaya-laboratornaya-analitika-menshikov.html>
7. Xoult D, Krig N, Snit P., Williams S. [Bergey's Keys to Bacteria. Vol. 1]. Moscow: Mir. 1997. 430 p. [in Russian]
View at: Publisher Site: <https://www.twirpx.com/file/656419/>
8. Xoult D, Krig N, Snit P., Williams S. [Bergey's Keys to Bacteria. Vol. 2]. Moscow: Mir. 1997. 780 p. [in Russian]
View at: Publisher Site: https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_59110
9. Verzhigora A, Veremeenko K, Vizirenko L. [Immuno-

- biology of the tonsils]. Kyiv: Vishha shkola. 1978. 147 p. [in Russian]
10. Bredun O, Tymchenko S, Melnykov O. [Determining the dosage of the clinical warehouse of the surface of infantile dysplasia in children suffering from hypertrophy of infantile dysplasia and chronic tonsillitis]. Journal. upper, nasal and throat ailments. 2016; (3 Suppl.): 19-20. [in Ukrainian]
View at: URL: http://www.ents.com.ua/confdoc/2016_odessa.pdf
 11. Melnykov O, Tymchenko S, Volosevych M, Smahyna S, Tymchenko M, Poliakovskaia O, Nesterchuk V. [Microbiological and cytological destruction of the oropharyngeal secretions of the ailments on allergic diseases with the growing camp of children]. Journal. upper, nasal and throat ailments. 2012; (3 Suppl): 148-149. [in Ukrainian]
 12. Melnykov O, Tymchenko S, Volosevych M, Smahyna S, Tymchenko M, Poliakovskaia O, Nesterchuk V, Zarytska I. [Specific features of the infusion of immunotropic drugs in bacterial resemblance to often sick patients with a small camp of infants]. Journal. upper, nasal and throat ailments. 2013; (3 Suppl): 184. [in Ukrainian]
 13. Melnikov O, Timchenko S, Bredun O, Pisanko V, Mironyuk B, Timchenko M, Faraon I. [Ratio assess-
- ment of the oropharyngeal cell secretion of children from hypertrophic pharyngeal abnormalities]. Journal. upper, nasal and throat ailments. 2017; (3 Suppl): 72. [in Ukrainian]
View at: URL: http://www.ents.com.ua/confdoc/2017_zaporozie.pdf
 14. Amodio D, Cotugno N, Macchiarulo G, Rocca S, Dimopoulos Y, Castrucci M-R, De Vito R, Tucci FM, McDermott AB, Narpala SR, Rossi P, Koup RA, Palma P, Petrovas C. Quantitative multiplexed imaging analysis reveals a strong association between immunogen-specific B cell responses and tonsillar germinal center immune dynamics in children after influenza vaccination. J. Immunol. 2018. 200(2): 538-50. DOI: 10.4049/jimmunol.1701312
View at: Publisher Site: <https://www.jimmunol.org/content/200/2/538>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29237774/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5760299/>

Article history
Received: 24.06.2021
Revision requested: 22.07.2021
Revision received: 19.08.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

ВЛИЯНИЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ГРИППА НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ СЕКРЕТА РОТОГЛОТКИ И ЕГО МИКРОБИОТУ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

^{1,2}Тимченко М.Д., ²Тимченко С.В., ²Волосевич Л.И.

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

²ДУ «Институт отоларингологии им. проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины», Киев, Украина

timchenkomd@gmail.com

Актуальность. До последнего времени остаются недостаточно освещенными вопросы изменений иммунологических и микробиологических показателей состояния ротоглотки у вакцинированных против вирусных инфекций.

Цель: определить влияние парентеральной вакцинации против гриппа на клеточный и микробный состав секрета ротоглотки у больных с хроническими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей с наличием в крови анамнестических антител к прививочным штаммам вирусов.

Материалы и методы. Исследованы образцы ротоглоточного секрета 18 больных с хроническими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей до и через 3, 12 и 36 недель после прививки инактивированной сплит-вакциной против гриппа, а также 25 доноров. В образцах определяли клеточный состав осадка и проводили микробиологическое исследование секрета ротоглотки.

Результаты. Через 3 и 12 недель после прививки у вакцинированных больных достоверно изменялись относительные показатели миграции в секрет ротоглотки лимфоцитов и состав его микробиоты при сохранении ее общего количества. Через 36 недель клеточный состав и представительство патогенной и условно патогенной микрофлоры практически возвращались к исходному уровню при существенном росте общей численности микробиоты.

Выводы. Парентеральное введение инактивированной сплит-вакцины лицам с хроническими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей с наличием в крови анамнестических антител к прививочным штаммам вирусов сопровождается временным увеличением представительства лимфоцитов с одновременным уменьшением численности транзитной микрофлоры в составе секрета ротоглотки.

Ключевые слова: секрет ротоглотки, лимфоциты, микрофлора.

EFFECT OF PARENTERAL INFLUENZA VACCINATION ON THE CELL COMPOSITION AND ITS MICROBIOTA OF THE OROPHARYNGEAL SECRETION IN PATIENTS WITH CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT

^{1,2}*Timchenko M.D., ²Timchenko S.V., ²Volosevich L.I.*

¹*Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine*

²*State Institution «O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine*

timchenkomd@gmail.com

Relevance. Until recently, the issues of changes in immunological and microbiological parameters of the oropharynx in vaccinated against viral infections remain insufficiently covered.

Objective: to determine the effect of parenteral influenza vaccination on the cellular and microbial composition of the oropharyngeal secretion in patients with chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract with the presence of anamnestic antibodies to vaccine strains of viruses.

Materials and methods. Oropharyngeal secretion samples of 18 patients with chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract studied before and 3, 12, and 36 weeks after vaccination with inactivated split influenza vaccine. As control 25 donors were used. The cell composition of the sediment was determined. A microbiological study of the oropharyngeal secretion was performed.

Results. At 3 and 12 weeks after vaccination, vaccinated patients significantly changed the relative rates of entry into the oropharyngeal secretion of lymphocytes and the composition of its microbiota while maintaining its total number. After 36 weeks, the cell composition and the representation of pathogenic and opportunistic microflora practically returned to baseline with a significant increase in the total microbiota.

Conclusions. Parenteral administration of inactivated split vaccine to persons with chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract with the presence in the blood of anamnestic antibodies to vaccine strains of viruses is accompanied by a simultaneous temporary increase in lymphocyte representation with a simultaneous decrease in the number of transfusion microflora in the oropharyngeal secretion.

Keywords: oropharyngeal secretion, lymphocytes, microflora.

CORRELATION OF GLYCOSYLATED HEMOGLOBIN LEVELS WITH AUDITORY AND VISUAL REACTION TIME IN DIABETICS

¹*Shweta Patil* <https://orcid.org/0000-0002-8997-5036>

²*Sangita Phatale* <https://orcid.org/0000-0002-0490-4379>

³*Basavaraj Malipatil* <https://orcid.org/0000-0001-7288-4333>

¹ *S. Nijlingappa Medical College & Hanagal Shri Kumareshwar Hospital, Bagalkot, Karnataka, India*

² *Mahatma Gandhi Mission Medical College, Aurangabad, Maharashtra, India*

³ *Mahadevappa Rampure Medical College, Gulbarga, Karnataka, India*

patilshw@gmail.com

Relevance. Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders wherein hyperglycemia occurs either due to lack of insulin secretion and/or reduced insulin sensitivity of the tissues. One of the commonest complications of diabetes is neuropathy and its severity will depend on how long and how high the hyperglycemia has been prevalent. Chronic hyperglycemia in diabetes affects the peripheral nerves and slows psychomotor responses in persons who do not have proper glycemic control. This decreased psychomotor response because of improper glycemic control affects the reaction time in diabetics.

Objective: to assess and compare the auditory and visual reaction time in group-1 and group-2 diabetics and to correlate it with glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in both the groups.

Methods. The study was conducted on 60 subjects aged between 40-50 years after obtaining the permission of the ethical committee of our institution. The group consisted of 60 well controlled diabetic patients (HbA1c < 7%) with history of diabetes for 1-10 years attending the medical OPD of Basaveshwar teaching and general hospital, Gulbarga. Diabetics with HbA1c 5-6% were grouped as group-1 and those with HbA1c 6-7% as group 2. The visual reaction time for green and red light and auditory reaction time for tone and click sound was measured by using reaction time apparatus 2x4, Anand agencies Pune. HbA1c was done by micro-column method.

Results. The visual and auditory reaction time of diabetics with HbA1c 5-6% was faster as compared to the diabetics with HbA1c 6-7% with $P < 0.001$ and a statistically significant positive correlation was found between HbA1c levels and the visual and auditory reaction time.

Conclusion. Poor glycemic control slows psychomotor responses and thus affects the visual and auditory reaction time.

Key words: Diabetes, Hyperglycemia, Glycemic control, Reaction time, HbA1c, Diabetic Neuropathy.

Relevance. Diabetes mellitus is prevalent worldwide. About 285 million people had diabetes, with type 2 contributing to 90% of the cases [1]. The incidence of diabetes is rising, and by 2030, this number is estimated to almost double [2]. In India more than 62 million individuals are currently diagnosed with the diabetes [3, 4]. With this rapidly increasing rate diabetes could be considered to be a potential epidemic in India. The etiology of diabetes is multifactorial. It may be due to and genetic factors along with change of lifestyle, easy access junk foods, sedentary life, stress and steady urban migration. Even with this increasing incidence of diabetes in India, there are only a few studies conducted on the prevalence of diabetes and its complications. One of the major causes of mortality and morbidity in our country is diabetes mellitus, which is due to high blood glucose levels. About four million deaths in the 20-79 age group were probably caused due to diabetes in 2010, which was about 6.8% of global all-cause mortality in this age group.

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia which may be due to insufficient insulin secretion and/or reduced insulin sensitivity to the tissue. It is associated with abnormal glucose, lipid and protein metabolism. The chronic hyperglycemia has a

higher risk of developing neuropathy, microangiopathy, atherosclerosis and impaired wound healing. Diabetes mellitus can affect multiple organs in the body, some of which may be fatal. A less addressed and not so well recognised complication of diabetes is cognitive dysfunction. Cognitive dysfunction found in diabetic patients were related to their disease. The first noticed case of cognitive dysfunction in diabetes mellitus patient was in 1922, where diabetic patients 'who were free from acidosis but usually not sugar free', had impaired memory and attention when cognitive test was done.

Diabetes mellitus causes both microvascular and macrovascular complications. It has been shown in studies that microvascular complications are mainly because of hyperglycemia, whereas insulin resistance is the major determinant in macrovascular disease [5]. Diabetic neuropathy is an important cause of sudden deaths in diabetics and both the degree of glycemic control and duration of diabetes are responsible for it, though the onset of this complication is more dependent on the duration of diabetes.

Diabetic neuropathy (DN) is defined as, patient with diabetes mellitus (DM) having signs and symptoms of peripheral nerve dysfunction wherein other causes of

peripheral nerve dysfunction have been excluded. The incidence of DN in India is not well known but a study from South India showed that 19.1% type II diabetic patients had peripheral neuropathy [6]. One of the commonest causes of peripheral neuropathy is DN and it requires more frequent hospitalisation than any other complications of diabetes. It is also one of the commonest causes of non-traumatic amputation. All types of diabetic patients-insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), and secondary diabetic patients-can develop neuropathy. The prevalence of diabetic neuropathy varies in various studies due to inconsistency in the definition of neuropathy. The best data regarding prevalence of neuropathy came from the extensive study of nearly 4400 clinic patients undertaken by Pirart. According to his study the prevalence rate of DN ranges from 7% to 50% depending on the duration of diabetes, with 7% within one year of diagnosis to 50% for those with more than 25years of diabetes. Males were more affected than females. The risk for the complication of neuropathy increases with increasing duration and severity of hyperglycemia.

The development of diabetic neuropathy is probably due to vascular lesions and it was first considered in 1893 and was supported by the pathologic studies of Woltman and Wolder in 1929. They concluded that "atherosclerosis of nutrient vessel of the nerve plays a leading part in the production of diabetic neuritis".

Pathogenesis of diabetic neuropathy is multifactorial. Pathologic changes inherent to neurons caused by hyperglycemia [7] and ischemic damage to the neurons caused by decreased neurovascular blood flow [8] both factors are responsible. Because of these vascular elements, diabetic neuropathy is considered to be a microvascular complication.

Chronic hyperglycaemia in diabetes affects peripheral nerves in the somato-sensory system. It also slows psychomotor responses in those individuals without proper glycemic control, which may affect reaction time.

Reaction time (RT) is the elapsed time between the presentation of a sensory stimulus and the subsequent behavioral response. Different types of stimuli can be tried to elicit a particular response such as light, sound, etc. The measure of reaction time has been used to evaluate the processing speed [9] of Central Nervous System, the co-ordination between the sensory and motor systems [10] and performance of an individual.

Glycosylated hemoglobin is widely accepted and the most reliable test for assessing glycemic control. Persistent hyperglycemia causes non-enzymatic glycosylation of polypeptides and proteins, including hemoglobin. Of all the Glycosylated form of hemoglobin, HbA1c is the most stable, more than 80 per cent of the Glycosylated form is HbA1c. Glycosylated hemoglobin is an index of long-term blood glucose concentrations and it also helps to assess the risk for the development of complications in patients with diabetes mellitus [11].

Lowering of HbA1c reduces the risk of neuropathic, microvascular and possibly macrovascular complications of diabetes [12]. So strict glycemic control is important in delaying the onset and progression of microvascular complications of diabetes including neuropathy. Hence, it is recommended that HbA1c testing be used as a preventive measure to reduce morbidity and mortality due to complications of diabetes in the community.

Diabetic neuropathy is the most common complication in diabetes, chronic hyperglycemia being the important cause for it. Studies with comparison between diabetic patients and control groups have been done, our study involves only the controlled diabetic patients in order to highlight the importance of glycemic control in reducing the morbidity and mortality in diabetics due to neuropathy. The current study is done by measuring the auditory and visual reaction time, and HbA1c. The auditory and visual reaction time is correlated with HbA1c levels.

Objective: to assess and compare the auditory and visual reaction time in group-1 and group-2 diabetics and to correlate it with HbA1c levels in both the groups.

METHODS

After obtaining the permission from the ethical committee of our institution (M R medical college, Gulbarga) the study was conducted on 60 subjects aged between 40-50 years. The group consisted of 60 well controlled diabetic patients (HbA1c < 7%) with history of diabetes for 1-10 years attending the medical OPD of Basaveshwar teaching and general hospital, Gulbarga. Diabetics with HbA1c 5-6% were grouped as group-1 and those with HbA1c 6-7% as group 2. Diabetics with auditory or visual disturbance, Alcoholics, hypertensives, smokers, Clinical evidence of peripheral neuropathy, Muscle weakness, myopathy, Mental or psychological disorders, Neurovascular complications, any pathology or injury to the upper limb and Clinical evidence of any other illnesses which effect the reaction time were excluded from the study.

HbA1c is done by micro column method which contains a pre-weighted amount of resin equilibrated with phosphate buffer 72mmol/L, pH6.5. Sodium azide 0.95g/L. After preparing the hemolysate, where the labile fraction is eliminated. HbA1c is specifically eluted after washing away the HbA1a+b fraction and is quantified by direct photometric reading at 415 nm.

The Auditory and visual reaction time was measured using reaction time apparatus. This apparatus is a portable research reaction timer with 2 response choices. It has an inbuilt chronoscope-4 digit chronoscope with least count of 1/1000 seconds and works on 230 volts AC. The apparatus has two sides, one 'S's (Subject) and the other 'E's (Examiner). There are 4 keys, and 4 selector switches on 'E's side for selecting 'S's left or right key. When the key marked green light is pressed on the 'E's side 'S'

will see the same on his side. Similarly, for the red light, buzzer and click. The push button on E's side rings the bell. This is a signal for S to press the right or left key as selected by E' with the selector switch. Then E presses any of the keys giving the required stimulus. The stimulus key is double key. It gives the stimulus and also starts the chronoscope. As soon as the stimulus is received S lifts his finger from the right or left key. This stops the chronoscope and thus reaction time to any of the stimuli is obtained. All the subjects are thoroughly acquainted with apparatus and 3 readings were taken after practice trials for 4 stimuli i-e; Red and Green colour for visual reaction time, Tone and Click for Auditory reaction time. Reaction time was recorded using the dominant hand.

Statistical method used: Student t test and Pearson's correlation co-efficient were used wherever ap-

propriate to analyse the data. P Value <0.001 – Highly Significant, P Value <0.01 – Moderately significant. P Value <0.05 – Significant, P Value >0.05 – Not Significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Table-1 and Figure-1 depict comparison of VRT and ART with HbA1c levels in diabetics. The table shows that the VRT for green and red light stimuli and ART for tone and click sound stimuli is prolonged in group-2 diabetics than in group-1 diabetics with $P < 0.001$ which is statistically extremely significant.

Table-2 shows significant positive correlation with $P < 0.001$ between HbA1c 5-6% and visual green light and a significant positive correlation with auditory click sound reaction times P value being < 0.05.

Table 1

Comparison of Visual and Auditory Reaction Time in Group-1 and Group-2 Diabetics

Reaction Time, msec		Group-1	Group-2	t-test	P-Value
Visual	Green	0.199±0.014	0.2445±0.021	t=11.37	P<0.001
	Red	0.214±0.009	0.2442±0.023	t=6.04	P<0.001
Auditory	Tone	0.174±0.0129	0.203±0.0144	t=7.38	P<0.001
	Click	0.170±0.0073	0.1992±0.0166	t=8.78	P<0.001

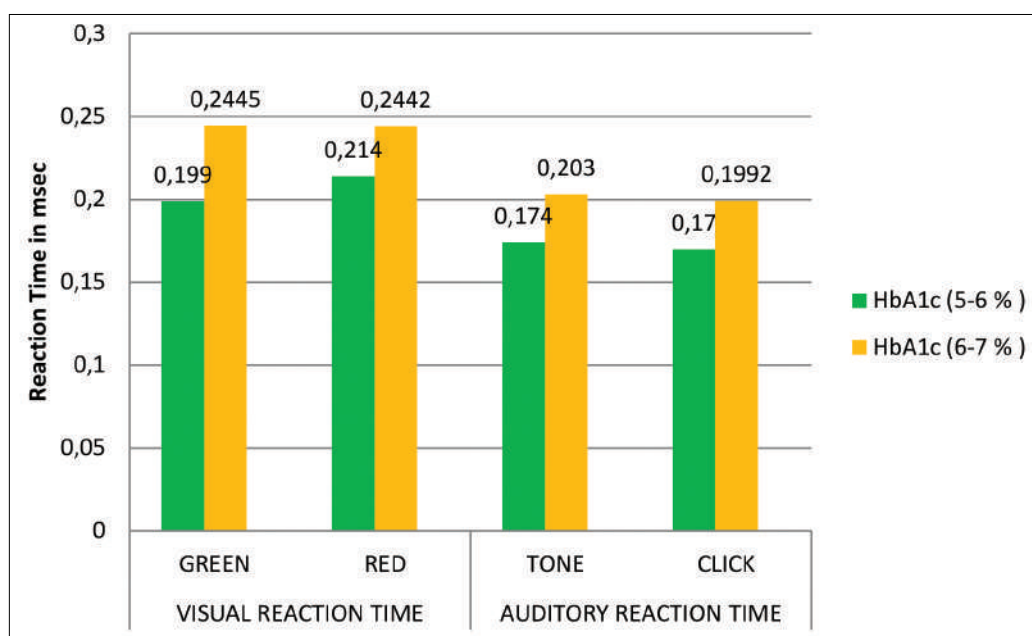


Fig. 1. Comparison of Visual and Auditory Reaction Time in Group-1 and Group-2 Diabetics

Table 2

Correlation between HbA1c Level and Visual and Auditory Reaction Time in group-1 Diabetics

Reaction time, msec		Correlation coefficient, (R)	P-Value
Visual	Green	0.662	P<0.001
	Red	0.295	P>0.05
Auditory	Tone	0.356	P>0.05
	Click	0.428	P<0.05

Correlation between HbA1c Level and Visual and Auditory reaction time in group-2 diabetics

Reaction Time, msec		Correlation coefficient, (r)	P-Value
Visual	Green	0.769	P<0.01
	Red	0.502	P<0.01
Auditory	Tone	0.649	P<0.01
	Click	0.710	P<0.01

Table-3 shows highly significant correlation between HbA1c 6-7% and visual green and red light and auditory tone and click sound reaction times.

In our study, we found that diabetics with HbA1c 5-6% performed better than diabetics with HbA1c 6-7% with a significant positive correlation between HbA1c levels and visual and auditory reaction time. Improper glycemic control reduces psychomotor efficiency, motor speed and attention. The enzyme aldose reductase is activated by the intracellular hyperglycemia which in turn increases the formation of sorbitol. Thus, sorbitol gets accumulated. It is neurotoxic and reduces the Na-K ATPase activity of the cell. As a result of uncontrolled hyperglycemia, the sodium-dependent myo-inositol uptake is competitively inhibited. It is hypothesized that this decreased uptake leads to the decreased concentration of myo-inositol in peripheral nerves and also decrease in the sodium potassium ATPase activity which leads to decrease in nerve conduction.

Longstanding hyperglycemia causes an increased flux of the polyol pathway, enhanced advanced glycation end-products formation, excessive release of cytokines, activation of protein kinase C and exaggerated oxidative stress all of which leads to peripheral nerve injury. Extremely long axons which originate in the small neuronal body are more likely to be affected on their most distal side because of malnutritional axonal support or environmental insults. Deficient vascular supply with impaired autoregulation is the most likely cause of hypoxic damage in the nerve. Such effects caused by long-term hyperglycemia are critical for peripheral nerve damage, resulting in distal-predominant nerve fiber degeneration. The axonal degeneration of both the myelinated and unmyelinated fibers, axonal shrinkage, thickening of the basement membrane and microthrombi are responsible for delayed motor nerve conduction and hence, the increased reaction time.

The DCCT has documented that there is a direct relation between blood glucose concentrations as measured by HbA1c and the risk of complications. The risk of microvascular complications varies continuously with HbA1c concentration below which risk is eliminated. Analogous correlations between HbA1c and complications were observed in patients with diabetes type 2 mellitus in the UKPDS trial. Each 1% reduction in HbA1c (e.g. from 8% to 7%) was associated with risk reduction of 37% for micro vascular complications. An increase

of 1% in HbA1c was associated with a 28% increase in the risk of death [13]. Based on the DCCT and UKPDS the ADA recommends that a primary treatment goal in adults with diabetes should be near-normal glycemia with HbA1c less than 7%.

Graf RJ et al. found baseline HbA1c levels correlated with the incidence of peripheral neuropathy. But study by Susenko et al. found no correlation between HbA1c levels and peripheral neuropathy. In a study by Padilla-Medina JA et al, the diabetic patients simple reaction times (SRT) were an average 24% longer than the reaction time in non-diabetic group and a significant average difference of 41% was obtained in choice reaction time studied through performance indexes (d'). A positive correlation of 0.6594 between the duration of diabetes and SRT of diabetic patients was obtained [14, 15]. On the contrary, Dey J et al, found no correlation between the duration of diabetes and cognitive function in those with NIDDM less than 18 years. S Venkataraman, V S Ganesan and others found that a reduction in the glycemic levels from the hyperglycemic range resulted in a significant improvement in VRT, one of the indices of cognitive skills routinely performed in diabetic subjects.

The study conducted by Christopher M Ryan and Theresa M Williams to examine learning and memory processes in a group of 82 younger adults with a long-standing history of childhood-onset IDDM, showed that they performed worse on measures of psychomotor efficiency, with degree of chronic hyperglycemia being the best predictor of psychomotor slowing.

Clarrisa Smith Holmes et al, found that the rapid motor responses following a visual stimulus was delayed in diabetic subjects at extremes of glucose levels compared to euglycemic state. Paradoxically, Flender and Lifshitz observed improved fine motor coordination at elevated blood glucose levels. Franklin GM, Kahan LB, Baxter J, Marshall JA, Hamman RE found neuropathy to be significantly associated with duration of diabetes, glycemic control, age, height and male gender.

Limitations. The major drawback of our study is that we have examined only auditory and visual reaction time for demonstrating correlation between HbA1c levels and neuropathy. Since auditory and visual reaction time can be affected by so many other factors it is practically impossible to exclude all of them in these patients. Hence, additional pathological and functional tests have to be done in order to substantiate the mechanisms responsible

for the differences in auditory and visual reaction time that we have seen in these two groups.

CONCLUSION

We found a positive correlation between HbA1c levels and visual and auditory reaction times in our study. This shows that poor glycemic control slows psychomotor responses. We conclude our study with the observation that, glycemic control (HbA1c levels) affects the visual and auditory reaction time in diabetics.

REFERENCES

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27 (5): 1047-53. DOI: 10.2337/diacare.27.5.1047
View at: Publisher Site: <https://care.diabetesjournals.org/content/27/5/1047>
2. PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111519/>
The Diabetes Atlas. Ninth Edition. Brussels: International Diabetes Federation, 2019.
View at: Publisher Site: <https://idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>
URL: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf
3. Joshi SR, Parikh RM. India – diabetes capital of the world: now heading towards hypertension. *J Assoc Physicians India*. 2007;55:323-4.
View at: Publisher Site: <https://www.japi.org/t2f45494/india-diabetes-capital-of-the-world-now-heading-towards-hypertension>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17844690/>
4. Kumar A, Goel MK, Jain RB, Khanna P, Chaudhary V. India towards diabetes control: Key issues. *Australas Med J*. 2013;6(10):524-31. DOI: 10.4066/AMJ.2013.1791
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24223071/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3821052/>
5. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54(6):1615-25. DOI: 10.2337/diabetes.54.6.1615
View at: Publisher Site: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/6/1615>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15919781/>
7. Ashok S, Ramu M, Deepa R, Mohan V. Prevalence of neuropathy in type 2 diabetes patients attending diabetes center in South India. *J Assoc Physicians India*. 2002; 50: 546-50.
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12164406/>
8. Eichberg J. Protein kinase C changes in diabetes: is the concept relevant to neuropathy? *Int rev neurobiol*. 2002; 50:61-82. DOI: 10.1016/s0074-7742(02)50073-8
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0074774202500738?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12198821/>
9. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA. Diabetic neuropathy-A continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000; 16(6):408-33. DOI: 10.1002/1520-7560(200011/12)16:6<408::aid-dmrr158>3.0.co;2-r.
View at: Publisher Site: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1520-7560\(200011/12\)16:6%3C408::AID-DMRR158%3E3.0.CO;2-R](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1520-7560(200011/12)16:6%3C408::AID-DMRR158%3E3.0.CO;2-R)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11114101/>
10. Jensen A. *Clocking the mind: Mental chronometry and individual differences*. Amsterdam: Elsevier, 2006. – 286 p.
View at: Publisher Site: <https://www.elsevier.com/books/clocking-the-mind/jensen/978-0-08-044939-5>
URL: <https://lesacreduprintemps19.files.wordpress.com/2012/11/clocking-the-mind-mental-chronometry-and-individual-differences.pdf>
11. Venkatesh D, Rmamaachandra DL, Baboo NS, Rajan BK. Impact of psychological stress, gender and color on visual response latency. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2002;46(3):333-7.
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12613397/>
12. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Charles M, Peterson CM, Sacks DB. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes care*. 2004; 27(7):1761-73. DOI: 10.2337/diacare.27.7.1761
View at: Publisher Site: <https://care.diabetesjournals.org/content/27/7/1761>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15220264/>
13. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes – 2014. *Diabetes Care*. 2014; 37 (Suppl. 1): S14-S80. DOI: 10.2337/dc14-S014.
View at: Publisher Site: https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S14
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24357209/>
14. Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, Day N. Glycated hemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-NORFOLK). *BMJ*. 2001; 322(7277):15-8. DOI: 10.1136/bmj.322.7277.15
Publisher Site: <https://www.bmj.com/research>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11141143/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26599/>
15. Padilla-Medina JA, Prado-Olivarez J, Amador-Licona N, Cardona-Torres LM, Galicia-Resendiz D, Diaz-Carmona J. Study on simple reaction and choice times in patients with type I diabetes. *Comput Biol*

Med. 2013 May 1; 43(4):368-76. DOI: 10.1016/j.compbio.2013.01.010

View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010482513000243?via%3Dihub>

PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23402936/>

16. Sanchez-Marin FJ, Padilla-Medina JA. Simple reaction times and performance in the detection of visual stimuli of patients with diabetes. *Comput Biol Med.* 2010 Jun; 40(6):591-6. DOI: 10.1016/j.compbio.2010.04.003

View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010482510000673?via%3Dihub>

PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20451904/>

Article history
Received: 01.09.2021
Revision requested: 10.09.2021
Revision received: 20.09.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК РІВНЯ ГЛІКОЗИЛЬОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ І ЧАСУ СЛУХОВОЇ ТА ЗОРОВОЇ РЕАКЦІЙ ПРИ ДІАБЕТИ

¹Швета Патіл, ²Сангіта Фаталс, ³Басаварадж Малипатіл

¹Медичний коледж імені С. Ніджлінганни та лікарня Ханагал Шри Кумарешвар, Багалкот, Карнатака, Індія

²Медичний коледж місії Махатми Ганді, Аурангабад, Махараштра, Індія

³Медичний коледж Махадеванни Рампуре, Гулбарга, Карнатака, Індія

patilshw@gmail.com

Актуальність. Цукровий діабет є групою метаболічних порушень, при яких гіперглікемія виникає або через недостатній секретію інсуліну, або через зниження чутливості тканин до інсуліну. Одним з найбільш поширених ускладнень діабету є нейропатія, і її тяжкість буде залежати від ступеня і тривалості гіперглікемії. Хронічна гіперглікемія при діабеті призводить до ураження периферичних нервів і уповільнює швидкість реакції у людей, у яких відсутній належний глікемічний контроль. Зниження психомоторної реакції через недостатність глікемічного контролю впливає на час реакції у діабетиків.

Ціль: оцінити і порівняти час слухової і зорової реакцій у хворих на діабет в групах 1 та 2, і провести кореляцію з рівнем глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) в обох групах.

Методи. Дослідження проводилося за участю 60 осіб у віці від 40 до 50 років після отримання дозволу етичного комітету нашого інституту. Група складалася з 60 пацієнтів з добре контрольованим діабетом (HbA1c <7%) в анамнезі від 1 до 10 років, які відвідували медичний центр OPD в Басешвар, Гулбарга. Пацієнти з рівнем гемоглобіну HbA1c 5-6% були згруповані в групу 1, а пацієнти з HbA1c 6-7% - до групи 2. Час зорової реакції на зелений і червоний світло, і час слухової реакції на звук і клацання вимірювали за допомогою приладу визначення часу реакції 2x4, Anand agencies Pune. HbA1c визначали методом мікроколони.

Результати. Час зорової та слухової реакцій у хворих на діабет групи 1 (HbA1c 5-6%) було швидше $P < 0,001$ у порівнянні з хворими групи 2 (HbA1c 6-7%). Також була виявлена статистично значуща позитивна кореляція між рівнем HbA1c і часом зорової та слухової реакцій.

Висновки. Поганий глікемічний контроль уповільнює швидкість реакції і таким чином впливає на час зорової та слухової реакцій.

Ключові слова: діабет, гіперглікемія, глікемічний контроль, час реакції, HbA1c, діабетична нейропатія.

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА И ВРЕМЕНИ СЛУХОВОЙ И ЗРИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИЙ ПРИ ДИАБЕТЕ

¹Швета Патил, ²Сангіта Фатале, ³Басаварадж Малипатил

¹Медицинский колледж С. Ниджлинганни и больница Ханагал Шри Кумарешвар, Багалкот, Карнатака, Индия

²Медицинский колледж миссии Махатмы Ганди, Аурангабад, Махараштра, Индия

³Медицинский колледж Махадеванни Рампуре, Гулбарга, Карнатака, Индия

patilshw@gmail.com

Актуальность. Сахарный диабет представляет собой группу метаболіческих нарушений, при которых гиперглікемія возникает либо из-за недостаточной секреции инсулина, либо из-за снижения чувствительности тканей к инсулину. Одним из наиболее распространенных осложнений диабета является нейропатія, и ее тяжесть будет зависеть от степени и продолжи-

тельности гипергликемии. Хроническая гипергликемия при диабете приводит к поражению периферических нервов и замедляет психомоторные реакции у людей, у которых отсутствует надлежащий гликемический контроль. Снижение психомоторной реакции из-за недостаточности гликемического контроля влияет на время реакции у диабетиков.

Цель: оценить и сравнить время слуховой и зрительной реакций у больных диабетом в группах 1 и 2, и провести корреляцию с уровнем гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в обеих группах.

Методы. Исследование проводилось с участием 60 человек в возрасте от 40 до 50 лет после получения разрешения этического комитета нашего института. Группа состояла из 60 пациентов с хорошо контролируемым диабетом (HbA1c <7%) в анамнезе от 1 до 10 лет, посещавших медицинский центр OPD в Басаешвар, Гулбарг. Пациенты с уровнем гемоглобина HbA1c 5-6% были сгруппированы в группу 1, а пациенты с HbA1c 6-7% - в группу 2. Время зрительной реакции на зеленый и красный свет, и время слуховой реакции на звук и щелчок измеряли с помощью прибора определения времени реакции 2x4, Anand agencies Pune. HbA1c определяли методом микроколоники.

Результаты. Время зрительной и слуховой реакций у больных диабетом группы 1 (HbA1c 5-6%) было быстрее $P < 0,001$ по сравнению с больными группы 2 (HbA1c 6-7%). Также была обнаружена статистически значимая положительная корреляция между уровнем HbA1c и временем зрительной и слуховой реакций.

Выводы. Плохой гликемический контроль замедляет психомоторные реакции и таким образом влияет на время зрительной и слуховой реакций.

Ключевые слова: диабет, гипергликемия, гликемический контроль, время реакции, HbA1c, диабетическая нейропатия.

PROPHYLACTIC EFFECT OF A PROBIOTIC INTERVENTION IN CHILDREN PRONE TO ACUTE UPPER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

¹Marushko Y.V. <https://orcid.org/0000-0001-8066-9369>

¹Hyshchak T.V. <https://orcid.org/0000-0002-7920-7914>

²Todyka Y.I.

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

²Children's clinical hospital No 5, Kyiv, Ukraine

iurii.marushko@gmail.com

Relevance. Upper respiratory tract infections (URTIs) are common in children and often progress with secondary complications such as otitis media, bronchitis, or pneumonia, especially in children with recurrent URTIs. Probiotics displayed immunomodulatory effects in children and adults, supporting immune functions to prevent winter diseases or common colds.

Objectives. We assessed the effectiveness of a 6-week prophylaxis with probiotics (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 and *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) for preventing primary infections and/or secondary complications in URTI-prone children.

Methods. URTI-prone children were randomly divided into the probiotics (3×10⁹ CFU/day; 6 weeks) or control arm (no preventive intervention). The number of URTIs, duration and related complications were monitored for 6 months. Resistance index, number of medical visits, and antibiotics prescriptions were also recorded.

Results. After 2 months, probiotics reduced the number of URTIs (-2.34±0.13 vs -0.24±0.14; P<0.0001) and duration in (-1.13±0.18 vs -0.18±0.18 days; P=0.0011), and the number of secondary complications (-53% vs -5.8%; RR 0.5313 95% CI [0.3534, 0.7986] P=0.0058). Probiotic lowered resistance index (P<0.0001), number of medical consultations with specialized physicians (P=0.0033) and antibiotics prescriptions (P<0.0001).

Conclusions. Overall, a 6-week prophylaxis with combined probiotic (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 and *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) in URTI-prone children exerted a significant and clinically important health benefit, decreasing the number and duration of URTI episodes and secondary complications and reducing the resistance index to a near-normal value. Furthermore, potential societal benefits of reducing health care use and inadequate antibiotic prescriptions in children favour the use of this probiotic product as a preventive strategy against URTIs and their consequences in frequently sick children.

This trial was retrospectively registered on ClinicalTrials.gov (NCT04525040).

Keywords: Prevention, Pediatrics, Ear-Nose-Throat Infections, Resistance Index, Probiotics

Relevance. Upper respiratory tract infections (URTIs), including common cold and other ear-nose-throat infections (ENTIs), are common in children worldwide [1]. The burden of these infections on parents, children and the healthcare system is considered high; they often lead to more severe health complications, especially in cases of recurrent respiratory tract infections [1, 2] which are estimated to occur in approximately 10-15% of children [3]. For example, acute URTIs increase the risk of lower respiratory infections (e. g. bronchitis, pneumonia), of bacterial infections in the middle ear and sinuses, and can act as a trigger of cyclic vomiting (acetone) syndrome [4-10]. Consequently, URTIs were associated with an increase in the number of inappropriate antibiotics prescriptions in children [11, 12]. Considering that URTI treatment relies mainly on symptoms alleviation, there is a need to improve preventive strategies against URTIs in order to decrease the occurrence of secondary infections, help limit antibiotics prescription in children, and reduce the collective costs associated with secondary and tertiary health care use for complications (i.e. hospitalizations or surgeries).

Current preventive strategies against recurrent URTIs include improving hygiene and social distancing from sick individuals (i.e. sibling, parent, day-care), targeted vaccination and non-specific immunomodulation, the latter comprising, among others, the use of bacterial lysates, immune-promoting vitamins, probiotics, or herbal compounds [13-15]. Probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” [15]. Studies have associated recurrent respiratory infections with a loss of intestinal microbiota diversity [16]. Some probiotic formulations were shown to improve both the innate and adaptive immunity via local and systemic effects. Locally, probiotics can stimulate intestinal mucus secretion, compete with pathogens at the mucosal interface and ameliorate the intestinal barrier function by strengthening tight junctions which reduces intestinal permeability, thereby limiting the translocation of pathogens to the lamina propria and mesenteric lymph nodes. Systemically, probiotics have been shown to alter

the levels of circulating cytokines, regulate the balance between effector and regulatory T-cells and the Th1/Th2 immune responses [17, 18].

Over the past few years, several systematic reviews have concluded to the functional efficacy of probiotics at reducing the incidence and/or duration of acute respiratory infections in children [19-22]. Yet, available evidence from clinical trials was deemed of low to very low quality; more research is required to establish the effectiveness of specific probiotic formulations for the prevention of URTIs in children [19-22]. The high heterogeneity between studies was mainly attributed to the differences in the probiotic strains or formulations tested, their dosage as well as treatment and follow-up durations. Probiotic formula we used containing a combination of three bacterial strains, was shown to modulate immune responses in vitro and in vivo [23-27]. In clinical trials, the combined probiotic we use was previously reported to reduce the incidence of common winter diseases or ENTIs in frequently sick children who received the supplement for 3 to 9 months [23, 27]. Here, we report a functional clinical assessment of its preventive efficacy against URTIs and related complications in frequently sick children following a shorter 6-week preventive intervention course with a 6-month follow-up period.

Objectives. We assessed the effectiveness of a 6-week prophylaxis with probiotics (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 and *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) for preventing primary infections and/or secondary complications in URTI-prone children.

MATERIALS AND METHODS

Study Design. This randomized controlled trial was conducted in Ukraine between September 2016 and June 2017. Study conduct was in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics board of the Children's Clinical Hospital No. 5 (Kyiv, Ukraine) under the reference number 4/12.09.2016. Before enrolment in the study, a parent or legal tutor signed an informed consent form. This study was registered retrospectively in ClinicalTrials.gov (NCT04525040).

This trial observed a before-after design including a retrospective analysis period (6 months before enrolment) and a prospective observation period of 6 months after probiotic prophylaxis. Enrolled children were randomly assigned, using the sealed envelope method, to the pragmatic control group who received no preventive medication, or the intervention group receiving one probiotic (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 and *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) sachet (3×10⁹ CFU) daily for 6 weeks. The randomization list was computer-generated (<http://www.randomization.com/>) with a 3: 2 ratio and block size of 5, with an estimated study population of

60. The clinical observation period started after the probiotic prophylaxis for the intervention arm, and after the baseline visit for the control arm. Children in both groups received standard symptomatic treatment for URTI or secondary complications as needed during the study, except for medications with immunomodulatory properties (e.g., bacterial lysate vaccines, viral vaccines, corticosteroids, immunosuppressants, etc.), which were not permitted.

All participants underwent a physical examination and interview at the beginning and end of the study, and a monthly medical examination with interview during the 6-month follow-up. Data on URTI progression and secondary complications (e.g., otitis media, adenoiditis, bronchitis, pneumonia, or cyclic vomiting syndrome) were collected if a child suffered through an URTI over the specified month. The study was open label, but assessors (i.e., physicians) were blinded.

Participants. Children recruited for this study had frequent URTIs and were under care at the Children's Clinical Hospital №5 and outpatient clinic of family medicine general practice No. 1 in Svyatoshynskiy district, Kyiv. Inclusion criteria were as follows: aged between 3-10 years old, experiencing a high frequency of acute URTIs characterized by a resistance index above 0.33 (i.e., URTI episode occurring more often than once every 3 months) during the past year [28], and the absence of other medications or supplements with immunomodulatory properties in the treatment regimen. Children with chronic pathological conditions (e.g., diabetes, asthma, leukaemia, primary immunodeficiencies, HIV, hepatitis etc.) were excluded. The nomogram method was used for the calculation of sample size. A total of 60 children were anticipated based on a mean clinically significant difference of 0.37 in the resistance index, with a power of 0.80 and alpha of 0.05 [28, 29].

Prophylaxis. Probiotic is composed of *Lactobacillus helveticus* Rosell®-52 (R0052), *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 (R0033), and *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71 (R0071) totalling at least 3×10⁹ CFU/dose, packaged in sachets also containing 750 mg of fructo-oligosaccharides (FOS)/sachet (Lallemand Health Solutions Inc.). Participants in the probiotic arm were instructed to take one sachet daily, with a meal for 6 weeks.

Outcomes. The primary outcome was the number and duration of URTI episodes and the incidence of complications (total cases) in the probiotics versus control groups over the 6-month periods (baseline and follow-up). Secondary outcomes were monthly incidence of URTIs during follow-up, resistance index (calculated as the number of URTI episodes divided by the number of months under medical care), individual complications diagnosed (number of cases), number of medical visits to specialist, and number of antibiotics prescriptions. Adverse events were surveyed at each monthly study visit during follow-up.

Statistical analyses. R version 4.1.0 was used to compare baseline characteristics using Fisher’s exact test (proportions) or unpaired Student’s t-test (mean±S.E.M.). Between-group comparisons of the change from baseline were analysed with the SAS JMP software v. 15, using the Wilcoxon ranked sum test for paired, non-normally distributed data. R version 4.1.0 was used to calculate the relative risk ratios during follow-up and the score test based 95% confidence intervals.

RESULTS AND DISCUSSION

Flow of participants. Participants’ flow throughout the study is presented in Figure 1. Following medical charts pre-screening, the 56 participants assessed for eligibility were enrolled and randomized to the control arm (without preventive intervention, n=23) or the prophylaxis arm (Probiotics, n=33). One participant in the probiotics arm was withdrawn due to an adverse event deemed unrelated to the study supplement, hence 32 participants were analysed for the intervention arm. Among the 23 children enrolled in the comparator control group, 6 were found ineligible after study completion for having had less than one URTI every 3 months despite a similar total number of infections

over the past year and similar nosological profiles at the baseline assessment. These children were excluded from the per-protocol (PP) data analysis (n=17) but were included in the intent-to-treat (ITT) data analysis (n=23), for which results are presented as supplemental figures where indicated.

Demographic characteristics of the study population. The demographic characteristics of the PP population are shown in Table 1. Overall, the study population was composed of 26 females and 23 males, with a similar proportion in each group (P>0.9999). The average age of the population was 6.04±0.3 years old, with a similar age group distribution (P=0.9819). All children were vaccinated according to the national vaccination schedule (measles, mumps, rubella, diphtheria, tetanus, poliomyelitis before age 6), with no vaccinations occurring in the 6 months before or after the start of the study. However, 3 children in the intervention group and 2 in the control group received vaccinations between 10-6 months before the start of the study.

In the PP population, both groups displayed a similar URTI-related medical history over the past year, typical of children with recurrent URTIs in terms of episodes number (8.7±0.24 vs 8.35±0.42) and duration

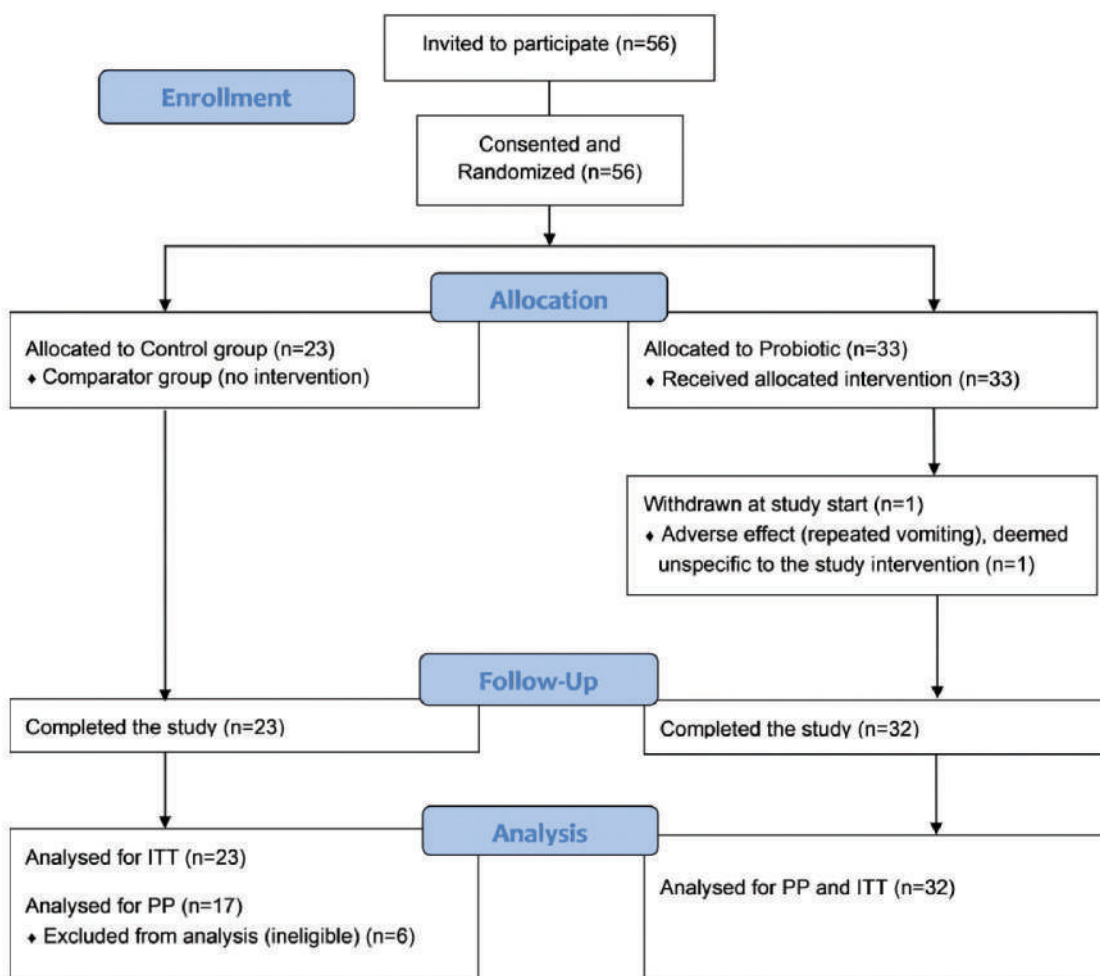


Fig. 1. CONSORT flow diagram

Table 1

Demographic characteristics of participants

Population characteristics	Probiotic, n = 32	Control, n = 17	P value
Gender, male (%)	15 (46.9%)	8 (47.1%)	>0.9999 a
Age, mean ± SEM	Overall: 6.04±0.3		
	6.0±0.38	6.12±0.59	0.9819 b
Age group distribution, n (%)			
3-6 years old	21 (65.6)	11 (64.7)	>0.9999 a
7-10 years old	11 (34.4)	6 (35.3)	>0.9999 a
URTI-related medical history over the past year, mean ± SEM			
Number of episodes	8.7±0.24	8.35±0.42	0.4394 b
Duration of episodes (days)	8.9±0.21	8.65±0.31	0.4979 b
Number of related complications	5.6±0.22	5.53±0.33	0.8568 b
Number of antibiotic courses	6.0±0.18	5.76±0.23	0.4256 b
Resistance index	0.72±0.02	0.70±0.04	0.6188 b
Medical assessment of symptoms, n (%)			
Tonsillar hypertrophy	25 (78.1)	13 (76.5)	>0.9999 a
Friable throat	30 (93.8)	15 (88.2)	0.6020 a
Polylymphadenopathy	27 (84.4)	13 (76.5)	0.7001 a
Gastrointestinal symptoms	16 (50.0)	8 (47.1)	>0.9999 a
Paratropy	4 (12.5)	2 (11.8)	>0.9999 a

Note: a – Fisher's exact test; b – unpaired t-test.

(8.9±0.21 vs 8.65±0.31 days), number of complications (5.6±0.22 vs 5.53±0.33), and antibiotic courses (6.0±0.18 vs 5.76±0.23). Both groups harboured a similar 1-year resistance index (0.72±0.02 vs 0.70±0.04) well above the 0.33 cut-off value distinguishing frequently from occasionally sick children. In addition, the number of antibiotic courses prescribed to children was slightly higher than the number of complication cases in both groups, which is in accordance with existing data on unjustified antibiotic prescriptions in children with URTI [11, 12]. A similar nosological profile was observed children of both groups at the baseline medical assessment, with characteristics typical of children with recurrent respiratory infections. No child displayed signs of an active URTI at time of enrolment. Tonsillar hypertrophy, friable throat, polylymphadenopathy (with swelling of the palate, anterior cervical and postural groups of lymph nodes observed most often) were diagnosed in a large proportion of the population (76-94%). Nearly half the population reported experiencing a high frequency of gastrointestinal symptoms such as diarrhoea, constipation, dyspepsia, or nausea/vomiting. Conversely, paratropy, defined as superfluous body weight no more than 10-20% of the norm, occurred in approximately 12% of the children although not being considered characteristic of children with recurrent respiratory infections.

Average number and duration of URTI episodes and secondary complications over 6 months. The number and duration of URTI episodes per participant were significantly reduced during the follow-up period vs baseline in both the PP (Figure 2A and B) and ITT populations (Figure 3). As detailed in Table 2, the average number of URTI episodes was markedly decreased in the probiotics group during the follow-up phase compared to baseline (from 4.41±0.18 to 2.06±0.15) while remaining stable in the controls (from 4.00 ± 0.23 to 3.76±0.24). The change in the number of URTIs was significantly different between groups (-2.34±0.13 vs -0.29±0.19; P<0.0001). The average duration of URTI episodes (days) was significantly decreased in the probiotics group compared to controls (-1.13±0.18 vs -0.18±0.18; P=0.0011).

The number and duration of complications per participant and resistance index during the follow-up period vs baseline were also significantly reduced between the probiotics and control groups for both the PP (Figure 2C and 2D) and ITT populations (Figure 4).

As detailed in Table 2, the average number of complications per child over 6 months decreased significantly in the probiotics arm from 2.81±0.15 before enrolment to 0.69±0.17 during the follow-up period, compared to a marginal decrease from 2.88±0.22 to 2.59±0.27 in the control group (-2.13±0.21 vs -0.29±0.19; P<0.0001).

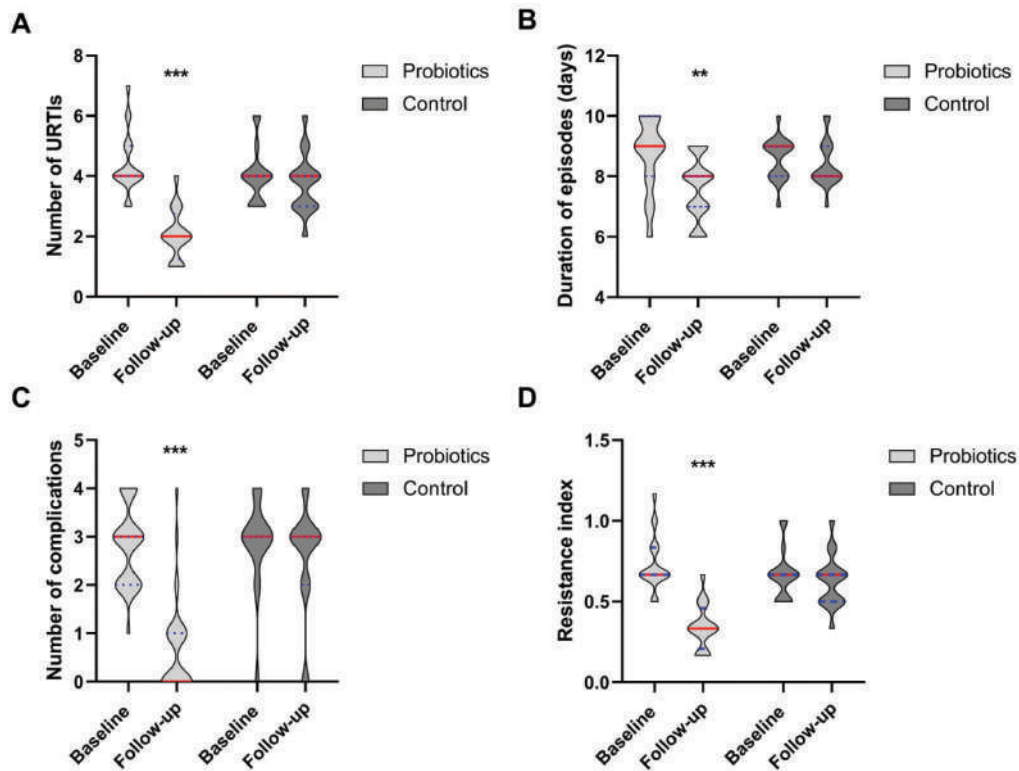


Fig. 2. Probiotic prophylaxis significantly reduced the number and duration of URTI episodes, the number of complication cases and resistance index

Note: Violin plots showing the distribution of (A) the number and (B) duration (days) of URTI episodes, (C) the number of complications and (D) the resistance index, averaged over the 6-month follow-up period or 6-month retrospective baseline, among the probiotics ($n=32$) and control group ($n=17$) participants. The red lines denote the median, and the blue lines, quartiles. Stars denote the between-group statistical significance of the absolute change over baseline (Wilcoxon ranked sum test, see Table 2). ** – $P=0.0011$; *** – $P<0.0001$.

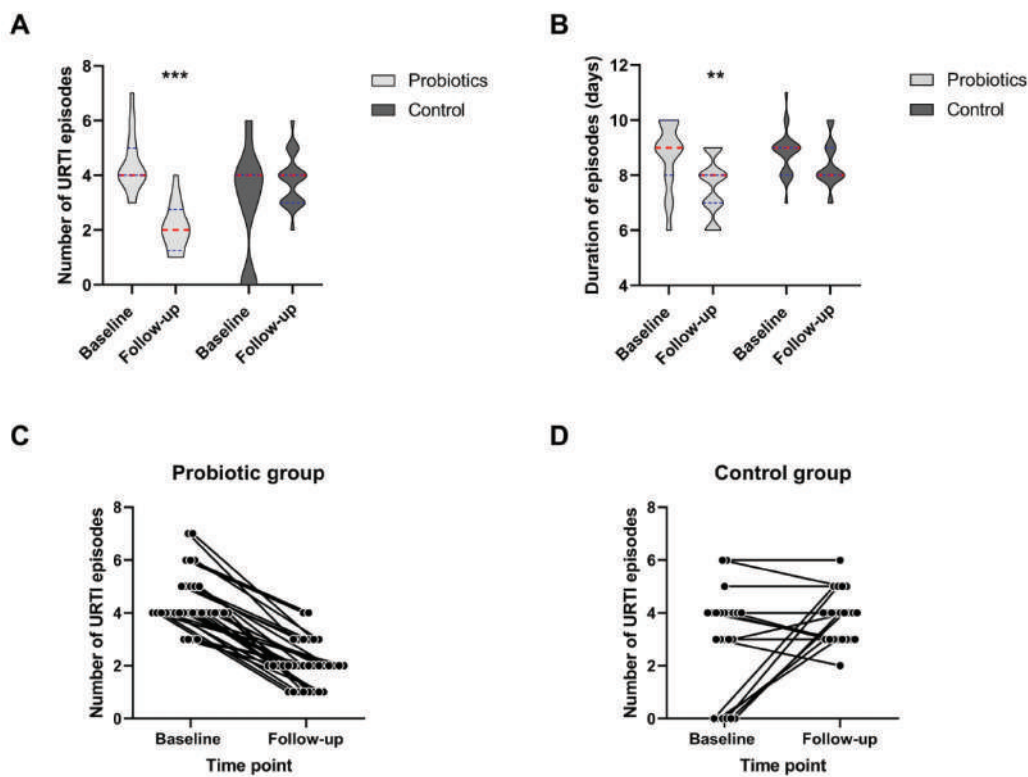


Fig. 3. Violin plots showing the distribution of (A) the number and (B) duration (days) of URTI episodes in the ITT population.

Note: Stars denote the between-group statistical significance of the absolute change over baseline (Wilcoxon ranked sum test, ** – $P=0.007$; *** – $P<0.0001$). Before-after plots showing the individual data for the number of URTIs in all participants of the ITT populations in probiotics (C) and control (D) arms.

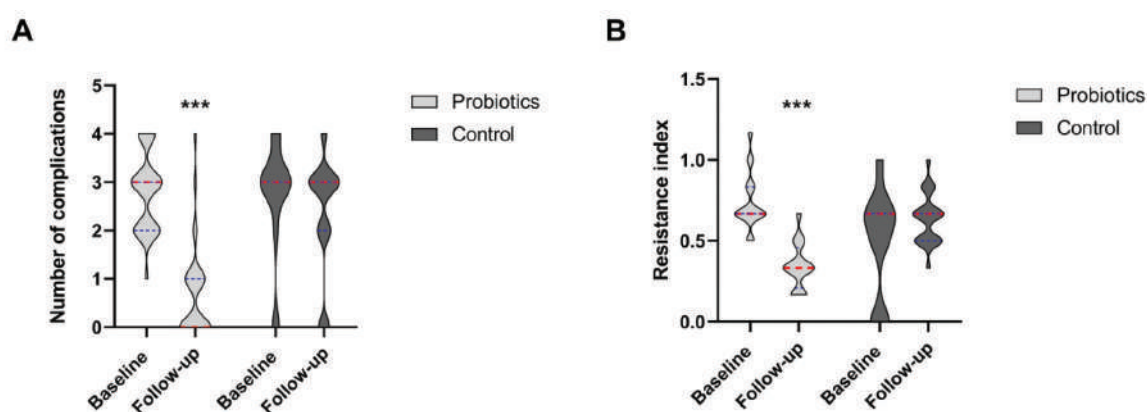


Fig. 4. Violin plots showing the distribution of (A) the number of complications and (B) the resistance index in the ITT population.

Note: Stars denote the between-group statistical significance of the absolute change over baseline (Wilcoxon ranked sum test, *** – $P < 0.0001$).

Table 2

Summary of URTI-related clinical data over the 6-month baseline and follow-up periods for the PP population

Groups and Outcomes	Baseline (over 6 months)			Follow-up (over 6 months)			Δ (Follow-up - Baseline)		
	Mean	SEM	P Value [†]	Mean	SEM	P Value [†]	Mean	SEM	P Value [†]
Probiotics, n=32									
Number of URTI episodes	4.41	0.18	0.1417	2.06	0.15	< 0.0001	-2.34	0.13	< 0.0001
Duration of URTI episodes (days/episode)	8.72	0.21	0.3277	7.59	0.18	0.0141	-1.13	0.18	0.0011
Number of complications	2.81	0.15	0.4957	0.69	0.17	< 0.0001	-2.13	0.21	< 0.0001
Resistance index	0.73	0.03	0.1417	0.34	0.02	< 0.0001	-0.39	0.02	< 0.0001
Number of antibiotic courses	3.03	0.13	0.0786	0.22	0.07	< 0.0001	-2.81	0.15	< 0.0001
Control, n=17									
Number of URTI episodes	4.00	0.23	-	3.76	0.24	-	-0.24	0.14	-
Duration of URTI episodes (days)	8.59	0.17	-	8.41	0.19	-	-0.18	0.18	-
Number of complications	2.88	0.22	-	2.59	0.27	-	-0.29	0.19	-
Resistance index	0.67	0.04	-	0.63	0.04	-	-0.04	0.02	-
Number of antibiotic courses	2.65	0.15	-	2.41	0.19	-	-0.24	0.20	-
[†] vs control. Wilcoxon Ranked Sum test.									

Similarly, the average resistance index was significantly reduced in the follow-up period compared to baseline in the probiotics arm (from 0.73 ± 0.03 to 0.34 ± 0.03), while it remained similar in the control group, from 0.67 ± 0.04 during the baseline period to 0.63 ± 0.04 during follow-up (-0.39 ± 0.02 vs -0.04 ± 0.02 ; $P < 0.0001$). Of note, while the 6-month baseline number of URTI episodes and resistance index remained similar in the control group, the average resistance index during follow-up in children who took the probiotic formulation decreased to a value near the cut-off of 0.33 separating occasionally

ill from URTI-prone children. As detailed in Table 3, a reduction in the incidence of URTIs was observed during the 3rd month, peaked during the 4th month of follow-up (RR 0.3585 95% CI [0.1468, 0.8756]; $P = 0.0072$) and remained lower until the end of the follow-up period, except for month 5 where the reduction was important but not significant.

Profile of URTI-related complications. The nosological profiles of URTI-related complications (Table 4) were similar between groups, with the following diagnostics: otitis media, adenoiditis, bronchitis (simple and obstructive).

Table 3

Monthly incidence of URTIs based on medical examinations of children during the follow-up period for the PP population

Follow-up Month	Probiotics, n = 32		Control, n = 17		Relative Risk [95% CI]	P Value	Average reduction in risk, %
	Without URTI, n (%)	With URTI, n (%)	Without URTI, n (%)	With URTI, n (%)			
1	18 (56.3)	14 (43.8)	7 (41.2)	10 (58.8)	0.7320 [0.3840, 1.3954]	0.3772	26.8
2	20 (62.5)	12 (37.5)	8 (47.1)	9 (52.9)	0.7529 [0.4253, 1.3329]	0.4177	24.7
3	22 (68.8)	10 (31.3)	6 (35.3)	11 (64.7)	0.5134 [0.2589, 1.0181]	0.0351	48.7
4	21 (65.6)	11(34.4)	4 (23.5)	13 (76.5)	0.3585 [0.1468, 0.8756]	0.0072	64.1
5	23 (71.9)	9 (28.1)	7 (41.2)	10 (58.8)	0.5729 [0.3119, 1.0524]	0.0633	42.7
6	22 (68.8)	10 (31.3)	5 (29.4)	12 (70.6)	0.4278 [0.1976, 0.9264]	0.0149	57.2

tive), pneumonia, and cyclic vomiting syndrome triggered by an URTI episode. The corresponding incidence of these complications at baseline was retrieved from medical charts for the 6 months preceding enrolment. For all secondary complications, a marked reduction in incidence compared to baseline was observed in children who received probiotic prophylaxis versus controls, for whom the number of complications remained comparable to baseline. The number of children with secondary complications was reduced in the probiotics group compared to controls (-53% vs -5.8%), reflecting a significant reduction in the overall risk of complications (RR 0.5313 95% CI [0.3534, 0.7986] P = 0.0058). Specifically, there was a significant reduction in the risk of bronchitis (RR 0.2361 95% CI [0.0851, 0.6550] P = 0.0050) and adenoiditis (RR 0.2125 95% CI [0.07823318, 0.5772007], P = 0.0018) in the probiotics versus control arm. These secondary complications were the most frequently diagnosed in both groups, along with cyclic vomiting syndrome which was reduced in the probiotics group versus baseline although without a significant change in RR. For all complications except pneumonia, the reduced or unchanged incidence between group was mirrored in the ITT population (Figure 5).

For pneumonia, no cases were observed in the probiotics group during follow-up compared to 8 cases at baseline, which resulted in a significant RR reduction in the PP population (P = 0.0369) but not in the ITT population.

Number of consultations with a specialized physician and antibiotics prescriptions. Correspondingly with the reduction in the number of URTI episodes and complications (Table 2), there was a significant reduction in the need for medical consultations with specialized physicians during follow-up (Figure 6A) in the probiotics arm compared to controls (P=0.0033). The number of antibiotic courses (Figure 3B) was also significantly

reduced in the probiotics group compared to controls (P<0.0001). Similar results were observed in the ITT analysis (Figure 7).

Adverse events. The combined probiotic used in the study was well tolerated by most children (97%); one child in the probiotics arm was withdrawn from the study for repeated vomiting following the initiation of the intervention. Two attempts were made within a few days' interval. Further analysis of the child's medical data revealed that a similar reaction (vomiting) was sometimes observed following the intake of other medications. Therefore, the adverse event was deemed not specifically associated with the study supplement. No adverse events were observed for other children during the study.

This study shows that a 6-week prophylaxis with a combined probiotic was effective against URTIs and reduced the risk of secondary complications in URTI-prone children over 6 months after intake cessation, with the additional benefits of reducing the need for medical consultations and the number of prescribed antibiotics courses. URTI-prone children who received the probiotic formulation displayed a significantly reduced resistance index approaching the threshold value of occasionally ill children, which is clinically important. Systematic reviews have shown a reduction in URTI incidence and duration in children taking probiotics for periods ranging from 3 to 24 months [19, 20, 22]. However, in addition to the variability in the duration of supplementation, a high level of heterogeneity among studies was also noticed in terms of population studied (i.e. age and health status), probiotic supplement used, dosage, and follow-up time. Notably, few studies have assessed the effect of a shorter preventive probiotic course on infections or included a follow-up period after cessation of the intake. In a study involving healthy 3-12 years old children, the preventive effect of a probiotic formulation containing *L. acidophilus* and *B. lactis* was assessed by initiating supplementa-

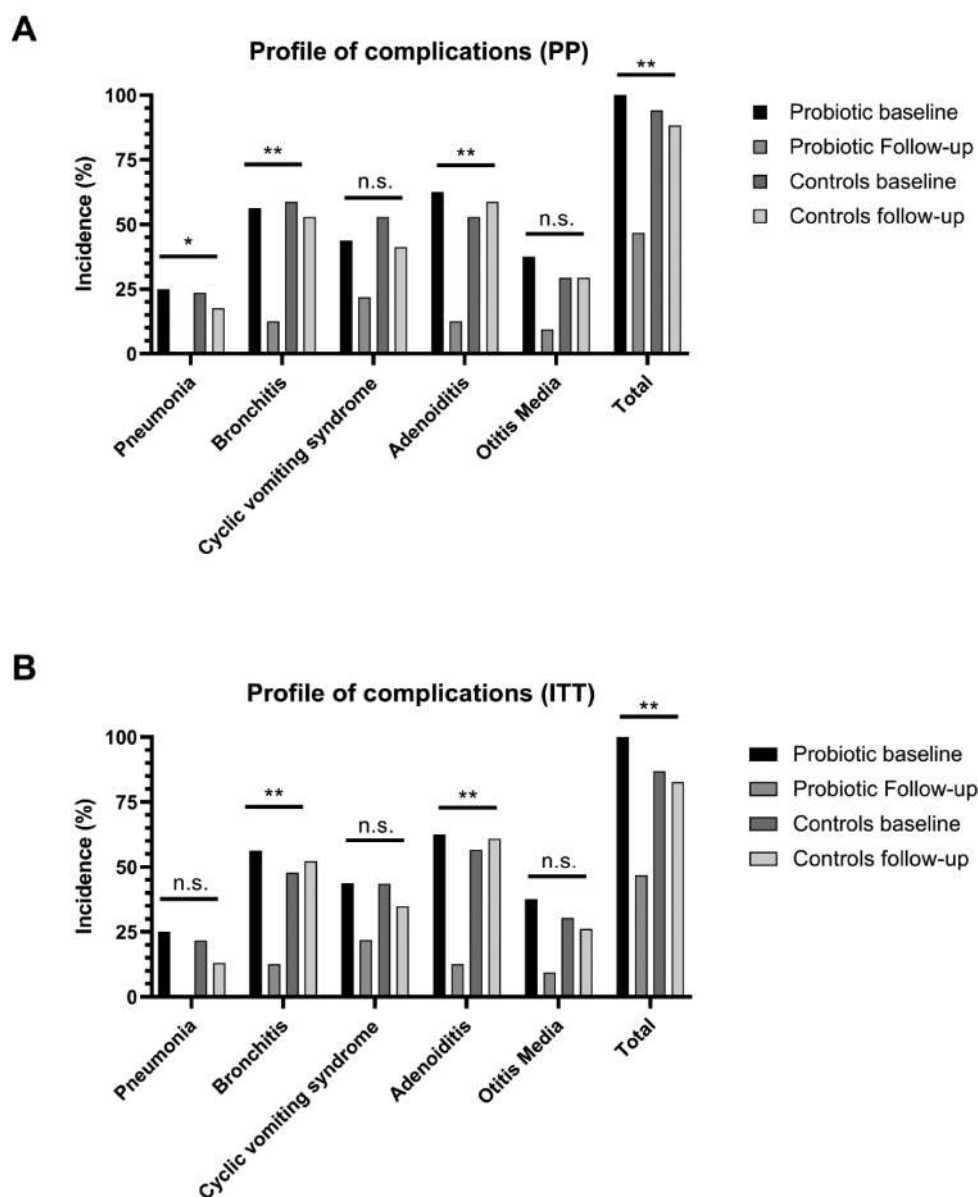


Fig. 5. Bar graphs showing the profiles of complications in the (A) PP and (B) ITT populations.

Note: Stars denote the statistical significance of the RR during follow-up (* – P < 0.05; ** – P < 0.01).

Table 4

Nosological forms profile and incidence of complications for the PP population

Variable	Probiotics, n = 32						Control, n = 17						Relative Risk [95% CI]	P Value
	Baseline		Follow-up		Δ		Baseline		Follow-up		Δ			
	#	n (%)	#	N (%)	#	n	#	n (%)	#	n (%)	#	n		
Pneumonia	8	8/32 (25.0)	0	0/32 (0)	-8	-8	4	4/17 (23.5)	3	3/17 (17.6)	-1	-1	0.0909 § [0.0000, 0.6447]	0.0369
Bronchitis	22	18/32 (56.2)	4	4/32 (12.5)	-18	-14	14	10/17 (58.8)	12	9/17 (52.9)	-2	-1	0.2361 [0.0851, 0.6550]	0.0050
Cyclic vomiting syndrome	23	14/32 (43.7)	10	7/32 (21.9)	-13	-7	13	9/17 (52.9)	12	7/17 (41.2)	-1	-2	0.5313 [0.2233, 1.2641]	0.1929
Adenoiditis	24	20/32 (62.5)	5	4/32 (12.5)	-19	-16	12	9/17 (52.9)	12	10/17 (58.8)	0	+1	0.2125 [0.0782, 0.5772]	0.0018
Otitis Media	13	12/32 (37.5)	3	3/32 (9.4)	-10	-9	6	5/17 (29.4)	5	5/17 (29.4)	-1	0	0.3984 [0.1006, 1.5783]	0.2172
Total	90	32/32 (100)	22	15/32 (46.8)	-68	-17	49	16/17 (94.1)	44	15/17 (88.2)	-5	-1	0.5313 [0.3534, 0.7986]	0.0058

Note: Δ – change from baseline (6-month Follow-up – 6-month retrospective Baseline); # – number of cases diagnosed; n – number of participants with at least one episode diagnosed. § – 0.5 was added to all numbers to correct for 0 count.

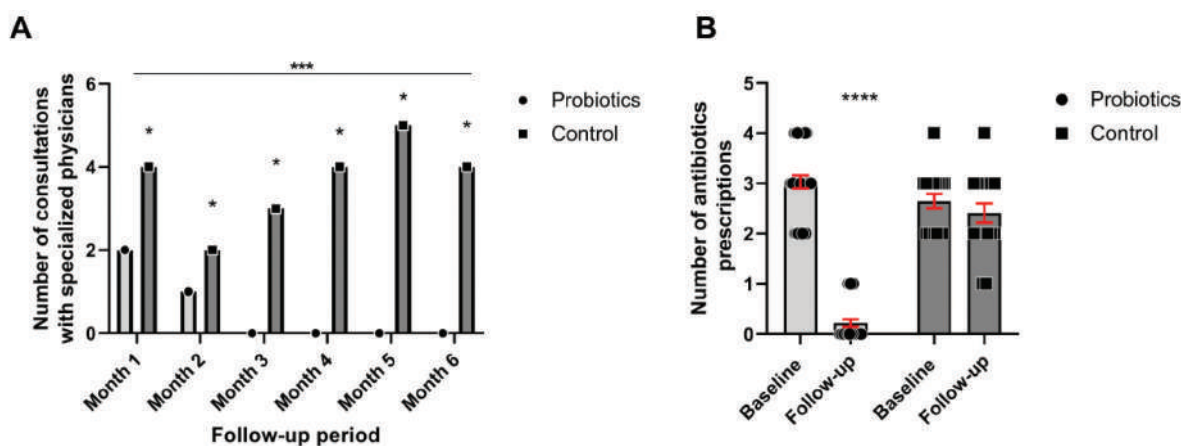


Fig. 6. Significant reduction in the number of medical visits and antibiotics prescriptions in the probiotics arm.

Note: Bar graphs showing: A) the number of medical visits in each group over the 6 months of follow-up. (2-way ANOVA; overall, $P=0.0033$; Tukey's multiple comparisons test, adjusted $P=0.0466$), and B) the average number of antibiotic prescriptions over 6-months in each group at baseline and follow-up. (2-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, adjusted $P < 0.0001$).

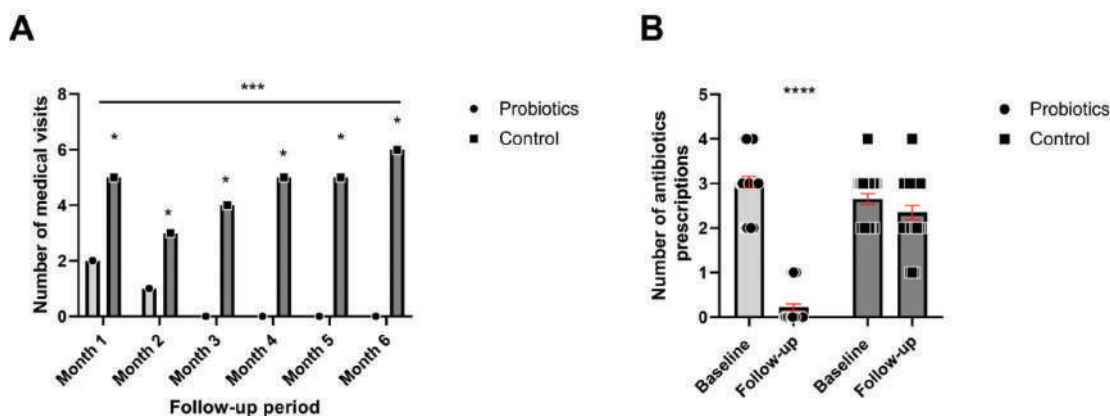


Fig. 7. Bar graphs showing (A) the number of medical visits in the ITT population in each group over the 6 months of follow-up.

Note: (2-way ANOVA; overall, $P=0.0010$; Tukey's multiple comparisons test, adjusted $P=0.0147$), and (B) the average number of antibiotic prescriptions in the ITT population over 6-months in each group at baseline and follow-up. (2-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, adjusted $P < 0.0001$)

tion (5 billion CFU/d; 2 weeks) at the first appearance of respiratory infections in a member of the household. The duration of URTI episodes was reduced, but not the incidence of URTIs or secondary complications (otitis media, sinusitis, bronchitis, or pneumonia) between treated and control children [30]. Aside from the fact that the study population was composed of otherwise healthy children, this could suggest that administration after the assumed infection time upon exposure to the sick family member or the short supplementation period did not allow for a full preventive action.

In our study, the sustained effect in time observed after intake cessation could be explained by the timing of administration; childhood is a critical window for the immune system maturation. Indeed, this probiotic formulation strengthens the immune system and promotes host defence development on three fronts: counteracting opportunistic pathogens, maintaining the integrity of the intestinal barrier, and modulating cellular and systemic

immunity [23-27, 31-33]. In rodents, probiotic formula we used in the study induced tight junction proteins expression and mucin production, which contributes to the maintenance of intestinal permeability [34-37]. Specifically, *L. helveticus* R0052 was shown to increase the amount of circulating IgM, which are produced in responses to infections, and IgG which constitute a secondary response [38]. In vitro, the mechanisms were assessed using intestinal epithelial cells challenged with Poly(I:C) which elicits a response mimicking an infection by RNA viruses. Synergy was observed between the strains with a marked attenuation of the Poly(I:C) immune response and reduction in pro-inflammatory Th1 cytokines [25, 26].

Importantly, the immunomodulatory effects of this formulation observed *in vitro* and *in vivo* are in accordance with those seen in clinical trials, supporting the efficacy of combined probiotic for the prevention of common winter diseases and respiratory infections in

children [23, 27]. A 3-month course in 2-7 year-old children prone to winter diseases significantly reduced the relative risk of most common winter diseases by 25%. Furthermore, only 25.8% of children from the probiotic group missed ≥ 1 schooldays, compared to 42.5% of children in the placebo group ($h < 0.05$) [23]. A 9-month combined probiotic course reduced the incidence of ENTIs in atopic children younger than 5 suffering from respiratory infections or wheezing. The preventive effect was observed after 3 months and maintained until the end of the 9-month study, which was correlated with an increase in serum IgA, IgG and IgM levels after 3 months, and a decrease in serum IgE levels after 9 months of continuous intake. This study suggests that measurable effects on the immune system in allergic children (as per skin prick sensitization testing) appears to require a longer supplementation period before IgE level normalization [27]. Combined probiotic was shown to increase or maintain the levels of secretory IgA (sIgA) in children [33, 39-41], which suggests a role for the formulation at enhancing mucosal immunity. Specifically, salivary sIgA levels were increased and pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-17 were significantly reduced in children with non-infectious diarrhoea who received probiotic [40]. In healthy 3-12 month-old children, the anti-inflammatory IL-10/IL-12 ratio was increased significantly after an 8-week supplementation period with *B. infantis* R0033, while this ratio was increased in the *L. helveticus* R0052 and placebo groups after the intervention period [31]. In addition, formula-fed new-borns receiving probiotic maintained higher faecal sIgA levels than formula-fed children not taking probiotics, which suggests an effect of the formulation on the maturation of the immune system [41].

While harbouring a few limitations, it is improbable that these have affected the conclusions of our study. Six ineligible participants were enrolled in the control group who were found after study completion to deviate from the frequently sick enrolment criterion based on the number of URTIs, despite a similar total number of infections over the past year and displaying a similar set of symptoms at the baseline examination. Hence, the PP analysis paradigm was used to ensure these 6 participants with no URTIs for the 6-month baseline (Figure 3D), who could only display an increase over the follow-up period, were not inflating the between-group differences observed in the ITT analyses. However, results were similar despite the lower study power of the PP population, which demonstrates that these 6 participants were not driving the differences seen in the ITT population. Strain persistence was not assessed in the stools and we did not assess the levels of immunoglobulins in the population; this information could have allowed to confirm the mechanism behind the lasting effect of probiotic prophylaxis. However, long-term colonization of the intestinal tract is unlikely; generally, probiotics are no longer detected in stools within a month after intake cessation [32]. Additionally, the cause of the primary URTI infec-

tions was not determined. However, it is well recognized that URTIs usually result from a viral infection [42]; it may be relevant to validate the specific URTI viral aetiology in future studies. The control group was observational and did not receive placebo. Nevertheless, a placebo effect is unlikely in this context considering the non-subjective nature of the outcomes and assessors blinding. A longer follow-up period would have been informative about the duration of the protection conferred by probiotic; improvement in RRs reached a plateau between 3 and 6 months, which does not allow to exclude that the benefit could extend for longer. Further studies are required to establish whether the duration of the preventive probiotics course harbours a linear relationship with the duration of the benefit in time, and to identify the duration of prophylaxis appropriate for specific subgroup of patients, such as URTI-prone, atopic, or otherwise healthy children.

CONCLUSIONS

This study confirms the safety and preventive effect of combined probiotic (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 and *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) against URTIs in URTI-prone children. Considering the significant reduction in the average number and duration of URTI episodes, as well as reduction of average number of secondary complications and decreased the resistance index in URTI-prone children, the use of this probiotic formulation as a preventive strategy could be considered in paediatric medical practice. Furthermore, although no formal cost-benefit analyses were conducted, the non-negligible potential benefit of reducing health care use and inappropriate antibiotics prescriptions should also be confirmed in follow-up studies.

Acknowledgements. We thank the physicians who took part in the examination of children: Marina Myka, Tatiana Iovitsa, Alexander Lisovets. We also thank Annie Tremblay (Lallemand Health Solutions Inc.) for language editing and formatting of the final manuscript, and James Colee (independent statistical consultant) for statistical analyses.

Conflict of Interest. This study was supported by Lallemand Health Solutions Inc, without the industry being involved in the study design, conduct, data analysis and interpretation or decision to publish.

Author contributions. YVM was responsible for study design, study conduct, data analysis, manuscript editing (final draft). TVH was responsible for data collection, data analysis, manuscript writing (first draft), manuscript editing (final draft). YIT was responsible for study conduct, randomization, data collection, data analysis, manuscript writing (first draft).

Funding. This study was funded by Lallemand Health Solutions Inc. The probiotic product was manufactured and provided by Lallemand Health Solutions Inc.

REFERENCES

1. Simoes EAF, Cherian T, Chow J, Shahid-Salles SA, Laxminarayan R, John TJ. Acute Respiratory Infections in Children. In: B.J. Jamison DT, Measham AR, et al. (Ed.), *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. New York, Oxford University Press, 2006.
View at: PubMed: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11728/>
2. Toivonen L, Karppinen S, Schuez-Havupalo L, Teros-Jaakkola T, Vuononvirta J, Mertsola J, He Q, Waris M, Peltola V. Burden of Recurrent Respiratory Tract Infections in Children: A Prospective Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2016; 35(12): e362-e369. DOI: 10.1097/inf.0000000000001304
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/pidj/Abstract/2016/12000/Burden_of_Recurrent_Respiratory_Tract_Infections.4.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27455443/>
3. Schaad UB. Prevention of paediatric respiratory tract infections: emphasis on the role of OM-85. *European Respiratory Review*. 2005; 14: 74-7. DOI:10.1183/09059180.05.00009506
View at: Publisher Site: <https://err.ersjournals.com/content/14/95/74>
4. Dehn Lunn A. Reducing inappropriate antibiotic prescribing in upper respiratory tract infection in a primary care setting in Kolkata, India. *BMJ Open Quality*. 2018; 7(4): e000217. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-000217
View at: Publisher Site: <https://bmjopenquality.bmj.com/content/7/4/e000217>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555928/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6267302/>
5. Marushko YV, Shef GG, Polkovnichenko LN, Moshkina TV. [Therapeutic approaches for acetone syndrome in children]. *Child's health*. 2012; 1(36): 4-5. [in Russian]
View at: Publisher Site: <http://www.mif-ua.com/archive/article/26007>
Cyberleninka: <https://cyberleninka.ru/article/n/terapevticheskie-podhody-pri-atsetonemicheskome-sindrome-u-detey>
URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/terapevticheskie-podhody-pri-atsetonemicheskome-sindrome-u-detey/viewer>
7. Messina F, Clavenna A, Cartabia M, Piovani D, Bortolotti A, Fortino I, Merlini L, Bonati M. Antibiotic prescription in the outpatient paediatric population attending emergency departments in Lombardy, Italy: a retrospective database review. *BMJ Paediatrics Open*. 2019; 3(1): e000546. DOI: 10.1136/bmjpo-2019-000546
View at: Publisher Site: <https://bmjpaedsopen.bmj.com/content/3/1/e000546>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31909220/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6937000/>
8. Miao R, Wan C, Wang Z, Zhu Y, Zhao Y, Zhang L, Liu J, Qin J, Xia J, Yan H. Inappropriate antibiotic prescriptions among pediatric inpatients in different type hospitals. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(2): e18714. DOI:10.1097/md.00000000000018714
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2020/01100/Inappropriate_antibiotic_prescriptions_among.73.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31914082/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6959949/>
9. Shutova OV. [Acetonemic syndrome in children: diagnosis and management]. *Modern pediatrics*. 2018; 2: 114-23. [in Russian]. DOI:10.15574/SP.2018.90.114.
View at: Publisher Site: <https://med-expert.com.ua/journals/publishing-activity/sovremennaya-pediatriya/sovremennaja-pediatrija-sp-%E2%84%962-2018/>
URL: <https://med-expert.com.ua/journals/wp-content/uploads/2018/06/19.pdf>
10. Stoieva TV, Titkova OV, Sytnik VV, Kartashova VO, Synenko VV, Radiuk LP. [Correction of metabolic disorders in secondary acetonemic syndrome on the background of acute respiratory infection in children]. *Child's Health*. 2018; 13(8): 736-42. [in Russian], DOI: 10.22141/2224-0551.13.8.2018.154153.
View at: Publisher Site: <http://www.mif-ua.com/archive/article/47021>
URL: <http://childshealth.zaslavsky.com.ua/article/view/154153>
11. Williams MR, Greene G, Naik G, Hughes K, Butler CC, Hay AD. Antibiotic prescribing quality for children in primary care: an observational study. *British Journal of General Practice*. 2018; 68(667): e90-e96. DOI: 10.3399/bjgp18X694409
View at: Publisher Site: <https://bjgp.org/content/68/667/e90>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29335323/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5774968/>
12. O'Connor R, O'Doherty J, O'Regan A, Dunne C. Antibiotic use for acute respiratory tract infections (ARTI) in primary care; what factors affect prescribing and why is it important? A narrative review. *Ir J Med Sci*. 2018; 187(4): 969-86. DOI: 0.1007/s11845-018-1774-5
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11845-018-1774-5>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29532292/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6209023/>
13. Zoorob R, Sidani MA, Fremont RD, Kihlberg C. Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections. *Am Fam Physician*. 2012; 86(9): 817-22.
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22911111/>

- gov/23113461/
FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.
View at: Publisher Site: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
14. Feleszko W, Marengo R, Vieira AS, Ratajczak K, Mayorga Butrón JL. Immunity-targeted approaches to the management of chronic and recurrent upper respiratory tract disorders in children. *Clinical Otolaryngology*. 2019; 44(4): 502-10. DOI: 10.1111/coa.13335.
View at: Publisher Site: [ps://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/coa.13335](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/coa.13335)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30920131/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6850198/>
 15. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11(8): 506-14. DOI: 10.1038/rgastro.2014.66
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/rgastro.2014.66>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912386/>
 16. Li L, Wang F, Liu Y, Gu F. Intestinal microbiota dysbiosis in children with recurrent respiratory tract infections. *Microb Pathog*. 2019; 136: 103709. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103709
View at: Publisher Site: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401019307867>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31494301/>
 17. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int*. 2018; 8063647. DOI: 10.1155/2018/8063647
View at: Publisher Site: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/8063647/>
 18. Luo A, Leach ST, Barres R, Hesson LB, Grimm MC, Simar D. The Microbiota and Epigenetic Regulation of T Helper 17/Regulatory T Cells: In Search of a Balanced Immune System. *Front Immunol*. 2017; 8: 417. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00417
View at: Publisher Site: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00417/full>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28443096/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385369/> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385369/>
 19. Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; (2): Cd006895. DOI: 10.1002/14651858.CD006895.pub3
View at: Publisher Site: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD006895.pub3/full>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25927096/>
 20. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*. 2014; 112(1): 41-54. DOI: 10.1017/s0007114514000075
View at: Publisher Site: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/effectiveness-of-probiotics-on-the-duration-of-illness-in-healthy-children-and-adults-who-develop-common-acute-respiratory-infectious-conditions-a-systematic-review-and-metaanalysis/4382D42135F5C78FFA96E5F4C581944D>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24780623/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054664/>
 21. Ozen M, Kocabas Sandal G, Dinleyici EC. Probiotics for the prevention of pediatric upper respiratory tract infections: a systematic review. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(1): 9-20. DOI: 10.1517/14712598.2015.980233
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14712598.2015.980233?journal-Code=iebt20>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25430686/>
 22. Wang Y, Li X, Ge T, Xiao Y, Liao Y, Cui Y, Zhang Y, Ho W, Yu G, Zhang T. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95: e4509. DOI: 10.1097/md.0000000000004509
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2016/08020/Probiotics_for_prevention_and_treatment_of.90.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27495104/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4979858/>
 23. Cazzola M, Pham-Thi N, Kerihuel JC, Durand H, Bohbot S. Efficacy of a synbiotic supplementation in the prevention of common winter diseases in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ther Adv Respir Dis*. 2010; 4: 271-8. DOI: 10.1177/1753465810379010
View at: Publisher Site: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753465810379010>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729255/>
PubMed Central:
 24. Cazzola M, Tompkins TA, Matera MG. Immunomodulatory impact of a synbiotic in T(h)1 and T(h)2 models of infection. *Ther Adv Respir Dis*. 2010; 4(5): 259-70. DOI: 10.1177/1753465810379009
View at: Publisher Site: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753465810379009>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20929951/>
 25. MacPherson C, Audy J, Mathieu O, Tompkins TA. Multistrain Probiotic Modulation of Intestinal Epithelial Cells' Immune Response to a Double-Stranded RNA

- Ligand, Poly(I-C). *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(5): 1692-700. DOI: 10.1128/aem.03411-13
View at: Publisher Site: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.03411-13>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375132/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957618/>
26. MacPherson CW, Shastri P, Mathieu O, Tompkins TA, Burguière P. Genome-Wide Immune Modulation of TLR3-Mediated Inflammation in Intestinal Epithelial Cells Differs between Single and Multi-Strain Probiotic Combination. *PLoS One.* 2017; 12(1):e0169847. DOI:10.1371/journal.pone.0169847
View at: Publisher Site: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169847>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28099447/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5242491/>
27. Stojković A, Simović A, Bogdanović Z, Banković D, Poskurica M. Clinical trial/experimental study (consort compliant): Optimal time period to achieve the effects on synbiotic-controlled wheezing and respiratory infections in young children. *Srp Arh Celok Lek.* 2016; 144(1-2): 38-45. DOI: 10.2298/sarh1602038s.
View at: Publisher Site: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0370-81791602038S#.YT7F850zZPY>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27276856/>
28. Karpova EP, Zaplatnikov AL, Tulupov DA. [Immunoprophylaxis of infections of the upper respiratory tract in the frequently ill children]. *Vestn Otorinolaringol.* 2015; 80: 80-84. [in Russian]. DOI: 10.17116/otorino201580580-84
View at: Publisher Site: <https://www.mediasphera.ru/issues/vestnik-otorinolaringologii/2015/5/>
Publisher Site: <https://www.mediasphera.ru/issues/vestnik-otorinolaringologii/2015/5/030042-466820150517>
URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/vestnik-otorinolaringologii/2015/5/downloads/ru/030042-466820150517>
29. Altman DG. Statistics and ethics in medical research. Misuse of statistics is unethical. *Br Med J.* 1980; 281(6249): 1182-4. DOI: 10.1136/bmj.281.6249.1182
View at: Publisher Site: <https://www.bmj.com/content/281/6249/1182>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7427629/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1714517/>
30. Gerasimov SV, Ivantsiv VA, Bobryk LM, Tsitsura OO, Dedyshin LP, Guta NV, Yandyo BV. Role of short-term use of *L. acidophilus* DDS-1 and *B. lactis* UABLA-12 in acute respiratory infections in children: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2016; 70(4): 463-9. DOI: 10.1038/ejcn.2015.171
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/ejcn2015171>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26463725/>
31. De Andres J, Manzano S, Garcia C, Rodriguez JM, Espinosa-Martos I, Jimenez E. Modulatory effect of three probiotic strains on infants' gut microbial composition and immunological parameters on a placebo-controlled, double-blind, randomised study. *Benef Microbes.* 2018; 9(4): 573-584. DOI: 10.3920/bm2017.0132
View at: Publisher Site: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2017.0132>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29726280/>
32. Manzano S, De Andres J, Castro I, Rodriguez JM, Jimenez E, Espinosa-Martos I. Safety and tolerance of three probiotic strains in healthy infants: a multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Benef Microbes.* 2017; 8(4): 569-78. DOI: 10.3920/bm2017.0009
View at: Publisher Site: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2017.0009>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28555502/>
33. Pantović F. Serum immunoglobulin levels in children with respiratory infections who used a synbiotic dietary supplement. *PONS Medical Journal.* 2013; 10(1): 7-11.
View at: URL: <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/1820-2411/2013/1820-2411301007P.pdf>
34. Dykstra NS, Hyde L, Adawi D, Kulik D, Ahme S, Molin G, Jeppsson B, MacKenzie A, Mack DR. Pulse probiotic administration induces repeated small intestinal Muc3 expression in rats. *Pediatr Res.* 2011; 69(3): 206-11. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3182096ff0.
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/pr9201140>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135754/>
35. Godwin NS, Hyde L, Mack DR. Intestinal mucin gene modulation in vivo using orally administered probiotic bacteria: 212. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2005; 41(4): 558-9. DOI: 10.1097/01.mpg.0000182068.89890.95
View at: Publisher Site: <https://journals.lww.com/jpgn/toc/2005/10000>
Publisher Site: https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2005/10000/INTESTINAL_MUCIN_GENE_MODULATION_IN_VIVO_USING.235.aspx
Semantic Scholar: <https://www.semanticscholar.org/paper/INTESTINAL-MUCIN-GENE-MODULATION-IN-VIVO-USING-212-Godwin-Hyde/adca85be9a5ae7573cdd0e89125797f0d31e0107>
36. Ho NK, Hawley SP, Ossa JC, Mathieu O, Tompkins TA, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Immune signaling responses in intestinal epithelial cells exposed to pathogenic *Escherichia coli* and lactic acid-producing probiotics. *Benef Microbes.* 2013; 4(2): 195-209. DOI: 10.3920/BM2012.0038
View at: Publisher Site: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2012.0038>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23443951/>
37. Kuugbee ED, Shang X, Gamallat Y, Bamba D, Awa-

- dasseid A, Suliman MA, Zang S, Ma Y, Chiwala G, Xin Y, Shang D. Structural Change in Microbiota by a Probiotic Cocktail Enhances the Gut Barrier and Reduces Cancer via TLR2 Signaling in a Rat Model of Colon Cancer. *Dig Dis Sci.* 2016; 61(10): 2908-20. DOI: 10.1007/s10620-016-4238-7
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-016-4238-7>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27384052/>
38. Easo JG, Measham MJ, Munroe J, Green-Johnson JM. Immunostimulatory Actions of Lactobacilli: Mitogenic induction of antibody production and spleen cell proliferation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Food and Agricultural Immunology.* 2002; 14(1):73-83. DOI:10.1080/09540100220137682
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09540100220137682>
Europe PMC: <http://europepmc.org/article/AGR/IND23279609>
39. Chen L, Ouyang L, Liao W, Zhang W. Mucous membrane immunity enhanced by taking Biostime probiotics. *Chinese Journal of Microecology.* 2007; 2: 137-41.
View at: Publisher Site: https://www.oriprobe.com/journals/zgwstxzz/2007_2.html
URL: http://caod.oriprobe.com/articles/12048652/Mucous_membrane_immunity_enhanced_by_taking_Biostime_probiotics.htm
Semantic scholar: <https://www.semanticscholar.org/paper/Mucous-membrane-immunity-enhanced-by-taking-Wen-hui/403b05f76a5a06fa9c7da6c56ca86193fb6ac05b>
40. Peng L, Liang Y, Ming Z. Observation on the efficacy of Montmorillonite Powder and Synbiotics Probiotics for Children non-infectious diarrhea. *Hebei Medical Journal.* 2015; 12: 1846-7.
View at: Publisher Site: https://www.oriprobe.com/journals/hbyy/2015_12.html
URL: http://caod.oriprobe.com/articles/46223681/meng_tuo_shi_san_yu_he_sheng_yuan_yi_sheng_jun_lian_he_zhi_liao_xiao_e.htm
41. Xiao L, Gong C, Ding Y, Ding G, Xu X, Deng C, Ze X, Malard P, Ben X. Probiotics maintain intestinal secretory immunoglobulin A levels in healthy formula-fed infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Benef Microbes.* 2019;10(7): 729-39. DOI: 10.3920/BM2019.0025
View at: Publisher Site: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2019.0025>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31965842/>
42. Denny FW. Jr. The clinical impact of human respiratory virus infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152(4 Pt 2): S4-12. DOI: 10.1164/ajrccm/152.4_Pt_2.S4
View at: Publisher Site: https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/152.4_Pt_2.S4
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7551411/>

Article history
Received: 02.09.2021
Revision requested: 10.09.2021
Revision received: 16.09.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

ПРОФІЛАКТИЧНИЙ ЕФЕКТ ПРОБІОТИЧНОГО ВТРУЧАННЯ У ДІТЕЙ, СХИЛЬНИХ ДО ГОСТРИХ ІНФЕКЦІЙ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ: РАНДОМІЗОВАНЕ КОНТРОЛЬОВАНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

¹Марушко Ю.В., ¹Гищак Т.В., ²Тодика Ю.І.

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

² Дитяча клінічна лікарня № 5, Київ, Україна

iurii.marushko@gmail.com

Вступ. Інфекції верхніх дихальних шляхів (ІВДШ) поширені у дітей і часто прогресують із вторинними ускладненнями, такими як отит, бронхіт або пневмонія, особливо у дітей з рецидивуючими інфекціями. Пробиотики виявляли імуномодулюючу дію у дітей та дорослих, підтримуючи імунні функції для профілактики зимових захворювань або застуди.

Ціль: оцінити ефективність 6-тижневої профілактики пробіотиками (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 та *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) для запобігання первинним інфекціям та/або вторинним ускладненням у дітей, схильних до ІВДШ.

Матеріали та методи. Дітей, схильних до ІВДШ, випадковим чином поділили на групу, що приймала пробіотики (3×109 КУО/день; 6 тижнів), і контрольну групу (без профілактичного втручання). Кількість ІВДШ, тривалість та пов'язані з ними ускладнення відстежувались протягом 6 місяців. Також реєстрували індекс резистентності, кількість медичних відвідувань та призначення антибіотиків.

Результати. Через 2 місяці пробіотики зменшили кількість ІВДШ (-2,34±0,13 проти -0,24±0,14; P<0,0001) та їх тривалість у (-1,13±0,18 проти -0,18±0,18 днів; P=0,0011), а також кількість вторинних ускладнень (-53% проти -5,8%; RR 0,5313 95% ДІ [0,3534, 0,7986] P= 0,0058). Пробиотики зменшили індекс резистентності (P<0,0001), кількість медичних консультацій у спеціалістів (P=0,0033) та призначення антибіотиків (P<0,0001).

Висновки. Загалом 6-тижнева профілактика з використанням комбінованих пробіотиків (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 та *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) у дітей, схильних до ІВДШ, зменшила кількість та

тривалість епізодів ІВДШ та вторинних ускладнень та знизила показник резистентності до майже нормального значення. Крім того, потенційна суспільна користь від зменшення використання медичної допомоги та неадекватного призначення антибіотиків у дітей сприяє використанню цього пробіотичного продукту як профілактичної стратегії проти ІВДШ та їх наслідків у часто хворих дітей.

Це дослідження було зареєстровано на ClinicalTrials.gov (NCT04525040).

Ключові слова: профілактика, педіатрія, інфекції вуха-горла, індекс резистентності, пробіотики

ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА У ДЕТЕЙ, СКЛОННЫХ К ОСТРЫМ ИНФЕКЦИЯМ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

¹Марушко Ю.В., ¹Гищак Т.В., ²Тодыка Ю.И.

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

²Детская клиническая больница № 5, Киев, Украина

iurii.marushko@gmail.com

Актуальность. Инфекции верхних дыхательных путей (ИВДП) распространены у детей и часто прогрессируют со вторичными осложнениями, такими как отит, бронхит или пневмония, особенно у детей с рецидивирующими инфекциями. Пробиотики проявляли иммуномодулирующее действие у детей и взрослых, поддерживая иммунные функции для профилактики зимних заболеваний или простуды.

Цель: оценить эффективность 6-недельной профилактики пробиотиками (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 и *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) для предотвращения первичных инфекций и / или вторичных осложнений у детей, склонных к ИВДП.

Материалы и методы. Детей, склонных к ИВДП, случайным образом разделили на группу, принимающую пробиотики (3×10⁹ КОЕ/день, 6 недель), и контрольную группу (без профилактического вмешательства). Количество ИВДП, продолжительность и связанные с ними осложнения отслеживались в течение 6 месяцев. Также регистрировали индекс резистентности, количество медицинских посещений и назначения антибиотиков.

Результаты. Через 2 месяца пробиотики уменьшили количество ИВДП (-2,34±0,13 против -0,24±0,14; p<0,0001) и их продолжительность в (-1,13±0,18 против -0,18±0,18 дня; P = 0,0011), а также количество вторичных осложнений (-53% против -5,8%; RR 0,5313 95% ДИ [0,3534, 0,7986] P=0,0058). Пробиотики уменьшили индекс резистентности (P<0,0001), количество медицинских консультаций у специалистов (P=0,0033) и назначения антибиотиков (P<0,0001).

Выводы. В общем 6-недельная профилактика с использованием комбинированных пробиотиков (*Lactobacillus helveticus* Rosell®-52, *Bifidobacterium infantis* Rosell®-33 и *Bifidobacterium bifidum* Rosell®-71) у детей, склонных к ИВДП, уменьшила количество и продолжительность эпизодов ИВДП и вторичных осложнений, а также снизила показатель резистентности до почти нормальных значений. Кроме того, потенциальная общественная польза от уменьшения использования медицинской помощи и неадекватного назначения антибиотиков у детей способствует использованию этого пробиотического продукта как профилактической стратегии против ИВДП и их последствий у часто болеющих детей.

Это исследование было зарегистрировано на ClinicalTrials.gov (NCT04525040).

Ключевые слова: профилактика, педіатрія, інфекції уха-горла, індекс резистентності, пробіотики.

ЗВ'ЯЗОК ПОКАЗНИКІВ РОСТУ ПЛАЦЕНТ З МАСОЮ ДІТЕЙ ПРИ НАРОДЖЕНІ В ДИХОРІАЛЬНИХ ДІАМНІОТИЧНИХ ДВІЙНЯХ

Тепла І.В. <https://orcid.org/0000-0002-7982-9983>

Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна

iryna.tepla@ukr.net

Актуальність. Одним з основних показників внутрішньоутробного розвитку дитини є її маса при народженні. Стан плаценти віддзеркалює вплив материнського середовища на плід. Важливо з'ясувати, які параметри зростання плацент достовірно впливають на масу дихоріальних діамніотичних (ДХДА) двійнь.

Ціль: дослідити зв'язок між показниками зростання плаценти та масою при народженні дихоріальних діамніотичних двійнь.

Матеріали та методи. Протягом 2016-2020 років обстежено 135 пар ДХДА близнюків: різностатевих пар було 68, одно-статевих жіночої статі – 32 та чоловічої статі – 35. Гестаційний вік коливався від 29 до 39,5 тижнів, в середньому склав $36,4 \pm 1,74$ тижні. Оцінювали вплив на масу при народженні максимального та мінімального діаметрів плацент, периметру, площі, циркулярності (Circ), округлості, товщини, маси (МП), об'єму (V), зміщення точки фіксації пупкового канатика від центру диску вздовж його максимальної (XCD) та мінімальної осі (YCD).

Результати. Виявлена сильна кореляція між МП та вагою новонароджених в усій когорті ДХДА двійнь ($r = 0,7059$, $p < 0,0001$). Найбільш сильною вона була в одностатевих жіночих двійнях ($r = 0,7886$, $p < 0,0001$), потім у різностатевих ($r = 0,7093$, $p < 0,0001$), трохи слабшою – в одностатевих чоловічих парах ($r = 0,6065$, $p < 0,0001$). Вага новонароджених та МП корелювали практично зі всіма показниками, що характеризують форму плацент. Найсильнішою була кореляція з V ($r_{V\ m-пл} = 0,66$, $p < 0,0001$; $r_{V\ m-пл} = 0,59$, $p < 0,0001$) та площею*Circ ($r_{S^*Circ\ m-дит} = 0,64$; $p < 0,0001$; $r_{S^*Circ\ m-пл} = 0,62$; $p < 0,0001$). Множинний регресійний аналіз впливу різних морфометричних показників плацент на масу новонароджених продемонстрував статистичну значущість наступних параметрів: XCD, МП, V, YCD та Circ. Регресійна модель для всієї групи ДХДА: маса при народженні = $2242,3 + 0,8 * МП + V - 10,0 * XCD$ ($R^2 = 0,7002$). Подібні формули отримані для різних за статтю варіантів ДХДА двійнь. Вони враховують 67-85% факторів, пов'язаних з плацентами, від яких залежить маса новонароджених.

Висновки. В ДХДА парах маса плацент мала сильну позитивну кореляцію з масою новонароджених. Обидва показники знаходяться в достатньо сильному прямому зв'язку з V та їх площею*Circ. Чим ближче форма плаценти до кола, тим її функціональна спроможність вище. Погіршення останньої може бути пов'язане з фіксацією пуповини далеко від центру плацентарного диску. Сильніший вплив має зміщення вздовж XCD порівняно з переміщенням відносно YCD. Множинний регресійний аналіз показав, що при всіх варіантах двійнь статистичну значущість продемонстрували XCD та МП або V останньої. Запропоновані моделі демонструють, що 67-85% варіабельності ваги при народженні ДХДА близнюків може бути пояснено трьома або чотирма простими вимірюваннями їх плацент.

Ключові слова: дихоріальні діамніотичні двійні, множинний регресійний аналіз, морфометричне дослідження плацент, маса дитини при народженні.

Актуальність. Маса при народженні є параметром, що обов'язково вимірюється при всіх пологах. Розроблені міжнародні стандарти маси новонароджених, які дозволяють оцінити адекватність фізичного розвитку дитини [1]. Доведено, що суттєве відхилення в масі новонароджених може вказувати на наявність перинатальної патології [2]. Показано, що даний показник може дозволити оцінити певні закономірності подальшого розвитку дитини [3].

З'ясовані фактори, від яких залежить маса новонародженої дитини [4, 5]. Вважається, що на неї впливають генетичні та соціально-економічні фактори, оточуюче середовище, наявність у матері певних захворювань в період вагітності, таких як хронічні інфекції, артеріальна гіпертензія та цукровий діабет [6]. Стан плаценти в значній мірі віддзеркалює те, яким чином плід сприймає материнське середовище. Тому, разом з генетичними факторами, він є одним з основних чинників впливу на масу новонароджених. Зростання плаценти безпосередньо пов'язане

з її функціональною ефективністю, оскільки вона є єдиним фетальним джерелом постачання плода поживними речовинами та киснем [6]. Вага – це один із найбільш популярних та доступних способів визначення розміру плаценти, проте існує багато інших морфометричних показників, які потенційно можуть характеризувати функціональну активність цього органу. Неоднозначні результати, отримані при дослідженні впливу лінійних розмірів плацентарного диску, його площі та об'єму [7, 8], а також місця фіксації пупкового канатика на масу дітей при народженні [9, 10, 11, 12]. Часто дані одних авторських колективів знаходяться в повній протилежності до знахідок інших. Результати суттєво залежать від кількості досліджуваних параметрів та методології досліджень. Були запропоновані деякі регресійні моделі зв'язку показників зростання плацент з масою новонароджених [6]. В доступній літературі нами не виявлено регресійних моделей залежності маси дихоріальних діамніотичних (ДХДА) двійнь від по-

казників зростання плацент. В той же час кількість багатоплідних вагітностей в усьому світі та Україні суттєво збільшилась. Беручи до уваги широке впровадження в рутинну практику сучасних допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), можна очікувати подальшого зростання кількості багатоплідних вагітностей, в першу чергу, ДХДА [13, 14]. Оскільки в материнській утробі генетичні, фізіологічні та метаболічні фактори однаково впливають на обох дихоріальних близнюків, дослідження їх плацент допоможе з'ясувати інші фактори, які впливають на масу при народженні, тривалість гестації. Це потенційно може покращити скринінг затримки росту плодів [4, 15].

Ціль: дослідження зв'язку між показниками зростання плаценти та масою при народженні дихоріальних діамніотичних двієнь.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на клінічній базі кафедри акушерства та гінекології № 1 Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика у КНП КОР «Київський обласний перинатальний центр». Протягом 2016-2020 років обстежено 135 пар ДХДА близнюків (270 новонароджених та їх плацент). Серед них різностатевих пар було 68, одностатевих жіночої статі 32 та одностатевих чоловічої статі – 35. Гестаційний вік в даних групах коливався від 29 до 39,5 тижнів, в середньому склав $36,4 \pm 1,74$ тижнів.

Вік матерів коливався від 19 до 46 років, середній вік був $30,1 \pm 5,52$ років. Не знайдено статистичних відмінностей в антропометричних показниках матерів різних видів двієнь (зріст, маса тіла та індекс маси тіла – ІМТ), наявності супутніх захворювань (цукровий діабет, артеріальна гіпертензія, та прееклампсія), поганих звичок (тютюнопаління, вживання наркотиків) протягом вагітності та способів розродження. Медіана маси тіла первісток ($78,0$ ($Q1 - 72,0$; $Q3 - 94,0$) кг) статистично не відрізнялася від маси тіла повторнароджуючих ($78,0$ ($Q1 - 72,5$; $Q3 - 86,5$) кг, тест Kolmogorov-Smirnov $p > 0,10$). Аналогічною була ситуація з ІМТ ($29,7 \pm 5,17$ кг/м² та $29,3 \pm 4,25$ кг/м², відповідно, $p = 0,6592$).

Звертає на себе увагу те, що майже в половині випадків одностатеві ДХДА двійні були генеровані завдяки ДРТ. Практично в $\frac{3}{4}$ випадків різностатеві двійні є наслідком застосування репродуктивних технологій, тобто частота виникнення різностатевих двієнь приблизно в 1,5 рази вище, ніж одностатевих.

Враховуючи все вище зазначене, можна заключити, що не було принципової різниці серед матерів різних груп.

Проводили зважування новонароджених одразу після пологів. Масу тіла при народженні малюків класифікували відповідно до міжнародних стандартів оцінки зростання плода [1]. Малюків масою нижче

10 вагової перцентилі розцінювали, як малі для гестаційного віку плоди (МГВП) [16], важчими за 90 перцентиль – великі для гестаційного віку плоди (ВГВП).

При дослідженні плацент керувалися рекомендаціями по дотриманню стандартних критеріїв їх макроскопічного обстеження [17].

Розташовували плаценти на рівній горизонтальній поверхні фетальною стороною вгору і фотографували їх цифровою камерою Panasonic DMX LC 15. Слідкували за тим, щоб камера розташовувалась строго вертикально над центром об'єкту і була паралельною до нього. В площі верхньої поверхні плацентарного диска розташовували лінійку або сантиметрову стрічку для подальшого калібрування камери. Як і група американських дослідників [18], ми проводили вимірювання геометричних параметрів плацент на цифрових фотографіях [19]. На відміну від них користувалися програмою ImageJ/Fiji 1.46r, яка є у вільному доступі (<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>). Програмне забезпечення дозволяє виконати непряму планіметрію. На знімках обводили контури плацентарного диска. Визначали його максимальний діаметр (MaxA) як відстань між найвіддаленішими точками контуру (рис. 1). Він слугував координатною віссю X. Мінімальний діаметр плаценти (MinA), або її ширину, вимірювали як найбільший діаметр на осі, перпендикулярній до MaxA. Він виконував роль Y осі координат. Розраховували співвідношення максимального та мінімального діаметрів (AR). Програма давала координати центральної точки фігури, яку називають центроїд. З математичної точки зору це середнє значення X та Y координат всіх пікселів у виділенні. Центроїд помічали вручну великою крапкою.

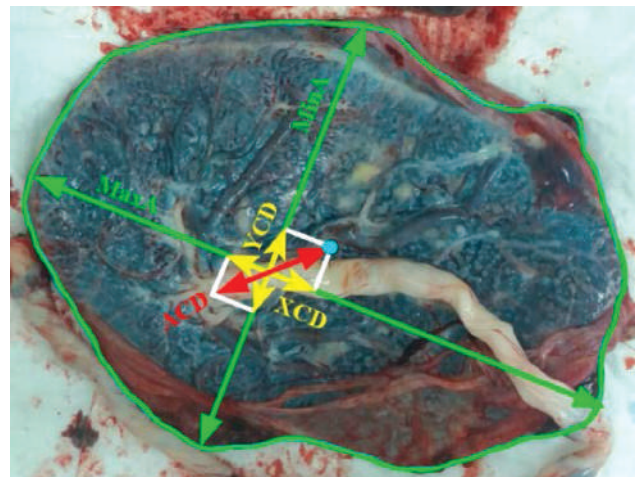


Рис. 1. Вимірювання морфометричних показників на цифровій фотографії плаценти

Примітки: зелена лінія – зовнішній контур плаценти

● – центроїд плацентарного диска

ACD – абсолютне зміщення точки вrostання пупкового канатика

MaxA – максимальний діаметр плацентарного диску

MinA – мінімальний діаметр плацентарного диску

XCD – проекція зміщення точки фіксації пуповини на вісь X

YCD – проекція точки фіксації пуповини на вісь Y

Абсолютне зміщення точки вrostання пупково-го канатика (ACD) визначали як відстань від цього місця до центроїду. Центроїд не завжди співпадає з діаметрами плаценти, так само як і діаметри не обов'язково перехрещуються на рівні своїх центрів. Вектор зміщення точки фіксації від центроїда визначали як різницю їх координат на осях X та Y. Вимірювали його в сантиметрах і представляли як відсоток від половини відповідного діаметра.

Програма розраховувала площу плацентарного диску (S) з фетальної сторони в см² та периметр (Perim) в см.

Циркулярність диску плаценти (Circ) розраховували за формулою:

$$\text{Circ} = 4\pi \times \frac{S}{\text{Perim}^2}$$

Чим ближче даний показник до 1, тим більше форма об'єкта наближається до кола. Інший показник – округлість (Round) розраховували за формулою:

$$\text{Round} = \frac{S}{\pi \times \text{MaxA}^2}$$

Товщу плаценти (H) вимірювали в найтовщому місці, вертикально проколюючи плаценту наскрізь голкою або дерев'яною паличкою. Об'єм плаценти (V) визначали, занурюючи її в прозору мірну посудину з рідиною.

Масу плацент визначали протягом однієї години після пологів. Перед зважуванням акуратно видаляли оболонки плода, відрізували пуповину на відстані 1 см від місця її фіксації до плацентарного диску. Видаляли кров з поверхневих фетальних судин та згортки крові на материнській поверхні.

При зрощених плацентах перед проведенням вимірювань їх попередньо обережно розділяли вздовж лінії зрощення.

Оцінку адекватності живлення плодів проводили за допомогою фето-плацентарного індексу (ФПІ) [20]. Останній розглядають в якості індикатора функціональної ефективності плаценти [7].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 8.0 (Statsoft Inc., США). Для вибірок з нормальним розподілом результати наводили як середнє ± стандартне відхилення (M ± σ). Достовірність різниці двох незалежних вибірок з нормальним розподілом і однакою дисперсією оцінювали шляхом двобічного двовибіркового t-критерію Student (t), декількох груп – дисперсійного аналізу (ANOVA). Оцінку ступеню взаємозв'язку між

нормально розподіленими кількісними змінними виконували шляхом обчислення коефіцієнта лінійної кореляції Pearson (r). Для несиметричних варіаційних рядів визначали медіану (Me), нижній (Q₁) і верхній (Q₃) квартилі (25-й та 75-й процентилі) і дані наводили як Me (Q₁; Q₃). Порівняння двох незалежних груп, які не відповідають нормальному розподіленню, проводили за допомогою непараметричного тесту Kolmogorov-Smirnov.

Для дослідження впливу декількох незалежних змінних на залежну змінну проводили множинний лінійний регресійний аналіз. З метою виявлення мультиколінеарності оцінювали рівень парної кореляції між предикторами (сильним вважали зв'язок при r > 0,7) та розраховували дисперсійно-інфляційний фактор (VIF) для кожного з них за формулою, де:

$$\text{VIF} = \frac{1}{1 - R_j^2}$$

R_j² є коефіцієнт детермінації змінної j відносно інших незалежних змінних. Вважається, що змінні, VIF-фактор яких більший за 10, є мультиколінеарними [21].

Статистичні гіпотези вважали достовірними при критичному рівні значущості p ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Середня маса при народженні всіх малюків дорівнювала 2579,1 ± 490,17 г. Серед 135 ДХДА двієнь (270 плодів), плаценти яких були макроскопічно обстежені, 32 (11,9%) малюки класифіковані як МГВП, 7 (2,6%) – ВГВП.

Серед всієї вибірки середні морфометричні показники плацент були наступними: маса – 482,4 ± 114,17 г (мінімальна – 240 г, максимальна – 770 г), товщина – 2,5 ± 0,66 см, площа поверхні – 210,2 ± 55,66 см², MaxA – 19,1 ± 2,63 см, MinA – 13,8 ± 2,48 см, AR – 1,5 ± 0,39, V – 358,5 ± 143,78 мл, периметр – 57,6 ± 6,83 см. Дисперсійний аналіз не виявив різниці як в середині пар, так і між групами як в масі плацент, так і в масі новонароджених. Виявлена сильна кореляція між масою плацент та вагою новонароджених в усій когорті ДХДА двієнь (r = 0,7059, p < 0,0001). Найбільш сильною вона була в одностатевих жіночих двійнях (r = 0,7886, p < 0,0001), потім у різностатевих (r = 0,7093, p < 0,0001), трохи слабшою – в одностатевих чоловічих парах (r = 0,6065, p < 0,0001). Проте значні коливання маси плацент в межах груп з практично однаковою масою плодів можуть вказувати на велику різницю в їх функціональній активності. Так, у новонароджених з масою тіла в районі 2500 г, маса плацент коливалася від 250 г до 600 г.

Дисперсійний аналіз не виявив суттєвої різниці в більшості показників, що характеризують геометричну форму плацент, між різними групами ДХДА двієнь та в середині пар (табл. 1).

Геометричні параметри плацентарних дисків в залежності від типу дихоріальної діамніотичної двійні

Показник	Тип двійні					
	дівчинка + хлопчик M ± σ		дівчинка + дівчинка M ± σ		хлопчик + хлопчик M ± σ	
Кількість пар	68		32		35	
Порядок новонароджених	I	II	I	II	I	II
MaxA (см)	18,6 ± 3,29	19,0 ± 1,73	19,5 ± 2,86	19,4 ± 3,19	19,3 ± 2,14	19,6 ± 2,32
MinA (см)	13,2 ± 2,45	13,7 ± 2,30	14,3 ± 2,36	14,2 ± 2,34	13,8 ± 2,66	14,5 ± 2,74
AR	1,8 ± 0,53	1,4 ± 0,27	1,4 ± 0,20	1,4 ± 0,19	1,4 ± 0,23	1,4 ± 0,35
S (см ²)	196,0 ± 57,86	206,3 ± 43,46	221,3 ± 57,42	220,2 ± 67,69	212,4 ± 57,51	223,8 ± 53,53
Perim (см)	55,9 ± 9,21	56,5 ± 5,19	60,3 ± 6,18	58,5 ± 6,22	58,9 ± 5,89	58,8 ± 5,07
Circ	0,787 ± 0,1308	0,804 ± 0,0843	0,751 ± 0,0952	0,790 ± 0,0932	0,758 ± 0,1193	0,802 ± 0,0832
Round	0,734 ± 0,1353	0,725 ± 0,1239	0,740 ± 0,1058	0,737 ± 0,0999	0,713 ± 0,1097	0,748 ± 0,1506
S*Round	144,7 ± 53,15	152,6 ± 48,95	164,6 ± 51,95	162,4 ± 52,46	155,0 ± 57,87	170,9 ± 63,11
S*Circ	155,5 ± 55,03	167,8 ± 46,14	170,0 ± 58,12	178,8 ± 73,24	165,3 ± 62,19	182,8 ± 59,90
H (см)	2,7 ± 0,59	2,8 ± 0,77	2,6 ± 0,78	2,4 ± 0,71	2,6 ± 0,66	2,4 ± 0,64
V (мл)	349,2 ± 125,45	376,5 ± 84,45	372,7 ± 157,78	350,7 ± 129,40	376,0 ± 151,36	373,6 ± 161,34

В різних групах відмінними були лише співвідношення великого і малого діаметрів ($p < 0,0001$), периметр диска ($p = 0,0176$) та його товщина ($p = 0,0150$). Вага новонароджених та маса плацент корелювали практично зі всіма показниками, що характеризують форму останніх, за виключенням AR. Найсильнішою була кореляція з об'ємом плацент ($r_{V_{m-диг}} = 0,66$, $p < 0,0001$; $r_{V_{m-пл}} = 0,59$, $p < 0,0001$) та S^*Circ ($r_{S^*Circ_{m-диг}} = 0,64$; $p < 0,0001$; $r_{S^*Circ_{m-пл}} = 0,62$; $p < 0,0001$).

Плаценти з порушеною циркулярністю мають меншу площу. Виявлена позитивна кореляція між показником Circ та площею плацент ($r = 0,4671$, $p < 0,0001$).

Все вище сказане вказує на те, що маса плацент та малюків при народженні залежить від геометричної форми плацентарного диску. Чим вона ближче до кола, тим краще функціональна спроможність плаценти, що відбивається в більшій масі плацент та новонароджених.

В попередніх дослідженнях нами показано [19], що плаценти зі зміщеною від центру точкою фіксації

пуповини мали дещо меншу поверхню. Виявлена слабка негативна кореляція між їх площею та ACD і XCD ($r = -0,2068$, $p = 0,0006$ та $r = -0,2471$, $p = 0,00004$ відповідно), більш сильна – між ACD та МП ($r = -0,4284$, $p < 0,0001$). Маса при народженні сильніше зворотно корелювала з абсолютним зміщенням від центру місця фіксації ($r = -0,6115$, $p < 0,0001$). Вважаємо, що останнє зумовлене погіршенням функціональної здатності плацент по забезпеченню плодів поживними речовинами та киснем. Значно більш важливим виглядає зміщення точки фіксації пуповини до плаценти вздовж її більшої осі ($r_{XCD_{m-диг}} = -0,7131$, $p < 0,0001$) порівняно з переміщенням відносно короткої осі диску ($r_{YCD_{m-диг}} = -0,2981$, $p < 0,0001$).

Аналіз динаміки змін ФПІ в залежності від гестаційного віку демонструє його збільшення в усіх групах ДХДА двійнь. Порівняння ФПІ при різних варіантах ДХДА вагітності не виявило статистичної значущості різниці між першим та другим плодом в кожній групі (табл. 2).

Таблиця 2

Фето-плацентарний індекс ДХДА двійнь

Типи двійнь I плід		ФПІ		P
Стать	n	II плід M ± σ	M ± σ	
дівчинка+дівчинка	32	5,4±1,02	5,1±0,93	0,2437
хлопчик+хлопчик	35	5,6±1,16	5,5±1,37	0,8243
дівчинка+хлопчик	68	5,6±1,25	5,6±1,05	0,9722
Всього	135	5,5±1,17	5,4±1,12	0,5249

Дисперсійний аналіз не виявив різниці ФПІ при різних варіантах ДХДА двієнь ($p = 0,1386$), а також між плодами, маса яких відповідає гестаційному віку та МГВП і ВГВП ($p = 0,6548$). В той же час знайдений слабкий зворотній кореляційний зв'язок між ФПІ та більшістю параметрів, які характеризують геометричну форму плацентарного диску та місце фіксації пуповини як у всієї групи ДХДА двієнь, так і у різностатевих пар.

Різні показники зростання плацент мають неоднаковий, а, часто, навіть протилежний вплив на масу дітей при народженні. Тому вважаємо доцільним вивчити одночасний вплив різних факторів на масу новонароджених і виявити ті, що мають найбільше значення. При формуванні множинної лінійної регресійної моделі, яка дозволить передбачити масу дитини при народженні в усій групі ДХДА двієнь, спочатку були включені всі фактори, які потенційно могли б впливати на цей показник: маса плаценти, її максимальний та мінімальний діаметри, товщина, об'єм, периметр, S*Сіrc, S*Round, ACD, XCD та YCD. Оцінка кореляційної матриці виявила наявність достатньо сильної кореляції ($r > 0,7$) між деякими змінними.

Поетапно з пар з високою кореляцією видаляли по одній змінній з меншим коефіцієнтом Beta, починаючи з найбільш сильних зв'язків. Потім також поетапно виключили незалежні змінні з максимальним статистично не достовірним значенням p . Це дозволило визначити фактори, що мають достовірний вплив на залежну змінну – масу дитини при народженні (табл. 3).

Згідно даних таблиці 3, регресійна модель для всієї групи ДХДА двієнь має вигляд: маса при народженні = $2242,3 + 0,8 * \text{МП} + V - 10,0 * \text{XCD}$

З метою перевірки якості підгонки рівняння регресії, проведений аналіз залишків. Гістограма розподілу залишків наближається до графіка нормального розподілу (рис. 2).

Нормальний ймовірнісний графік залишків не виявляє систематичних відхилень отриманих даних від теоретичної нормальної прямої (рис. 3).

Діаграма розсіяння демонструє хаотичне розташування залишків, що означає відсутність їх залежності від передбачених значень (рис. 4).

Розрахунок VIF-фактору для кожного з предикторів продемонстрував відсутність лінійної залежності між ними (табл. 4).

Таблиця 3

Фактори, що статистично достовірно впливають на масу новонароджених з дихоріальних діамніотичних двієнь

N = 270	Підсумок для залежної змінної: маса новонародженого R = 0,8368, R ² = 0,7002, скориговане R ² = 0,6968 F (3,266) = 207,05 p < 0,0001, стандартна похибка: 269,91					
	Beta	Стандартна похибка Beta	B	Стандартна похибка B	t (265)	p
Константа	-	-	2242,3	107,20	20,9	<0,0001
МП	0,1968	0,04362	0,8	0,19	4,5	<0,0001
V	0,2601	0,04456	1,0	0,17	5,8	<0,0001
XCD	-0,5298	0,04121	-10,0	0,78	-12,9	<0,0001

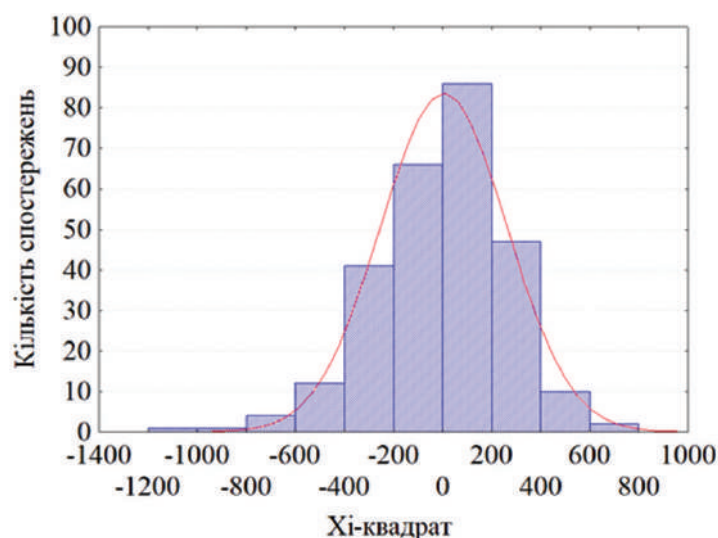


Рис. 2. Гістограма розподілу регресійних залишків

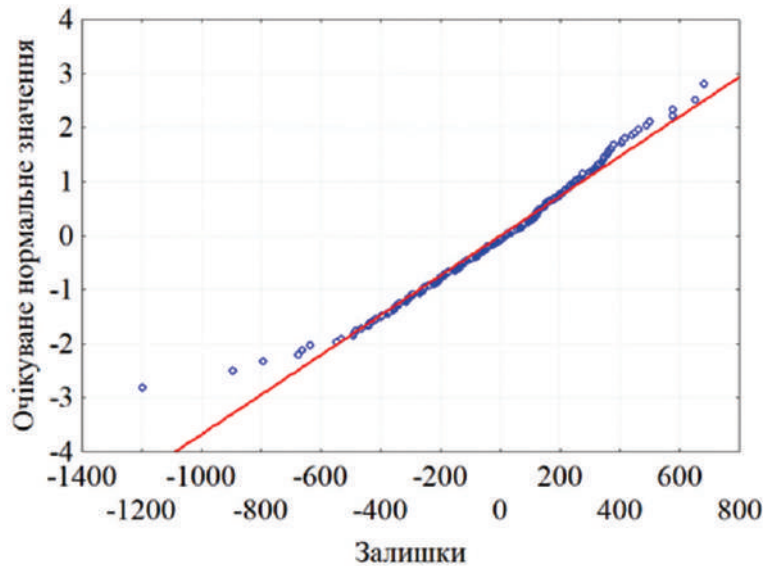


Рис. 3. Нормальний ймовірнісний графік залишків.
Теоретична — нормальна пряма.

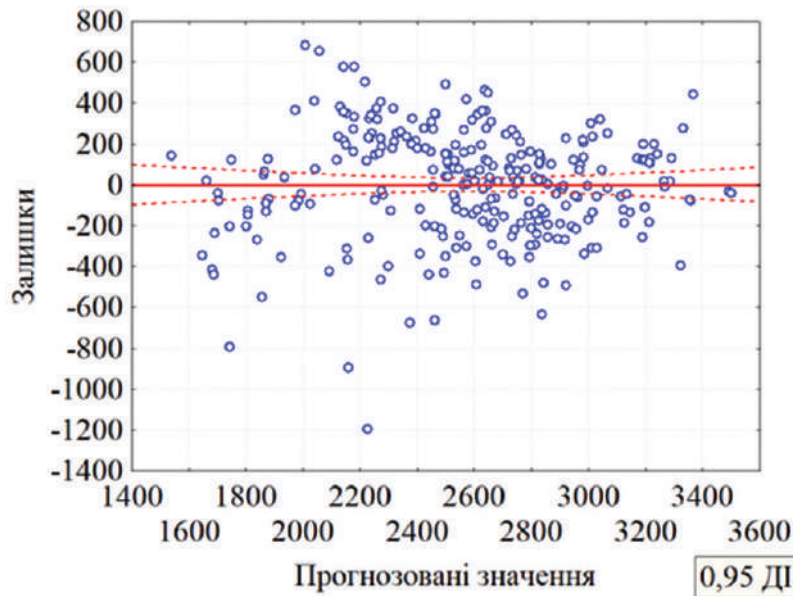


Рис. 4. Залежність залишків від передбачених значень. Залежна змінна: маса плода при народженні

Таблиця 4

Дослідження наявності лінійного зв'язку між незалежними змінними в дисперсійній моделі

Незалежна змінна	R ²	VIF
МП	0,4075	1,7
V	0,4323	1,8
XCD	0,3362	1,5

Аналогічні обчислення проведені для всіх груп ДХДА двійнь. Оцінка прийнятності моделей в цілому (ANOVA, $p < 0,05$) показала їх прийнятність, і що вони будуть краще передбачувати результат, порівняно з прогнозом за середніми значеннями. Регресійні

моделі для різних варіантів ДХДА двійнь мають достатньо високі коефіцієнти детермінації – від $R^2 = 0,6727$ у дівчат з різностатевих пар до $R^2 = 0,8469$ у одностатевих пар жіночої статі (табл. 5). Це означає, що запропоновані моделі враховують 67-85% факторів, від яких залежить маса новонароджених.

Перевірка залишків не виявила лінійного зв'язку між незалежними змінними, включеними до моделей, оскільки коефіцієнти парної кореляції між ними були меншими за 0,7, а $VIF < 10$. Це дозволяє виключити наявність мультиколінеарності і підвищує достовірність моделей. Аналіз залишків продемонстрував їх хаотичне розташування і не виявив систематичних

Множинні регресійні моделі залежності маси новонароджених від морфометричних показників їх плацент для різних варіантів ДХДА двієнь

Групи дихоріальних діамніотичних двієнь	п малюків	Регресійне рівняння Залежна змінна: маса новонародженого	R2
Всі двійні	270	$2242,3 + 0,8 * \text{МП} + \text{V} - 10,0 * \text{XCD}$	0,7002
Різностатеві двійні	136	$2029,9 + 0,6 * \text{МП} + 2,0 * \text{V} - 7,4 * \text{XCD} - 2,2 * \text{YCD}$	0,6913
Дівчата з різностатевих двієнь	68	$1158,2 + 1,4 * \text{МП} + 2,0 * \text{V} - 4,6 * \text{XCD}$	0,6727
Хлопчики з різностатевих двієнь	68	$2857,9 + 1,3 * \text{V} - 11,7 * \text{XCD} - 5,2 * \text{YCD}$	0,7943
Одностатеві двійні	134	$2777,6 + \text{МП} - 12,4 * \text{XCD} - 4,1 * \text{YCD}$	0,8064
Дівчата з одностатевих двієнь	64	$1711,4 + 0,9 * \text{МП} + 1195,2 * \text{Circ} - 12,0 * \text{XCD}$	0,8463
Хлопчики з одностатевих двієнь	70	$2963,9 + 0,7 * \text{V} - 12,1 * \text{XCD} - 3,2 * \text{YCD}$	0,7571

відхиленнь отриманих даних від теоретичної нормальної прямої.

Аналіз отриманих регресійних рівнянь показує, що, крім групи різностатевих двієнь, три показники впливають на масу новонародженого. Найбільшу стабільність продемонстрував запропонований нами показник – XCD. Він присутній в усіх рівняннях. Сильна негативна кореляція між ним і масою новонароджених ($r = -0,7131$, $p < 0,0001$) вказує на те, що чим далі вздовж максимальної осі плаценти знаходиться точка фіксації пуповини, тим меншою буде маса плода. Не зважаючи на значно слабкішу кореляцію між зміщенням точки вrostання пуповини вздовж мінімальної осі (YCD) та масою новонароджених ($r = -0,2981$, $p < 0,0001$), в чотирьох групах (всі різностатеві та одностатеві двійні, хлопці з різностатевих двієнь та одностатеві двійні чоловічої статі) він теж продемонстрував свою негативну значущість. Правда, його коефіцієнти приблизно вдвічі були меншими, ніж у XCD. Підтверджує результати кореляційного аналізу достовірний позитивний вплив маси плаценти або її об'єму на очікувану масу новонародженого. Ці незалежні змінні виявилися значущими в усіх групах. Важливий вплив геометрії плацентарного диску на масу дитини при народженні передусім дівчат продемонструвала наявність коефіцієнту Circ в регресійному рівнянні для дівчат з одностатєвої групи.

Різні параметри, які характеризують розміри та форму плаценти, такі що вивчаються рутинно та запропоновані нами, вказують на різні аспекти функції плацент. Так, площа поверхні плацентарного диску, параметри, що характеризують його геометричну форму, відображують здатність плаценти до експансії певної території. Товща плаценти є непрямим маркером кількості вільозних розгалужень та площі обміну поживними речовинами.

Плаценти ростуть швидше плодів. Тому на ранніх термінах вагітності перші важчі останніх. В другому триместрі збільшується швидкість зростання близнюків, що пригнічує ріст плацент. Після 20 тижня маса плаценти становить приблизно половину маси

плода. Поступово ця різниця зростає. Відомо, що після 31 тижня гестації дещо гальмується швидкість збільшення плаценти, а швидкість росту плодів зберігається [22]. В останні тижні збільшення цього показника зумовлене уповільненням росту плацент.

Як видно із результатів, ФПІ у ДХДА двієнь обстеженої групи суттєво не відрізнявся від знайдених у літературі значень для одноплідних вагітностей, що коливаються у межах 5,2-5,7 [23]. Малу інформативність продемонстрував ФПІ при виявленні ДМТП, оскільки відсутня достовірна різниця ФПІ між I та II плодами практично в усіх дискордантних так конкордантних парах, а також між загальним ФПІ дискордантної та конкордантної груп. Лише в дискордантних жіночих одностатєвих парах ФПІ першого плода перевищував відповідний показник другої дівчинки.

ВИСНОВКИ

1. В дихоріальних парах маса плацент мала сильну позитивну кореляцію з масою новонароджених ($r = 0,71$, $p < 0,0001$). Різностатєві пари займали проміжне положення між одностатєвими парами жіночої та чоловічої статі.

2. Маса плацент та вага новонароджених знаходяться в достатньо сильному прямому зв'язку з об'ємом плаценти ($rV_{\text{м-дит}} = 0,66$, $p < 0,0001$; $rV_{\text{м-пл}} = 0,59$, $p < 0,0001$) та $S * \text{Circ}$ ($rS * \text{Circ}_{\text{м-дит}} = 0,64$; $p < 0,0001$; $rS * \text{Circ}_{\text{м-пл}} = 0,62$; $p < 0,0001$). Чим ближче форма плаценти до кола, тим її функціональна спроможність вище.

3. Погіршення функціональної здатності плацент може бути пов'язане з фіксацією пуповини далеко від центру плацентарного диску. Сильніший вплив має зміщення вздовж більшої осі ($r = -0,7131$, $p < 0,0001$) порівняно з переміщенням відносно короткої осі ($r = -0,2981$, $p < 0,0001$).

4. Множинний регресійний аналіз показав, що крім групи різностатєвих двієнь, три показники впливають на масу новонародженого. В усіх групах статистичну значущість продемонстрували ступінь

зміщення точки фіксації пуповини вздовж максимального діаметру плаценти та маса або об'єм останньої. У різностатевих пар значущими були чотири предиктори: маса, об'єм плацент та ступінь відхилення від центріда точки фіксації вздовж обох осей. Запропоновані моделі демонструють, що 67-85% варіабельності ваги при народженні ДХДА близнюків може бути пояснено трьома або чотирма простими вимірюваннями їх плацент.

Фінансування. Дане дослідження не отримало зовнішнього фінансування

Конфлікт інтересів немає

REFERENCES

1. Stirnemann J, Villar J, Salomon LJ, Ohuma E, Ruyan P, Altman DG, Nosten F, Craik R, Munim S, Cheikh Ismail L, Barros FC, Lambert A, Norris S, Carvalho M, Jaffer YA, Noble JA, Bertino E, Gravett MG, Purwar M, Victora CG, Uauy R, Bhutta Z, Kennedy S, Papageorghiou AT. International Estimated Fetal Weight Standards of the INTERGROWTH-21st Project. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017; 49(4): 478-86. DOI: 10.1002/uog.17347.
View at: Publisher Site: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.17347>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27804212/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5516164/>
2. Jelenkovic A, Sund R, Yokoyama Y, Hur YM, Ullemar V, Almqvist C, et al. Birth size and gestational age in opposite-sex twins as compared to same-sex twins: An individual-based pooled analysis of 21 cohorts. *Sci Rep.* 2018; 8(1):6300. DOI:10.1038/s41598-018-24634-2
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24634-2>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29674730/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908858/>
3. Lynch JL, Gibbs BG. Birth Weight and Early Cognitive Skills: Can Parenting Offset the Link? *Matern Child Health J.* 2017 Jan;21(1):156-67. DOI: 10.1007/s10995-016-2104-z.
View at: Publisher Site: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10995-016-2104-z>
4. Freedman AA, Hogue CJ, Marsit CJ, Rajakumar A, Smith AK, Grantz KL, Goldenberg RL, Dudley DJ, Saade GR, Silver RM, Gibbins KJ, Bukowski R, Drews-Botsch C. Associations between features of placental morphology and birth weight in dichorionic twins. *American Journal of Epidemiology.* 2019; 188(3): 518-26. DOI: 10.1093/AJE/KWY255
View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/aje/article/188/3/518/5193217>
5. Chisholm KM, Folkins AK. Placental and clinical characteristics of term small-for-gestational-age neonates: A case-control study. *Pediatric and Developmental Pathology.* 2016; 19(1): 37-46. DOI: 10.2350/15-04-1621-OA.1
View at: Publisher Site: <https://journals.sagepub.com/doi/10.2350/15-04-1621-OA.1>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26368794/>
6. Grandi C, Veiga A, Mazzitelli N, Cavalli R de C, Cardoso V. Medidas de crescimento placentário em relação ao peso de nascimento em uma população Latino-Americana. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2016 Aug 1. 38(8):373-80. DOI:10.1055/s-0036-1586721
View at: Publisher Site: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0036-1586721>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27501191/>
7. De Paepe ME, Shapiro S, Young LE, Luks FI. Placental weight, birth weight and fetal:placental weight ratio in dichorionic and monochorionic twin gestations in function of gestational age, cord insertion type and placental partition. *Placenta.* 2015; 36(2): 213-20. DOI: 10.1016/J.PLACENTA.2014.11.009
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143400414008649?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25492576/>
8. Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Dickinson H, Moritz KM. Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta. Vol. 54, *Placenta.* 2017; 54:10-6. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.12.008
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143400416306555?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27979377/>
9. Ismail KI, Hannigan A, O'Donoghue K, Cotter A. Abnormal placental cord insertion and adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews.* 2017; 6: article 242. DOI: 10.1186/s13643-017-0641-1
View at: Publisher Site: <https://systematicreviewsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13643-017-0641-1>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29208042/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5718132/>
10. Sunde ID, Vekseth C, Rasmussen S, Mahjoob E, Collett K, Ebbing C. Placenta, cord and membranes: a dual center validation study of midwives' classifications and notifications to the Medical Birth Registry of Norway. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 2017; 96(9): 1120-7. DOI: 10.1111/aogs.13164
View at: Publisher Site: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aogs.13164>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28481411/>
11. Yampolsky M, Salafia CM, Shlakhter O, Haas D, Eucker B, Thorp J. Centrality of the Umbilical Cord Insertion in a Human Placenta Influences the Placental Efficiency. *Placenta.* 2009; 30(12): 1058-64. DOI: 10.1016/j.placenta.2009.10.001
View at: Publisher Site: <https://www.sci>

- encedirect.com/science/article/abs/pii/S0143400409003075?via%3Dihub
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19879649/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2790011/>
12. Wiedaseck S, Monchek R. Placental and cord insertion pathologies: Screening, diagnosis, and management. *Journal of Midwifery and Women's Health*. 2014; 59(3): 328-35. DOI: 10.1111/jmwh.12189
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jmwh.12189>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24751147/>
 13. Osianlis T, Rombauts L, Gabbe M, Motteram C, Volleghoven V. Incidence and zygosity of twin births following transfers using a single fresh or frozen embryo. *Hum Reprod*. 2014 Jul; 29(7):1438-43. DOI: 10.1093/humrep/deu064.
View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/humrep/article/29/7/1438/902705>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24760778/>
 14. Euro-Peristat Project. European Health Report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015. 2015;
View at: Publisher Site: <https://www.europeristat.com/>
URL: https://www.europeristat.com/images/EPHR2015_Euro-Peristat.pdf
 15. Salafia CM, Kiryankova N, Inany H, Charlagorla P, Park M, Khawar N, Vanhorn S, Dygulska B, Narula P, Lederman S. Metabolic scaling and twin placentas. *Placenta*. 2016; 37: 16-8. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.11.010
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143400415300916?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26748158/>
URL: <https://ur.booksc.eu/book/49864495/dfee99>
 16. Beune IM, Pels A, Gordijn SJ, Ganzevoort W. Temporal variation in definition of fetal growth restriction in the literature. *Ultrasound Obstet. Gynecol*. 2019; 53(5):569-70. DOI: 10.1002/uog.19189
View at: Publisher Site: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.19189>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30079567/>
 17. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler MA, Derricott H, Evans MJ, Faye-Petersen OM, Gillan JE, Heazell AEP, Heller DS, Jacques SM, Keating S, Kelehan P, Maes A, McKay EM, Morgan TK, Nikkels P GJ, ... Gordijn SJ. Sampling and definitions of placental lesions Amsterdam placental workshop group consensus statement. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2016; 140(7): 698-713. DOI: 10.5858/arpa.2015-0225-CC
View at: Publisher Site: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/140/7/698/65370/Sampling-and-Definitions-of-Placental-Lesions>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27223167/>
 18. Chen Y, Zhang Z, Wu C, Davaasuren D, Goldstein JA, Gernand AD, Wang JZ. AI-PLAX: AI-based placental assessment and examination using photos. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 2020; 84:101744. DOI: 10.1016/j.compmedimag.2020.101744
View at: Publisher Site: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0895611120300471?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32634729/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7533514/>
 19. Tepla I. Influence of the placental cord insertion site on the placental mass and the birth weight in dichorionic diamniotic twins. *EUREKA: Health Sciences*. 2021; (4): 3-11. DOI: 10.21303/2504-5679.2021.001843
View at: Publisher Site: <https://journal.eu-jr.eu/health/article/view/1843>
 20. Thame M, Osmond C, Bennett F, Wilks R, Forrester T. Fetal growth is directly related to maternal anthropometry and placental volume. *Eur J Clin Nutr*. 2004 Jun;58(6):894-900. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601909.
View at: Publisher Site: <https://www.nature.com/articles/1601909>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15164110/>
 21. Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*. 2010; 1(1):3-14. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x
View at: Publisher Site: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x>
 22. Waszak M, Cieřlik K, Kempiak J, Bręborowicz G, Gadzinowski J. Relationship between type and weight of placenta and neonate birth weight in twin pregnancy. *Anthropological Review*. 2013; 76 (2): 173-82.
View at: Publisher Site: http://cejsh.icm.edu.pl/cejsh/element/bwmeta1.element.doi-10_2478_anre-2013-0017
URL: <https://sciencodirect.com/pdf/10.2478/anre-2013-0017>
 23. Lurie S, Feinstein M, Mamet Y. Human fetal-placental weight ratio in normal singleton near-term pregnancies. *Gynecol. Obstetr. Invest*. 1999; 48(3):155-7. DOI: 10.1159/000010163
View at: Publisher Site: <https://www.karger.com/Article/Abstract/10163>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10545736/>

Article history
Received: 31.08.2021
Revision requested: 12.09.2021
Revision received: 15.09.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

СВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОСТА ПЛАЦЕНТ С МАССОЙ ДЕТЕЙ ПРИ РОЖДЕНИИ В ДИХОРИАЛЬНИХ ДІАМНІОТИЧНИХ ДВОЙНЯХ

Теплая И.В.

Национальный университет здравоохранения Украины имени П.Л. Шупика, Киев, Украина

iryana.tepla@ukr.net

Актуальность. Одним из основных показателей внутриутробного развития ребенка является его масса при рождении. Состояние плацент отражает влияние материнской среды на плод. Важно выяснить, какие параметры роста плацент достоверно влияют на массу дихориальных диамниотических (ДХДА) двоен.

Цель: исследовать связь между ростом плаценты и массой при рождении дихориальных диамниотических двоен.

Материалы и методы. На протяжении 2016-2020 годов обследовано 135 пар ДХДА близнецов: разнополых 68, однополых женского пола – 32 и мужского пола – 35. Гестационный возраст колебался от 29 до 39,5 недель, в среднем составил $36,4 \pm 1,74$ недели. Оценивали влияние на массу при рождении максимального и минимального диаметров плацент, периметра, площади, циркулярности (Circ), округлости, толщины, массы (МП), объема (V), смещения точки фиксации пупочного канатика от центра диска вдоль его максимальной (XCD) и минимальной оси (YCD).

Результаты. Выявлена сильная корреляция между МП и весом новорожденных во всей когорте ДХДА двоен ($r = 0,7059$, $p < 0,0001$). Самой сильной она была у однополых девичьих пар ($r = 0,7886$, $p < 0,0001$), потом у разнополых ($r = 0,7093$, $p < 0,0001$), несколько более слабой – у однополых мужских пар ($r = 0,6065$, $p < 0,0001$). Вес новорожденных и МП коррелировали практически со всеми показателями, характеризующими форму плацент. Наиболее сильной была корреляция с V ($r_{V, \text{м-длт}} = 0,66$, $p < 0,0001$; $r_{V, \text{м-пл}} = 0,59$, $p < 0,0001$) и площадью* Circ ($rS^*_{\text{Circ м-длт}} = 0,64$; $p < 0,0001$; $rS^*_{\text{Circ м-пл}} = 0,62$; $p < 0,0001$). Множественный регрессионный анализ влияния разных морфометрических показателей плацент на массу новорожденных продемонстрировал статистическую значимость следующих параметров: XCD, МП, V, YCD и Circ. Регрессионная модель для всей группы ДХДА: масса при рождении = $2242,3 + 0,8 \cdot \text{МП} + V - 10,0 \cdot \text{XCD}$ ($R^2 = 0,7002$). Аналогичные формулы получены для разных по полу вариантов ДХДА двоен. Они учитывают 67-85% факторов, связанных с плацентами, от которых зависит масса новорожденных.

Выводы. В ДХДА парах масса плацент имела сильную положительную корреляцию с массой новорожденных. Оба показателя находятся в достаточно сильной прямой связи с V и площадью*Circ. Чем ближе форма плаценты напоминает круг, тем выше ее функциональная способность. Ухудшение последней может быть связано с фиксацией пуповины далеко от центра плацентарного диска. Более сильное влияние имеет смещение вдоль XCD по сравнению с YCD. Множественный регрессионный анализ показал, что у всех групп двоен статистическую значимость продемонстрировали XCD и МП или V последней. Предложенные модели показывают, что 67-85% изменчивости веса при рождении ДХДА близнецов может быть объяснено тремя или четырьмя простыми измерениями их плацент.

Ключевые слова: дихориальные диамниотические двойни, множественный регрессионный анализ, морфометрическое исследование плацент, масса ребенка при рождении.

THE RELATIONSHIP BETWEEN PLACENTAL GROWTH RATES AND THE BIRTH WEIGHT IN DICHORIONIC DIAMNIOTIC TWINS

Tepla I.V.

Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

iryana.tepla@ukr.net

Relevance. Birth weight is one of the main indicators of intrauterine fetal development. The condition of the placenta reflects the influence of the maternal environment on the fetus. It is important to find out which placental growth parameters significantly affect the mass of dichorionic diamniotic (DHDA) twins.

Objective: to investigate the relationship between indicators of placental growth and birth weight of dichorionic diamniotic twins.

Materials and methods. One hundred thirty-five DCDA twin pairs were studied during 2016-2020: 68 pairs were opposite-sex, 32 – same-sex females and 35 – same-sex males. The gestational age ranged from 29 to 39.5 weeks, averaging $36,4 \pm 1,74$ weeks. The influence of such parameters as maximum and minimum placental diameters, as well as perimeter, area, circularity (Circ), roundness, thickness, mass (PM), volume (V), displacement of the umbilical cord insertion site from the placental disc centre along its maximum (XCD) and the minimum axis (YCD).

Results. A strong positive correlation was found between PM and birth weight in the whole cohort of DCDA twins ($r = 0.7059$, $p < 0.0001$). It was strongest in the same-sex female group ($r = 0.7886$, $p < 0.0001$), then in the opposite-sex pairs ($r = 0.7093$, $p < 0.0001$), slightly weaker – in the same-sex male couples ($r = 0.6065$, $p < 0.0001$). The birth weight and PM correlated with almost all indicators that characterize the placental shape. The strongest correlation was with V ($r_{V, \text{BW}} = 0.66$, $p < 0.0001$; $r_{V, \text{PM}} = 0.59$, $p < 0.0001$) and the area*Circ ($rS^*_{\text{Circ BW}} = 0.64$; $p < 0.0001$; $rS^*_{\text{Circ PM}} = 0.62$; $p < 0.0001$). The multiple regression analysis of the effect of different morphometric parameters of the placentas on the birth weight has demonstrated the statistical significance of the following parameters: XCD, PM, V, YCD and Circ. The general regression model for the whole DCDA group: birth weight = $2242,3 + 0,8 \cdot \text{МП} + V - 10,0 \cdot \text{XCD}$ ($R^2 = 0,7002$). Similar equations were calculated for different types of DCDA tweens. Thus, morphometric measures account for the 67-85% variances of the birth weight of the DCDA tweens.

Conclusion. In the DCDA pairs, placental mass strongly positively correlated with birth weight. Both indicators are in strong relationship with V and their area*Circ. The closer the placental shape is to the circle, the higher its functional ability. Deterioration of the latter may be due to the far fixation of the umbilical cord from the center of the placental disc. The displacement along the maximum axis has a stronger impact comparing to the displacement relative to the minimum axis. The multiple regression analysis has revealed that statistical significance had XCD and PM or V in the whole types of twins. Proposed models demonstrate that 67-85% of the variability of birth weight may be accounted for by the three or four simple placental measures

Keywords: dichorionic diamniotic twins, multiple regression analysis, placental morphometric investigation, birth weight.

CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL SUBSTANTIATION OF TOPICAL APPLICATION OF SORPTION HYDROPHILIC/HYDROPHOBIC COMPOSITION BASED ON NANOSILICA IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH BURNS

¹*Chornopyschuk R.M.* <https://orcid.org/0000-0001-5422-7495>

¹*Nagaichuk V.I.* <https://orcid.org/0000-0001-9238-9276>

²*Gerashchenko I.I.* <https://orcid.org/0000-0001-8796-9137>

¹*Nazarchuk O.A.* <https://orcid.org/0000-0001-7581-0938>

³*Sidorenkov S.A.* <https://orcid.org/orcid.org/0000-0003-0382-4542>

¹*Chepliaka O.M.* <https://orcid.org/0000-0003-0116-3218>

⁴*Sidorenko L.A.* <https://orcid.org/0000-0002-0971-2819>

¹*National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine*

²*Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

³*Rehabilitation Centre, Valens, Switzerland*

⁴*State Medical and Pharmaceutical University N. Testemitanu, Chisinau, Republic of Moldova*

r.chornopyschuk@gmail.com

Relevance. One of the promising methods of treatment of patients with burns is the local use of sorption agents with antimicrobial properties.

Objective: experimental study of antimicrobial properties and clinical evaluation of the effectiveness of local use of a new sorption composition based on nanosilica in the complex treatment of patients with burns.

Materials and methods. The suggested sorption nanocomposition included highly dispersed silicon dioxide, polymethylsiloxane, decamethoxine, metronidazole.

The experimental study involved the study of the antimicrobial properties of the sorption nanocomposition and antimicrobial agents which are part of it.

The clinical material consisted of the results of examination of 42 patients with IIab-III degree burns with an area of 10-30% of the body surface. Depending on the tactics of local treatment, patients were divided into 2 groups: after early necrectomy, xenodermoplasty, the wound surface of the patients in the main group (n = 20) was treated with a solution of decamethoxine in combination with the same sorption powder. Treatment in the comparison group (n = 22) was similar except the use of sorption drugs. The examination included visual inspection of the injured area in combination with microbiological monitoring of the wound contents on the 3rd, 7th, 14th day.

Results. The obtained results confirmed the sufficient antimicrobial potential of the studied sorption nanocomposition, the properties of which are not inferior to the existing antiseptics for museum and clinical strains of microorganisms and fungi.

Signs of a more favorable wound healing process of the patients in the main group were observed: faster wound cleaning, less inflammatory reactions and much shorter preparation of wounds for grafting.

Conclusions. The obtained results convincingly indicate the effectiveness of a multicomponent composite based on nanosilica with antimicrobial components in a comprehensive treatment of patients with burns.

Key words: burns, wound healing process, infection, antiseptics, sorbents.

Relevance. Despite significant progress in the development of new technologies for the treatment of patients with thermal injuries, many problems of medical assistance remain far from being solved [1, 2]. An important prerequisite for their improvement was the significant achievements of scientists all over the world in understanding some pathogenetic features of the processes initiated by traumatic burn agents. In particular, the occurrence of burns as a response of the body to severe burns resulting in irritation, damage and death of numerous skin receptors followed by changes in the vital functions of all internal organs, systems, as well as metabolic disorders [3, 4]. One of the main etiological elements of the process development is numerous specific and nonspecific toxins, includ-

ing those of microbial origin, which come from areas of necrotic tissue [5, 6]. Hence, the local use of sorption agents in combination with antimicrobial substances is an important element of comprehensive treatment. Such agents include sorption hydrophilic/hydrophobic nanocomposition based on silica with the addition of antimicrobial drugs decamethoxine and metronidazole, information on the use of which in patients with burns is almost absent in the available literature.

The objective of this research was an experimental study of antimicrobial properties and clinical evaluation of the effectiveness of local use of a new sorption composition based on nanosilica in the complex treatment of patients with burns.

MATERIALS AND METHODS

The suggested sorption agent included hydrophilic highly dispersed silicon dioxide, hydrophobic polymethylsiloxane, a two quaternary ammonium compound – decamethoxine, a synthetic (5-nitroimidazole derivative) antiprotozoal antibacterial agent – metronidazole – in an appropriate proportion of masses without violating the limits of their safe therapeutic concentrations. The composition was prepared according to the original method, which involves mechanochemical immobilization of decamethoxin on the polymethylsiloxane surface and metronidazole on the silicon dioxide surface respectively. Subsequently, the obtained intermediates were mixed with highly dispersed silicon dioxide in a certain proportion. The ratio between the hydrophilic and hydrophobic component can be changed depending on the severity of the exudative process in the wound. The composition content and manufacturing method are protected by the corresponding patents (USA Patent US 10,226,425 B2).

Microbiological screening of the antimicrobial efficacy in vitro of the suggested hydrophilic hydrophobic composite and antimicrobial agents decamethoxine, metronidazole, which are part of it as a comparison, was performed prior to the clinical study. Museum test strains of gram-positive microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, gram-negative representatives of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636 were used for the study. Additionally, clinical isolates of pathogens of purulent inflammatory complications *Staphylococcus aureus* (n = 35), *Escherichia coli* (n = 26), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 20), *Candida albicans* (n = 16), *Proteus vulgaris* (n = 10), *Bacteroides fragilis* (n = 8), *Peptostreptococcus anaerobius* (n = 8), *Bacillus subtilis* (n = 7) were studied. All the cultures of clinical strains of microorganisms were endowed with typical species, morphological, tinctorial, cultural and biochemical properties. The antimicrobial properties of composite and antimicrobial comparison agents were investigated using a standard agar diffusion method. To approximate the conditions for studying the antimicrobial activity of antimicrobial agents to the conditions of the wound surface, nutrient media were inoculated with suspension of daily cultures of microorganisms in the amount of 1×10^8 CFU/ml. Evaluation of antimicrobial activity was determined by growth retardation zone around the wells (mm) 24 hours after culturing microorganisms (t = 37 °C). Cultivation of microorganisms *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacillus subtilis* was performed under anaerobic conditions [7, 8].

Evaluation of the results of microbiological research by agar diffusion method was performed according to the degree of growth retardation in the area of application of researched composition. The following criteria were used: absence of growth retardation zones of microorganisms around the well, a delay of up to 10 mm indicated

the lack of sensitivity of the microorganism to the tested drug; the growth retardation zone with a diameter of 10-15 mm indicated a low sensitivity of the culture to the studied concentration of antibacterial substance; growth retardation zone with a diameter of 15-25 mm was regarded as an indicator of sensitivity of the microorganism to the studied drug substance; growth retardation zone of more than 25 mm testified to high sensitivity of the microorganism to the studied drugs.

The clinical material consisted of the results of examination of 42 patients with IIab-III degree flame burns, injury area 10-30% of the body surface, who were treated at the Clinical Center for Thermal Injury and Plastic Surgery of the Municipal Non-profit Enterprise «Vinnytsya Regional Clinical Hospital Vinnytsya Regional Council» in 2018-2020. All patients underwent complex infusion-transfusion, antibacterial, symptomatic treatment, dressing changes with antimicrobials, wound dressings, which were combined with active surgical tactics: early removal of necrotic tissues on the 2nd – 3rd day after the injury, temporary closure of postoperative wounds with application of xenodermoplasty (LLC «Institute of Biomedical Technologies», Ternopil, Ukraine) and further restoration of skin integrity with free perforated autodermografts. Depending on the tactics of local drug treatment, patients were divided into 2 groups: the wound surface of the patients in the main group (n = 20; average age 48.11 ± 13.92 years) after early necrectomy, xenodermoplasty while preparing wounds for skin grafting was treated by 0.02 % solution of decamethoxine, evenly applied sorption powder and covered with a gauze bandage, impregnated with the same antiseptic. Local treatment of patients in the comparison group (n = 22; average age 48.74 ± 14.29 years) was similar except the use of sorption drugs.

Control over the wound process course involved visual inspection of the injured area with microbiological identification of the pathogen and its semiquantitative analysis on the 3rd, 7th, 14th day from the moment of injury to treatment with antiseptic in compliance with the rules of asepsis. The wounds were cleaned of purulent necrotic secretions with a sterile gauze napkin. The material was taken with a cotton swab and then transported in a sterile test tube with Amies medium to a bacteriological laboratory for 2 hours. Inoculation on a nutrient medium and evaluation of the results were performed according to the original method developed on the Department of Microbiology of the Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education [9]. The results were identified by a set of morphological, cultural and biochemical characteristics.

Collection of material for the study was performed in compliance with patient safety rules, preserved rights and canons of human dignity, moral and ethical standards in accordance with the basic provisions of GSP (1996), The Convention on Human Rights and Biomedicine (from

04.04.1997), The Helsinki Declaration of the World Medical Association on the ethical principles for scientific medical research involving human subjects (1964-2000), the Order of the Ministry of Health of Ukraine № 281 of 01.11.2000, the Code of Scientific Ethics of Ukraine (2009) and the mandatory consent of patients to participate in the research.

The obtained results were processed statistically using data processing software Microsoft Excel 2016 and «Statistica 5.5» (licence № AXXR910A374605FA).

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the evaluation of the growth retardation zones obtained in the study, the highest antimicrobial activity of the decamethoxine comparison preparation against all studied reference strains of microorganisms was established. Growth retardation zones around the wells with the studied sorption drug showed a similar high activity of the decamethoxine containing agent, which was similar in activity to decamethoxine against reference strains of *Proteus vulgaris* ATCC 4636 (14.35 ± 0.31 mm) and anaerobic bacteria *Bacillus subtilis* (19.21 ± 0.46 mm). There was no difference in the antipseudomonal activity of the sorption nanocomposition and decamethoxine as evidenced by clear zones of growth retardation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, which were within 15 mm in diameter. The antistaphylococcal activity of metronidazole in combination with decamethoxine in the nanocomposite with sorption properties was slightly lower but provided a sufficient antimicrobial effect (diameter of the growth retardation zone amounted to 19.86 ± 0.43 mm). A similar pattern was observed in relation to *Escherichia coli* culture, where the suggested

complex sorption agent delayed growth within 16.29 ± 0.35 mm, inferior to the solution of decamethoxine with a growth retardation zone of 23.42 ± 0.31 mm. In this case, the antimicrobial activity of the sorbent significantly exceeded the effect of metronidazole on museum strains of the studied gram-positive and gram-negative bacteria (Fig. 1).

High antimicrobial properties of the investigated sorption drug in relation to all investigated isolates of gram-positive and gram-negative pathogens of purulent inflammatory processes were also established. Its highest antimicrobial action was found against *Staphylococcus aureus*, where the diameter of the growth retardation zone was up to 19.37 ± 0.24 mm, moderately inferior to the antiseptic decamethoxine (27.37 ± 0.23 mm). In general, the results of comparative activity of these drugs showed the same effective antimicrobial effect on clinical strains of gram-negative opportunistic pathogens *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* (diameters of growth retardation zones for the composite drug of the corresponding name was 17.68 ± 0.45 mm, 14.50 ± 0.29 mm, 13.20 ± 0.25 mm versus 17.29 ± 0.41 mm, 14.55 ± 0.11 mm, 14.60 ± 0.31 mm for decamethoxine, respectively). In all these cases, the results of antimicrobial activity of the test composition did not differ significantly from that for the antiseptic solution of the corresponding name ($p > 0.05$). Less pronounced effect of the studied complex sorption drug and decamethoxine was found to *Pseudomonas aeruginosa* (14.50 ± 0.29 mm and 14.55 ± 0.11 mm, respectively) and *Proteus vulgaris* (13.20 ± 0.25 mm and 14.60 ± 0.31 mm, respectively) where significant differences were also not found ($p > 0.05$).

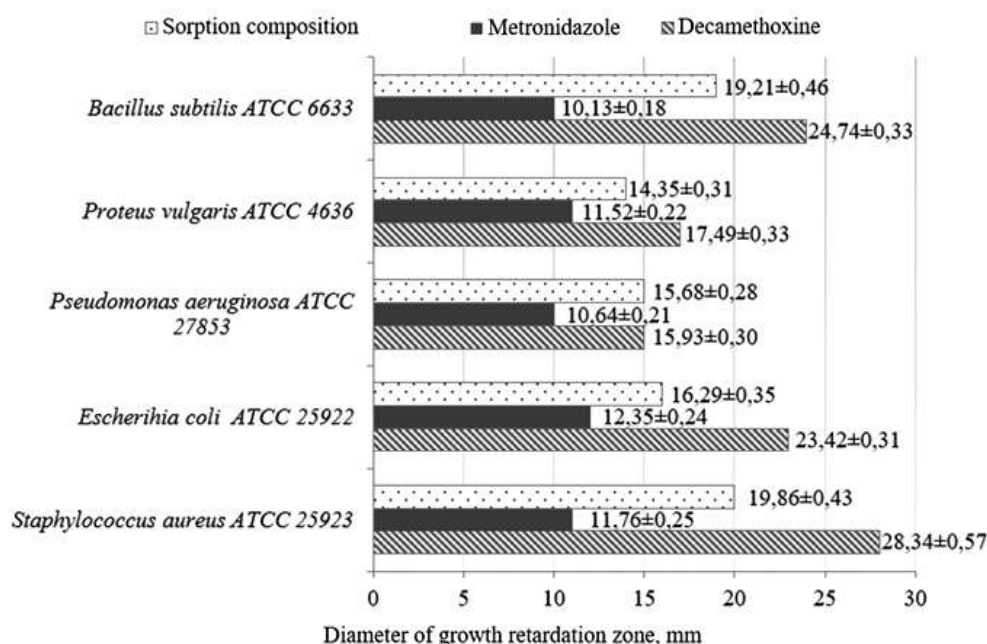


Fig. 1. The characteristics of antimicrobial activity of the tested drugs against museum strains of microorganisms by the results of agar diffusion method (n = 6)

With regard to anaerobic opportunistic pathogens, all studied samples presented high antimicrobial activity without a significant difference concerning *Peptostreptococcus anaerobius* and *Bacillus fragilis* ($p > 0.05$). Moreover, significant antibacterial properties of the suggested sorption drug and decamethoxine were established, which delayed the growth of *Bacillus subtilis* in the amount of $18,14 \pm 0,34$ mm and $22,86 \pm 0,51$ mm, significantly exceeding the indicators of metronidazole ($10,29 \pm 0,18$ mm).

The antifungal properties of composite, moderately inferior to the antimicrobial action of decamethoxine concerning *Candida albicans*, were at a sufficiently high level and statistically significantly exceeded the fungal activity of metronidazole almost in half ($p \leq 0.01$) (table 1).

Objective examination of the wound surface in the period after radical necrectomy and xenodermoplasty during dressing changes with local use of antimicrobial drugs determined the remains of necrotic tissues, wound secretions, the amount of which decreased in dynamics with the subsequent formation of granulation tissue. At the same time, in patients of the study group, whose lo-

cal treatment involved the use of sorption nanocomposition, the processes of wound cleaning from pathological layers proceeded much faster with less manifestations of inflammatory reaction both in the area of injury and in surrounding tissues. This, in turn, contributed to faster preparation of wounds for closure with skin grafts in comparison with patients whose treatment only included topical use of antiseptic solution of decamethoxine (table 2). Moreover, the effectiveness of surgical closure of postoperative wounds in patients of the main group was significantly higher with a larger area of engraftment of transplanted skin grafts.

According to the results of microbiological examination of the wound surface on the 3rd day of observation, a similar microbial landscape was established, which was mainly represented by associations of microorganisms dominated by *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, the number of which in the wound content was expressed in decimal logarithms and amounted to $\lg(6,3 \pm 0,5)$ CFU/ml and $\lg(6,6 \pm 0,2)$ CFU/ml in the main group and the comparison group, respectively. As a result of additional use of

Table 1

Antimicrobial activity of the tested drugs against clinical strains of microorganisms by agar diffusion method

Microbial cultures	Number of clinical strains	Diameter of growth retardation zone, mm		
		Sorption composition	Decamethoxin	Metronidazole
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	19,37±0,24**	27,37±0,23	10,29±0,10
<i>Escherihia coli</i>	26	17,00±0,21*	21,85±0,15	10,19±0,12
<i>Acinetobacter baumannii</i>	23	17,68±0,45*	17,29±0,41	10,61±0,17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	14,50±0,29*	14,55±0,11	10,20±0,16
<i>Proteus vulgaris</i>	10	13,20±0,25*	14,60±0,31	10,00±0,15
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	8	19,75±0,59	20,50±0,50	22,25±0,75
<i>Bacillus fragilis</i>	8	19,63±0,38	20,00±0,57	22,00±0,57
<i>Bacillus subtilis</i>	7	18,14±0,34**	22,86±0,51	10,29±0,18
<i>Candida albicans</i>	16	19,38±0,30**	25,38±0,30	10,19±0,25

Note: * – reliable difference ($p \leq 0.05$) between this indicator and the indicator determined for decamethoxine;
 * – reliable difference ($p \leq 0.01$) between this indicator and the indicator determined for metronidazole

Table 2

Clinical criteria for wound process course in the studied patients

Clinical criteria, day	Group of patients	
	Main group	Comparison group
Normalization of body temperature	5,9±0,19*	10,4±0,21
Subjective reduction of pain intensity	7,7±0,25*	12,7±0,23
Cleaning the wound from pathological layers	8,3±0,19*	11,5±0,14
Appearance of granulation tissue	4,8±0,21*	7,2±0,27
Performing primary skin grafting	9,7±0,18*	13,5±0,21
Wound healing	31,9±0,62*	37,3±0,58

Note: * – reliable difference between the indicators in the studied groups ($p \leq 0.01$)

sorption materials, an effective decrease in the value of total microbial count in the wound was found but without statistical reliability. Thus, up to 14 days the quantitative content of microorganisms on the wound surface did not exceed $\lg(3,8 \pm 0,3)$ CFU/ml, while in the comparison group this rate was $\lg(4,3 \pm 0,6)$ CFU/ml ($p > 0.05$).

For instance, patient Z. of the main group, at the age of 51, received an inpatient card № 3262 in the burn department of the Clinical Center for Thermal Injury and Plastic Surgery of the non-profit utility enterprise «Vinnytsia Regional Pirogov Clinical Hospital of Vinnytsia Regional Council» on March 23, 2018 at 13:45 with the diagnosis «Burn disease, stage of severe burn shock. Flame burn of the IIab-III degree, 30 % of lower extremities». Case history indicated that he was injured by flames at home about 12 hours before admittance due to careless use of flammable fuel substances near an open

fire. First pre-hospital aid was provided immediately applying moistened napkins to visible burnt areas. Within 1 hour he was taken to the non-profit utility enterprise «Teplyk Central Regional Hospital» of Teplyk District Council by ambulance where the neutralization of the thermal agent was continued, central venous access was established, infusion therapy was started, and necrotomy was performed.

On the 3rd day after the injury, an electric anaemic necrectomy was performed on the entire surface of the burn injury with the closure of postoperative wound surface with lyophilized xenodermografts. Subsequently, dressing changes were performed daily with the application of an antiseptic 0.02% solution of decamethoxine, application of the sorption nanocomposition and closure of the wound area with a gauze bandage impregnated with the antiseptic of the corresponding name (Fig. 2).



Fig. 2. Patient Z., 51 years old, inpatient card № 3262, 7th day after the injury. The wound is treated with a 0.02% solution of decamethoxine (a), the nanocomposition sorption agent (b) application of a gauze napkin impregnated with the antiseptic of the corresponding name (c)



Fig. 3. Patient Z., 51 years old, inpatient card № 3262, before home discharge, 27th day

On the 10th day after the injury the wounds were filled with granulation tissue without necrotic tissues and pathological secretions, which made it possible to perform their surgical closure with skin grafts. 27 days after the injury the wounds healed with a complete skin grafts engraftment. The patient was discharged under supervision of doctors to the place of residence (Fig. 3).

A similar nature of injuries occurred in patient K. from the comparison group, 41 years old, inpatient card № 22863, who was hospitalized at the Clinical Center on November 21, 2019, 16 hours after the injury. Diagnosis: «Burn disease, stage of severe burn shock. Burns of the IIab-III degree, 28 % of lower extremities».

The traumatic mechanism and the amount of care provided were similar. After early necrectomy and xenoplasty on the 3rd day dressing changes were performed with antiseptic 0.02% decamethoxine solution. Unlike the previous patient, the process of cleaning wounds from necrotic tissues and pathological contents took much longer. Granulation tissue, color and structure of which differed qualitatively from that of the patients in the main group, formed more slowly, signs of inflammation persisted for a long time. Due to this, surgical closure of the wounds became possible only on the 15th day after the injury.

Subsequently, the patient underwent additional gradual skin grafting and healing occurred only 35 days later.

The search for effective treatment of burns has continued for many years [10]. Since the ancient times, means for local application, which still remain an important component of a comprehensive program of health care for patients with similar injuries, are mentioned as available materials. One of the first documented memoirs of treating patients with burn injuries can be found in Egyptian papyri dating back to 1600 BC, which contain information on balms based on natural resins, honey and other similar means [11]. Subsequent historical references tended to the empirical choice of means of natural origin, which mainly depended on ethnic and territorial features. A significant impetus in the formation of new approaches occurred during the XVIII-XIX centuries, when there was rapid scientific progress in understanding the peculiarities of the wound process in burns [12]. The initial goal in topical treatment was to «dry» the wound to create a protective layer of dry necrosis and reduce the permeability of toxins to the vascular bed. Thus, numerous sprays and ointments appeared, the choice of which depended on the condition of the wounds and the stage of the wound process [13]. Hydrophilic ointments based on polyethylene glycole of different molecular mass became especially widespread in the XX century, which allowed to combine several active agents at the same time, deliberately giving them the necessary properties regulating the direction and intensity of diffusion.

At the same time, the direction of efferent therapy appears and actively develops – various sorbents, which

differ in chemical nature, method of their production: activated charcoal, ion-exchange resins, silicon, polymeric materials [14]. Radical change in the treatment strategy for patients with burn injuries (early active surgical tactics, use of «wet chamber» principles, etc.) helped to reconsider the feasibility of using certain groups of drugs, the necessity to find new and improve existing ones. Thus, a number of drugs with adsorption action appeared capable of keeping adsorbed substances on the verge between liquid and solid phases. Scientists developed a new composite drug based on highly dispersed silicon dioxide with immobilized antimicrobial substances on its surface – antiseptics, antibiotics capable of prolonged diffusion into the wound. The original nanocomposition sorption agent with antimicrobial properties on the basis of nanosilica, which is successfully used for application in purulent inflammatory diseases of different localization, has gained wide popularity [15].

The results of microbiological study of antimicrobial properties in «in vitro» experiments have established the ability of the drug to act on various pathogenic microorganisms, inhibiting the development of even anaerobic forms. A significant advantage of the drug is the ability to adversely affect the biofilm-forming properties of microorganisms, which was found in the example of clinical strains of *Staphylococcus aureus* 8 and *Pseudomonas aeruginosa* 24 even after 48 hours of observation.

Known sorption and confirmed high antimicrobial figures of sorption hydrophilic/hydrophobic composition indicate the prospects of its use in patients with burn injuries, which became the ground for its clinical use in the local treatment of wounds after necrotomy in preparation for skin grafting. The obtained results allowed to clearly establish the positive effect of composition on the processes of wound cleaning from necrotic tissues, excessive pathological secretions, reduction of microbial contamination, signs of inflammatory reaction, while contributing to the formation of granulation tissue. In general, this allowed to improve the condition of patients, the results of skin grafting, the rate of epithelialization of wound defects and significantly reduce the duration of inpatient treatment.

CONCLUSIONS

The results of studies «in vitro» convincingly indicate high antimicrobial activity of sorption hydrophilic/hydrophobic composition based on nanosilica, polymethylsiloxane, decamethoxine, metronidazole. Proven antimicrobial ability of the drug to anaerobic flora is a special value of this drug.

Clinical efficacy of topical use of this sorption composition with an antiseptic solution of decamethoxine is confirmed by the results of rapid preparation of postoperative burn injuries for skin grafting with a high level of engraftment and a significant reduction in the length of bed rest.

Acknowledgment. We express our gratitude to the administration of Vinnytsya National Pirogov Medical University headed by the rector, academician of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, professor Moroz V.M., director of Municipal Non-profit Enterprise «Vinnytsya Regional Clinical Hospital Vinnytsya Regional Council» Zhupanov O.B. in supporting and facilitating the study.

Conflict of interest. The authors declares that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, Chan RK, Christy RJ, Chung KK. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care*. 2015 Jun 12;19:243. DOI: 10.1186/s13054-015-0961-2. View at: Publisher Site: <http://ccforum.com/content/19/1/243> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26067660/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464872/>
- Singh A, Bhatnagar A. Management of Superficial Partial Thickness Burn With Collagen Sheet Dressing Compared With Paraffin Gauze And Silver Sulfadiazine. *Ann Burns Fire Disasters*. 2020 Sep 30;33(3):233-8. View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33304214/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7680202/>
- Nagaichuk VI. [Modern approaches to assistance patients with burns]. *State of art technology and medication*. 2010;5(71):24-7. [in Ukrainian]. View at: URL: <https://www.health-medix.com/articles/mistetzvo/2010-05-27/10VINHZO.pdf>
- Vigani A, Culler CA. Systemic and Local Management of Burn Wounds. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017 Nov;47(6):1149-63. DOI: 10.1016/j.cvsm.2017.06.003. View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561617300645?via%3Dihub> Publisher Site: [https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616\(17\)30064-5/abstract](https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616(17)30064-5/abstract) PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28802983/>
- Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *J Burn Care Res*. 2017 Jan/Feb;38(1):e469-e481. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000355. View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/jbcr/article/38/1/e469/4568966> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27183443/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5214064/>
- Elmassry MM, Mudaliar NS, Colmer-Hamood JA, San Francisco MJ, Griswold JA, Dissanaik S, Hamood AN. New markers for sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* during burn infection. *Metabolomics*. 2020 Mar 13;16(3):40. DOI: 10.1007/s11306-020-01658-2. View at: Scopus: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11306-020-01658-2> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32170472/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7223005/>
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 1;49(11):1749-55. DOI: 10.1086/647952. View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/cid/article/49/11/1749/344384> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19857164/>
- Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jul;26(3):526-46. DOI: 10.1128/CMR.00086-12. View at: Publisher Site: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00086-12> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23824372/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719496/>
- Shelkova N, Prokopets V. [Quantitative research method of maintenance of bacteria in clinical species which are selected by waddin tampon]. *Collection of scientific works of staff member of P.L. Shupyk NMAPE*. 2009;17(2):698-702. [in Ukrainian]. View at: URL: <https://scholar.google.ru/citations?user=z8jOGMAAAAJ&hl=uk>
- Hamblin MR. Novel pharmacotherapy for burn wounds: what are the advancements. *Expert Opin Pharmacother*. 2019 Feb;20(3):305-321. DOI: 10.1080/14656566.2018.1551880. View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14656566.2018.1551880?journalCode=ieop20> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30517046/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6364296/>
- Artz CP. Historical aspects of burn management. *Surg Clin North Am*. 1970;50:1193-200. DOI: 10.1016/s0039-6109(16)39279-9. View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039610916392799?via%3Dihub> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4922817/>
- Lee KC, Joory K, Moiemens NS. History of burns: The past, present and the future. *Burns & Trauma*. 2014 Oct 25;2(4):169-80. DOI: 10.4103/2321-3868.143620. View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/burnstrauma/article/2/4/2321-3868.143620/5650557> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27574647/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4978094/>

13. Barillo DJ. Topical antimicrobials in burn wound care. A recent history of wounds. *Wounds*. 2008;20:192-8. View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25942608/> Europe PMC: <https://europepmc.org/article/med/25942608>
14. Chernyakova GM, Minukhin VV, Voronin EP, Minukhin DV, Krasnoyarskiy AG, Efimov DS, Ponomaryova KV. [Substantiation for antimicrobial efficacy of applicational bionanocomposites in the treatment of the burn infection, caused by *S.aureus* and *P.aeruginosa*]. *Klinicheskaia khirurgiia*. 2017;12:48-51. [in Ukrainian]. DOI: 10.26779/2522-1396.2017.12.48 View at: Publisher Site: <https://hirurgiya.com.ua/index.php/journal/article/view/307> URL: <https://hirurgiya.com.ua/index.php/journal/article/view/307/20>
15. Suleimanova VG, Shaprynskiy VO, Kryvetskiy VF, Nasr Zaki Nageeb, Hmelevska TA. Treatment of cervical necrotizing fasciitis, complicated by mediastinitis, on patient with hypoergic immune response. *Hospital Surgery. Journal named by L.Ya. Kovalchuk*. 2017;1:101-5. [in Ukrainian]. DOI: 10.11603/2414-4533.2017.1.6731 View at: Publisher Site: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/surgery/article/view/6731> URL: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/surgery/article/view/6731/7236>

Article history
Received: 04.05.2021
Revision requested: 20.06.2021
Revision received: 21.08.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

КЛІНІКО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ ГІДРОФІЛЬНО-ГІДРОФОБНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ НАНОКРЕМНЕЗЕМУ ПРИ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ З ОПІКАМИ

¹Чорнопищук Р.М., ¹Нагайчук В.І., ²Геращенко І.І., ¹Назарчук О.А., ³Сидоренко С.А.,
¹Чепляка О.М., ⁴Сидоренко Л.А.

¹Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, Україна

²Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ, Україна

³Реабілітаційний центр, Валенс, Швейцарія

⁴Державний університет медицини та фармації ім. М. Тестеміцану, Кишинів, Республіка Молдова

r.chornopyschchuk@gmail.com

Актуальність. Одним з перспективних методів лікування хворих з опіками розглядається місцеве використання сорбційних препаратів з антимікробними властивостями, яке потребує подальшого вивчення.

Ціль: експериментальне вивчення антимікробних властивостей та клінічна оцінка ефективності місцевого використання нового композиційного сорбційного препарату на основі нанорозмірного кремнезему при комплексному лікуванні хворих з опіками.

Матеріали та методи. До складу запропонованої сорбційної нанокомпозиції ввійшли високодисперсний кремнезем, поліметилсилоксан, декаметоксин, метронідазол.

Експериментальне дослідження передбачало вивчення антимікробних властивостей сорбційної композиції та антимікробних засобів, які входять до її складу.

Дослідження «in vivo» передбачало обстеження 42 пацієнтів з опіками Паб-III ступеня, площею 10-30% поверхні тіла. Залежно від тактики місцевого лікування, пацієнти були поділені на 2 групи: у хворих основної групи (n=20) після ранньої некректомії, ксенодермопластики ранову поверхню обробляли розчином декаметоксину у поєднанні з однойменним сорбційним порошком. Лікування пацієнтів групи порівняння (n=22) було подібним, однак без використання сорбційних препаратів. Обстеження передбачало візуальний контроль ушкодженої ділянками у поєднанні з мікробіологічним моніторингом ранового вмісту на 3, 7, 14 добу.

Результати. Отримані результати підтвердили достатню антимікробну активність досліджуваної сорбційної нанокомпозиції, за якою вона не поступається існуючим антисептичним засобам, щодо музейних та клінічних штамів мікроорганізмів і грибів.

Підтвердженням ефективності сорбційного препарату стали ознаки сприятливішого перебігу ранового процесу у хворих основної групи, що проявлялося швидшим очищенням ран, меншими проявами запальної реакції і значно коротшими термінами підготовки ран до аутодермопластики, забезпечуючи стабільний антимікробний ефект.

Висновки. Отримані результати переконливо вказують на ефективність багатокomпонентного препарату на основі нанокремнезему з антимікробними наповнювачами. Доцільним буде рекомендувати місцеве застосування подібного препарату у комплексній програмі лікування хворих з опіками.

Ключові слова: опіки, рановий процес, інфекція, антисептики, сорбенти.

КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГИДРОФИЛЬНО-ГИДРОФОБНОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ НАНОКРЕМНЕЗЕМА ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ОЖОГАМИ

*¹Чернопищук Р.Н., ¹Нагайчук В.И., ²Герашченко И.И., ¹Назарчук А.А., ³Сидоренко С.А.,
¹Чепляка А.Н., ⁴Сидоренко Л.А.*

¹Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Винница, Украина

²Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, Киев, Украина

³Реабилитационный центр, Валенс, Швейцария

⁴Государственный университет медицины и фармации им. Н. Тестемицану, Кишинёв, Республика Молдова

r.chornopyschuk@gmail.com

Актуальность. Одним из перспективных методов лечения больных с ожогами считается местное использование сорбционных препаратов с антимикробными свойствами, которое требует дальнейшего изучения.

Цель: экспериментальное изучение антимикробных свойств и клиническая оценка эффективности местного применения нового композиционного сорбционного препарата на основе наноразмерного кремнезема при комплексном лечении больных с ожогами.

Материалы и методы. В состав предлагаемой сорбционной наноконпозиции вошли высокодисперсный кремнезем, полиметилсилоксан, декаметоксин, метронидазол.

Экспериментальное исследование предусматривало изучение антимикробных свойств сорбционной композиции и антимикробных средств, которые входят в ее состав.

Исследование «in vivo» предусматривало обследование 42 пациентов с ожогами IIa-III степени, площадью 10-30% поверхности тела. В зависимости от тактики местного лечения пациенты были разделены на 2 группы: у больных основной группы (n=20) после ранней некрэктомии, ксенодермопластики раневую поверхность обрабатывали раствором декаметоксина в сочетании с одноименным сорбционным порошком. Лечение пациентов группы сравнения (n=22) было подобным, однако без использования сорбционных препаратов. Обследование предусматривало визуальный контроль поврежденных участков в сочетании с микробиологическим мониторингом раневого содержимого на 3, 7, 14 сутки.

Результаты. Полученные результаты подтвердили достаточную антимикробную активность исследуемой сорбционной наноконпозиции, согласно которым она не уступает существующим антисептическим средствам.

Подтверждением эффективности сорбционного препарата стали признаки благоприятного течения раневого процесса у больных основной группы, что проявлялось более быстрой очисткой ран, меньшими проявлениями воспалительной реакции, обеспечивая стабильный антимикробный эффект.

Выводы. Полученные результаты убедительно указывают на эффективность многокомпонентного препарата на основе нанокремнезема с антимикробными наполнителями. Целесообразным будет рекомендовать местное применение подобного препарата в комплексной программе лечения больных с ожогами.

Ключевые слова: ожоги, раневой процесс, инфекция, антисептики, сорбенты.

**ЕКОЛОГО-ГІГІЄНИЧНА ОЦІНКА НОВИХ ПЕСТИЦИДІВ
ДЛЯ ХІМІЧНОГО ЗАХИСТУ ЗЕРНОВИХ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР**

Кориун М.М. <https://orcid.org/0000-0002-0204-8281>
Мартіянова Ю.В. <https://orcid.org/0000-0002-9609-2717>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

ulia.martianova@gmail.com

Актуальність. Використання пестицидів у народному господарстві для знищення чи пригнічення росту шкідливих рослин та захисту сільськогосподарських культур від збудників хвороб передбачає обов'язкову оцінку їх еколого-гігієнічної небезпечності.

Ціль: оцінка небезпечності трьох нових пестицидів для захисту зернових злакових культур: амікарбазону з хімічного класу триазолонових сполук, біциклопірону з класу трикетонів і підіфлуметофену з класу карбоксамідів, за показниками екотоксичності та поведінки у довкіллі.

Матеріали та методи. Оцінку небезпечності досліджуваних пестицидів здійснили на підставі даних джерел інформації про їх фізико-хімічні властивості, параметри токсикометрії для різних видів живих організмів та поведінку у навколишньому середовищі. Для інтегральної оцінки потенційної небезпечності для наземних екосистем було розраховано екотокс з врахуванням токсичності для ссавців, персистентності та максимальної норми витрати. Для виявлення лімітуючої ланки міграції здійснено математичне моделювання в системах «грунт – вода», «грунт – рослини» та «грунт – атмосферне повітря».

Результати. Встановлено, що амікарбазон є надзвичайно токсичним для водоростей та високотоксичним для вищих водних рослин (ВВР) (I клас небезпечності), середньотоксичним (IV клас) для ссавців, слабботоксичним (III клас) для птахів, ґрунтової мезофауни та безхребетних, практично нетоксичним для бджіл та риб; біциклопірон – надзвичайно токсичний для ВВР (I клас) та середньотоксичний (II клас) для найбільш чутливих водоростей, слабботоксичний (III клас) для птахів, риб та безхребетних та практично нетоксичний для інших представників наземної фауни; підіфлуметофен є високотоксичним (I клас) для риб та безхребетних, середньотоксичним (II клас) як для водоростей, так і для ВВР, практично не токсичним для всієї наземної біоти. Доведено, що підіфлуметофен – високостійкий та мало мобільний у ґрунті; амікарбазон – стійкий та мобільний; біциклопірон – високостійкий в лабораторних експериментах та помірно стійкий в польових дослідах, його рухливість коливається у широкому діапазоні: від дуже мобільного до мало мобільного в окремих ґрунтах. Небезпечність для наземних біоценозів усіх досліджуваних пестицидів за різних ґрунтово-кліматичних умов є нижчою на (1-5) порядків у порівнянні з високостійким ДДТ; найнижчою є екотоксичність біциклопірону, найвищою – підіфлуметофену. Усі досліджувані речовини є високостійкими у воді. Провідною ланкою їх міграції у довкіллі є система «грунт – вода водоєм» та у разі підіфлуметофену – також «грунт – рослини».

Ключові слова: пестициди, екотоксичність, стабільність, міграція, оцінка небезпечності.

Актуальність. Серед різноманітних хімічних речовин, що застосовуються в народному господарстві, пестициди займають особливе місце, оскільки вони призначені для знищення та обмеження розвитку шкідливих живих організмів – бур'янів, комах, збудників хвороб рослин тощо. Саме таке цільове призначення робить хімічні засоби захисту рослин (ХЗЗР) потенційно небезпечними для здоров'я населення, стану довкілля, численних видів корисної флори та фауни. Ключовими поняттями в регулюванні обігу ХЗЗР є: безпека, під якою розуміють здатність пестициду чинити негативний вплив на здоров'я людини і навколишнє природне середовище, та ризик – ймовірність виникнення шкідливих для здоров'я і довкілля ефектів в реальних умовах виробництва або використання отрутохімікату. Тому в процесі державної реєстрації нових пестицидів, поряд з оцінкою ризиків для здоров'я людини, передбачена й обов'язкова оцінка їх еколого-гігієнічної небезпечності.

Ціль: оцінка небезпечності трьох нових пестицидів для захисту зернових злакових культур: амікарбазону з хімічного класу триазолонових сполук,

біциклопірону з класу трикетонів і підіфлуметофену з класу карбоксамідів, за показниками екотоксичності та поведінки у довкіллі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктами дослідження були токсичність для живих організмів (ссавців, птахів, бджіл, водних організмів тощо) та поведінка у навколишньому середовищі (стійкість у ґрунті та воді, рухливість в системі «грунт – суміжні середовища», біоаккумуляція) досліджуваних пестицидів. Оцінку небезпечності амікарбазону, біциклопірону та підіфлуметофену здійснили на підставі даних джерел інформації про їх фізико-хімічні властивості, параметри токсикометрії для різних видів живих організмів і поведінку в ґрунті; встановлення класу небезпечності – згідно з міжнародними та національною класифікаціями.

Оскільки небезпечність отрутохімікатів для біоти пов'язана не лише з їх токсичністю для живих організмів, а й з їх персистентністю у довкіллі та нормами витрати у сільському господарстві, для оцінки ризи-

ку шкідливого впливу усіх досліджуваних речовин на наземні біоценози визначили їх екотоксичність (екотокс) за методикою [1]. При цьому врахували мінімальний та максимальний періоди напівруйнування (DT_{50}) речовини у різних ґрунтах в лабораторних та польових умовах, найменшу середню смертельну дозу (LD_{50}) за перорального надходження речовини в організм білих щурів та максимальну норму витрати з врахуванням регламентованої кратності обробок (амікарбазону – 0,14 кг/га, біциклопірону – 0,15 кг/га, підіфлуметофену – 0,36 кг/га). Екотокс дозволяє порівняти екотоксичність досліджуваної речовини та високостійкого хлорорганічного інсектициду дихлордифенілтрихлорметилметану (ДДТ), екотоксикологічну небезпечність якого, при персистентності – 312 тижнів, LD_{50} – 300 мг/кг і нормі витрати – 1 кг/га, прийнято за одиницю екотоксу.

Прогнозування лімітуючої ланки міграції досліджуваних пестицидів з ґрунту в суміжні середовища здійснили шляхом математичного моделювання міграції в системах «ґрунт – вода» та «ґрунт – рослини» у відповідності до рівнянь, наведених у [2–5]. Для моделювання процесу міграції з ґрунту в атмосферне повітря визначили максимально досягнути концентрацію кожної сполуки в повітрі за рівнянням Менделєєва-Клапейрона [6], враховуючи молярну масу речовини (мг/моль) та тиск її насиченої пари (мм рт. ст.).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За механізмом дії на шкідливі організми гербіциди амікарбазон та біциклопірон належать до інгібіторів фотосинтезу та 4-гідроксифенілпіруват-діоксигенази рослин, відповідно, фунгіцид підіфлуметофен – до інгібіторів сукцинатдегідрогенази фітопатогенів [7]. Препарати на основі амікарбазону та біциклопірону рекомендовані для захисту посівів кукурудзи; для інших сільськогосподарських культур вони фітотоксичні. Препарати на основі підіфлуметофену запропоновані для боротьби із хворобами хлібних зернових (пшениці та ячменю озимих та ярих) та зернобобових (соя) культур.

Моделним видом тварин при оцінці небезпечності пестицидів для ссавців є щури, оціночним критерієм – LD_{50} при введенні у шлунок, за якою пестициди поділяють на надзвичайно токсичні (I клас небезпечності, $LD_{50} \leq 5$ мг/кг), дуже високотоксичні (II клас, $> 5 - 50$), високотоксичні (III клас, $> 50 - 300$), середньотоксичні (IV клас, $> 300 - 2000$), слаботоксичні (V клас, $> 2000 - 5000$) та практично нетоксичні (> 5000) [8]. Встановлено (табл. 1), що амікарбазон є середньотоксичним (IV клас), біциклопірон та підіфлуметофен – практично нетоксичні для ссавців.

Небезпечність ХЗЗР оцінюють: для птахів – за LD_{50} для представницького тестового виду – віргінської перепелиці (*Colinus virginianus*) [13]; для корисних комах – за контактною токсичністю для тестового виду – медоносних бджіл (*Apis mellifera*) [13]; для ґрунтової мезофауни – за середньою смертельною концентрацією (LC_{50}) для тестового виду – дощових черв'яків (*Eisenia foetida*) [14]. За гострою токсичністю для птахів, бджіл та дощових черв'яків пестициди поділяють на 5 класів токсичності і 3 класи небезпечності (табл. 2).

Дані, представлені у таблиці 1, дозволяють віднести амікарбазон та біциклопірон за гострою токсичністю для птахів до слаботоксичних (III клас), підіфлуметофен – до практично нетоксичних пестицидів. Усі досліджувані речовини за контактною токсичністю для бджіл є практично нетоксичними. Для ґрунтової мезофауни амікарбазон є слаботоксичним (III клас), підіфлуметофен та біциклопірон – практично нетоксичними пестицидами.

Інтегральна оцінка екотоксикологічної небезпечності за методикою [1] показала, що за різних ґрунтово-кліматичних умов екотокси досліджуваних пестицидів є нижчим на (1-5) порядків у порівнянні з ДДТ; найнижчою є екотоксичність біциклопірону, найвищою – підіфлуметофену, що зумовлено його надповільною деградацією у довкіллі (табл. 3). До того ж, екотокси сучасних гербіцидів біциклопірону та амікарбазону, визначені з урахуванням найвищої персистентності у ґрунті в польових дослідженнях,

Таблиця 1

Параметри токсичності досліджуваних пестицидів для наземних організмів

Діюча речовина	Джерело інформації	Ссавці, LD_{50} , мг/кг	Птахи, LD_{50} , мг/кг	Медоносні бджоли, LD_{50} , мкг/бджолу	Дощові черви, LC_{50} , мг/кг
Амікарбазон	[7]	1015	1965	–	–
	[9]	≈1200	> 2000	> 200	931
Біциклопірон	[7]	> 5000	–	780	–
	[10]	> 5000	1206	>200	> 1000
Підіфлуметофен	[7]	> 500	3776	–	> 1000
	[11]	> 5000	–	>100	–
	[12]	> 5000	3776	–	–

Примітка: Знак «–» означає відсутність інформації.

Класифікація пестицидів за гострою токсичністю для птахів [13], медоносних бджіл [13], дощових черв'їв [14] та водних організмів [18]

Клас небезпечності	Клас токсичності	Птахи, LD ₅₀ , мг/кг	Медоносні бджоли, LD ₅₀ , мкг/бджолу	Дощові черви, LC ₅₀ , мг/кг	Водні організми, LC ₅₀ /EC ₅₀ , мг/дм ³
I	Надзвичайно токсичні	≤ 10	≤ 0,1	≤ 1	≤ 0,1
	Високотоксичні	> 10-50	> 0,1-1	> 1-10	> 0,1-1
II	Середньотоксичні	> 50-500	> 1-10	> 10-100	> 1-10
III	Слаботоксичні	> 500-2000	> 10-100	> 100-1000	> 10-100
Не класифікується	Практично нетоксичні	> 2000	> 100	> 1000	> 100

Таблиця 3

Фізико-хімічні властивості та показники поведінки досліджуваних речовин у ґрунті та суміжних середовищах [7, 9-12, 16, 17]

Показник, одиниці вимірювання Амікарбазон		Діюча речовина		
		Біциклопірон	Підіфлуметофен	
Молекулярна маса		241,29	399,36	426,67
Період напівруйнування у ґрунті (DT ₅₀) min – max, доба	ЛУ	14-87	19,8-434	84-4170
	ПУ	4-87	1,7-36	29-8540
Екотокс (E)*, у.о.	ЛУ	$\frac{2,76 \times 10^{-4}}{1,71 \times 10^{-3}}$	$\frac{8,48 \times 10^{-5}}{1,86 \times 10^{-3}}$	$\frac{8,64 \times 10^{-4}}{4,29 \times 10^{-2}}$
	ПУ	$\frac{7,88 \times 10^{-5}}{1,71 \times 10^{-3}}$	$\frac{7,28 \times 10^{-6}}{1,54 \times 10^{-4}}$	$\frac{2,95 \times 10^{-4}}{8,78 \times 10^{-2}}$
K _{oc} min – max, мл/г		16,7-44	6-500	1165-3808
Період напіврозпаду у воді (T ₅₀), доба	Гідроліз	64	>365	>365
	Система «вода-осад»	116	681	662
Тиск насиченої пари	мПа (при температурі, °С)	$3,0 \times 10^{-3}$ (25)	$25 \text{ C } 5 \times 10^{-3}$ (25)	$1,84 \times 10^{-4}$ (20)
	мм рт. ст.	$2,25 \times 10^{-8}$	$3,75 \times 10^{-8}$	$1,38 \times 10^{-9}$
Константа Генрі, Па·м ³ ·моль ⁻¹		$6,78 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-8}$	$1,05 \times 10^{-4}$

Примітки: 1. ЛУ – лабораторні умови, ПУ – польові умови; 2. * – результати власних розрахунків; в чисельнику – мінімальне значення, в знаменнику – максимальне значення.

були нижчими, ніж у гербіцидів попередніх поколінь: сим-триазинів (атразину, пропазину, симазину) та шестичленних гетероциклів (бентазону, метрибузину) [15].

Небезпечність досліджуваних пестицидів для водних організмів оцінена за гострою токсичністю [18]. Як критерії, використані: для риб – середня смертельна концентрація (LC₅₀) при 96-годинному впливі для райдувної форелі (*Oncorhynchus mykiss*); для безхребетних – концентрація, що пригнічує ріст *Daphnia magna* на 50 % (EC₅₀) за 48 годин; для водоростей – EC50 для зелених водоростей (*Pseudokirchneriella subcapitata*) при 72- або 96-годинній дії; для вищих водних рослин (ВВР) – концентрація, що пригнічує ріст біомаси ряски горбатой (*Lemna gibba*) на 50 % (EC50) за 7 діб. Класифікація наведена в таблиці 2.

Встановлено (табл. 4), що фунгіцид підіфлуметофен є найтоксичнішим для риб та безхребетних (I клас небезпечності); біциклопірон – слаботоксичний (III клас); амікарбазон для безхребетних – слаботоксичний (III клас), для риб – практично нетоксичний. Водночас для водоростей та ВВР небезпечнішими є гербіциди: амікарбазон – надзвичайно токсичний для водоростей та високотоксичний для ВВР (I клас); біциклопірон – надзвичайно токсичний для ВВР (I клас) та середньотоксичний (II клас) для найчутливіших водоростей; підіфлуметофен – середньотоксичний (II клас) і для водоростей, і для ВВР.

Основними процесами, що обумовлюють розподіл діючої речовини пестициду в довкіллі після його застосування, є: руйнування (деструкція), сорбція, вилуговування, випаровування, поглинання живими організмами.

Параметри токсичності досліджуваних пестицидів для водних організмів

Діяча речовина	Джерело інформації	Риби, LC50, мг/л	Безхребетні, EC50, мг/л	Водорості, EC50, мг/л	Вищі рослини, EC50, мг/л
Амікарбазон	[7]	> 120	> 40,8	–	0,21
	[9]	> 100	41	0,035	–
Біциклопірон	[7]	46,9	46,7	–	0,013
	[10]	93	>93,3	5,9-94,8	0,073
Підіфлуметофен	[7]	0,18	0,42	> 5,9	> 6,3
	[11]	0,18	<1	–	–
	[12]	0,18-0,66	0,42-4,65	1,5 - > 5,9	> 6,3

Примітка: Знак «–» означає відсутність інформації.

За даними, наведеними у таблиці 3, найвищу стабільність у різних ґрунтово-кліматичних умовах має підіфлуметофен, який є високостійким (I клас за ДСП 8.8.1.2.002-98 «Гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпечності») та класифікацію [7]) як в лабораторних, так і в натурних умовах. Найшвидше деградує у ґрунті амікарбазон, який, як в лабораторних, так і в польових дослідках, за класифікацію [7] можна віднести до помірно стійких (III клас) пестицидів, але за ДСП 8.8.1.2.002-98 – до високостійких (I клас небезпечності). Біциклопірон є високостійким (I клас за обома класифікаціями) в лабораторних експериментах та помірно стійким (III клас) – в польових дослідках.

Міграційну здатність досліджуваних пестицидів оцінювали за коефіцієнтом сорбції, скорегованим на вміст органічного вуглецю у ґрунті (Koc), згідно з класифікацією SSLRC (Soil Survey and Land Research Centre) [7]. Відповідно до даних, що наведені у таблиці 3, амікарбазон – мобільний (II клас); підіфлуметофен – маломобільний (IV клас), біциклопірон – залежно від типу ґрунту від дуже мобільний (I клас) до маломобільний (IV клас) в окремих ґрунтах.

За персистентністю у воді (табл. 3) усі три досліджувані пестициди є високостійкими (I клас небезпечності) як при гідролізі у нейтральному буферному розчині (рН 7, температура 20 °С), так і у системі «вода – осад», згідно як з ДСП 8.8.1.2.002-98, так і з класифікацією, що наведена у [7].

Важливою характеристикою пестициду з еколого-гігієнічних позицій є здатність поглинатися живими організмами із оточуючого середовища, яку оцінюють за коефіцієнтом біоаккумуляції (BCF – Bio-concentration factor). Останній являє собою відношення концентрації речовини в організмі до її концентрації назовні та визначається переважно для біоти водойм. Здатність до біоаккумуляції нових пестицидів, для яких ще не встановлено BCF, можна опосередковано оцінити за десятичним логарифмом коефіцієнту розподілу н-октанол-вода (log P). Якщо $\log P < 2,7$, то пестициду притаманний низький рі-

вень біоаккумуляції, тобто існує низька ймовірність перетинання речовиною біологічних мембран, тому її прямий чи опосередкований вплив на водні організми є мало ймовірним. Про помірний рівень біоаккумуляції свідчить $\log P$ в межах 2,7-3; про високий – $\log P > 3,0$ [7]. Виходячи з наведеного амікарбазону ($\log P = 1,23$) та біциклопірону ($\log P = -1,2$) притаманний низький рівень біоаккумуляції, підіфлуметофену ($\log P = 3,8$) – високий. Можливо, саме високий рівень біоаккумуляції (висока ліпофільність) є однією з передумов високої токсичності підіфлуметофену для риб та безхребетних.

Основними характеристиками, що визначають здатність пестицидів випаровуватися, є тиск насиченої пари та константа Генрі, яка є мірою летючості речовини з розбавлених водних розчинів, що близько до стану пестициду в реальних умовах застосування у сільському господарстві. За тиском насиченої пари та константою Генрі (табл. 3) усі досліджувані речовини є нелеткими, згідно з класифікацією, наведеною в [7].

Прогнозування лімітуючої ланки міграції амікарбазону, біциклопірону та підіфлуметофену у системі «ґрунт – суміжні середовища» здійснили шляхом математичного моделювання за рівняннями регресії, які наведені у таблиці 5.

Рівняння (1)-(5) описують залежність між ГДК в ґрунті (ГДК_г), що встановлена за транслокаційним показником шкідливості, та мінімальною величиною МДР в продуктах харчування рослинного походження. Рівняння (6)-(9) описують залежність між ГДК_г, яка встановлена за лімітуючим водно-міграційним показником шкідливості, і ГДК у воді водойм (ГДК_{в.в.}). Оскільки при лімітуючому транслокаційному показнику шкідливості ГДК_г чисельно дорівнює пороговій концентрації, при якій міграція у товарні частини сільськогосподарських рослин не перевищить МДР, а при лімітуючому водно-міграційному показнику шкідливості ГДК_г чисельно дорівнює пороговій концентрації, при якій міграція у воду не перевищить ГДК_{в.в.}, то рівняння (1)-(5) і (6)-(9) можна

Рівняння регресії та результати розрахунків порогових концентрацій амікарбазону, біциклопірону та підіфлуметофену в ґрунті

Формули	Джерело інформації	Амікарбазон	Біциклопірон	Підіфлуметофен
$Y = 1,23 + 0,48 \lg \text{МДР}$ (1)	[5]	0,41	0,41	0,27
$Y = 1,15 + 0,76 \lg \text{МДР}$ (2)	[3]	-0,14	-0,14	-0,37
$Y = 0,27 + 0,55 \text{МДР}$ (3)	[2]	0,28	0,28	0,28
$Y = 1,11 + 0,53 \lg \text{МДР}$ (4)	[2]	0,21	0,21	0,05
$Y = 1,29 \times \sqrt{\text{МДР}}$ (5)	[2]	0,18	0,18	0,13
$Y = 0,24 + 2,49 \text{ГДКв.в.}$ (6)	[2]	0,24	0,24	0,24
$Y = 1,02 + 0,31 \lg \text{ГДКв.в.}$ (7)	[2]	0,18	0,02	0,18
$Y = 2,28 \times \sqrt{\text{ГДКв.в.}}$ (8)	[2]	0,10	0,06	0,10
$Y = 0,568 + 0,084 \ln \text{ГДКв.в.}$ (9)	[4]	0,05	-0,06	0,05

Примітка. *Y* – порогові концентрації у ґрунті, мг/кг; МДР – мінімальна величина МДР в продуктах харчування, мг/кг: амікарбазону – 0,02, біциклопірону – 0,02, підіфлуметофену – 0,01; ГДКв.в. – ГДК у воді водойм, мг/дм³: амікарбазону – 0,002, біциклопірону – 0,0006, підіфлуметофену – 0,002.

використовувати як регресійні моделі процесів міграції в системах «ґрунт – рослини» та «ґрунт – вода водойм» відповідно.

Дані, які наведені у таблиці 5, свідчать, що значення, отримані за рівнянням (2) для усіх трьох досліджуваних сполук та за рівнянням (9) для біциклопірону, позбавлені сенсу. Згідно з принципом аградації, пороговою концентрацією в ґрунті за транслокаційним показником шкідливості визнано найменше з 4 значень, отриманих за формулами (1) і (3)-(5): амікарбазону, біциклопірону та підіфлуметофену – 0,18 мг/кг; 0,18 мг/кг та 0,05 мг/кг, відповідно; пороговою концентрацією за водно-міграційним показником шкідливості – найменше із значень, отриманих за формулами (6)-(9): амікарбазону, біциклопірону та підіфлуметофену – 0,05 мг/кг; 0,02 мг/кг і 0,05 мг/кг, відповідно.

Отже, транслокація досліджуваних речовин у товарні частини сільськогосподарських рослин не перевищить МДР при вмісті у ґрунті: амікарбазону – 0,18 мг/кг, біциклопірону – 0,18 мг/кг та підіфлуметофену – 0,05 мг/кг і нижче. Міграція у воду підземних та поверхневих водойм не перевищить ГДКв.в. при вмісті у ґрунті: амікарбазону – 0,05 мг/кг, біциклопірону – 0,02 мг/кг та підіфлуметофену – 0,05 мг/кг і нижче.

Моделювання процесу випаровування досліджуваних пестицидів з ґрунту в атмосферне повітря

здійснили шляхом розрахунку максимально досяжної концентрації речовини в повітрі за рівнянням Менделєєва-Клапейрона [6], врахувавши молекулярну масу і тиск насиченої пари кожної сполуки, які наведені у таблиці 3. Зауважимо, що насиченою називається пара, що знаходиться в рівновазі з рідиною або твердим тілом. Амікарбазон, біциклопірон та підіфлуметофен при температурі 20 °C або 25 °C є твердими речовинами, точка плавлення яких становить 137,5 °C; 65,3 °C та 113 °C, відповідно [7].

Результати розрахунків, які наведені у таблиці 6, свідчать, що максимально досяжні внаслідок випаровування концентрації досліджуваних речовин у повітрі значно нижчі за гігієнічні нормативи: амікарбазону – в 3,4 рази, ніж ОБРВ в атмосферному повітрі (ОБРВа.п.), і в 1724 рази, ніж ОБРВ в повітрі робочої зони (ОБРВп.р.з.); біциклопірону – в 1244 рази, ніж ОБРВп.р.з., підіфлуметофену – в 312,5 рази, ніж ОБРВа.п., і в 31250 рази, ніж ОБРВп.р.з.

Таким чином, максимально досяжні концентрації досліджуваних речовин в повітрі при температурі 25 °C (амікарбазон, біциклопірон) або 20 °C (підіфлуметофен) є значно нижчими, ніж ОБРВ в повітрі робочої зони (усі 3 сполуки) та атмосферному повітрі (амікарбазон, підіфлуметофен); максимально досяжна концентрація біциклопірону лише у 8 разів

Таблиця 6

Показники поведінки досліджуваних пестицидів в системі «ґрунт – повітря»

Показник, одиниці виміру	Діюча речовина		
	Амікарбазон	Біциклопірон	Підіфлуметофен
Максимально досяжна концентрація в повітрі, мг/м ³	2,9·10 ⁻⁴	8,04·10 ⁻⁴	3,2·10 ⁻⁵
ОБРВ в повітрі робочої зони, мг/м ³	0,5	1,0	1,0
ОБРВ в атмосферному повітрі, мг/м ³	0,001	0,0001	0,01

перевищувала ОБРВа.п.. Тому система «грунт – повітря» не є провідною ланкою міграції досліджуваних речовин у навколишньому середовищі. Оскільки порогові концентрації амікарбазону та біциклопірону у ґрунті за водно-міграційним показником шкідливості (0,05 мг/кг і 0,02 мг/кг, відповідно) менші, ніж за транслокаційним показником (0,18 мг/кг і 0,18 мг/кг), а порогові концентрації підіфлуметофену за обома показниками (0,05 мг/кг і 0,05 мг/кг) співпадають, то лімітуючою ланкою міграції усіх досліджуваних речовин є система «грунт – вода водойм» та у разі підіфлуметофену – ще й «грунт – рослини».

ВИСНОВКИ

1. За токсичністю для наземних організмів амікарбазон є середньотоксичним (IV клас небезпечності) для ссавців, слабботоксичним (III клас) для птахів та ґрунтової мезофауни, практично нетоксичним для бджіл; біциклопірон є слабботоксичним (III клас) для птахів та практично нетоксичним для інших представників наземної фауни; підіфлуметофен – практично нетоксичний для всієї наземної біоти.

2. Підіфлуметофен є високостійким у ґрунті (I клас небезпечності) при різних ґрунтово-кліматичних умовах; найшвидше деградує у ґрунті амікарбазон, який за міжнародною класифікацією є помірно стійким (III клас); біциклопірон є високостійким (I клас) в лабораторних експериментах та помірно стійким (III клас) – у польових дослідках.

3. Екотоксикологічна небезпечність (з урахуванням персистентності та максимальної норми витрати) усіх досліджуваних пестицидів за різних ґрунтово-кліматичних умов є нижчою на (1-5) порядків в порівнянні з ДДТ. До того ж, екотокси сучасних гербіцидів біциклопірону та амікарбазону були нижчими, ніж екотокси їх попередників з класів сим-триазинів (атразину, пропазину, симазину) та шестичленних гетероциклів (бентазону, метрибузину).

4. Усі досліджувані речовини є високостійкими (I клас небезпечності) у воді. Водночас, вплив амікарбазону та біциклопірону на водні організми є малоюмовірним, оскільки їм притаманний низький рівень біоаккумуляції, на відміну від підіфлуметофену, який вирізняється високою ліпофільністю.

5. Підіфлуметофен є високотоксичним (I клас небезпечності) для риб та безхребетних; біциклопірон – слабботоксичним (III клас); амікарбазон для риб практично не токсичний, для безхребетних – слабботоксичний (III клас). Для водоростей та вищих водяних рослин (ВВР) небезпечнішими є гербіциди: амікарбазон – надзвичайно токсичний для водоростей та високотоксичний для ВВР (I клас); біциклопірон – надзвичайно токсичний для ВВР (I клас) та середньотоксичний (II клас) для найчутливіших водоростей; підіфлуметофен є середньотоксичним (II клас) як для водоростей, так і для ВВР.

6. За рухливістю у ґрунті амікарбазон є мобільним (II клас), підіфлуметофен – мало мобільним (IV клас); рухливість біциклопірону коливається у широкому діапазоні: від дуже мобільний (I клас) до мало мобільний (IV клас) в окремих ґрунтах. За константою Генрі, усі досліджувані речовини є нелеткими. Встановлено, що провідною ланкою міграції у довкіллі амікарбазону, біциклопірону та підіфлуметофену є система «грунт – вода водойм» та у разі підіфлуметофену – також «грунт – рослини».

Конфлікт інтересів. Авторі заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES

- Melnikov NN. [To the question of soil pollution with organochlorine compounds]. *Agrokimiya*. 1996;10:72-4. [in Russian].
- [Methodology for the Calculation Hygienic Standardization of the Pesticides in Soil]. *Information Letter № 131-2005 on the Innovations in the System of Public Health / Ukrmedpatentinform*. Kyiv. 2005; 2. [in Ukrainian].
- [Methodical directions on the hygienic assessment of new pesticides: MD № 4263-87]. Kyiv. 1988; 210. [in Russian].
View at: URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200092699>
- Molozhanova EG, Petrashenko LP, Yurchenko TV, Kolontaeva NV. [Prospects in the Development of the Hygienic Standardization of the Chemical Anthropogenic Compounds in Soil]. In: [Hygiene of Settlements]. Kyiv. 2001;38(1):247-9. [in Russian].
View at: IRBIS: [http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?Z21ID=&I21DBN=JRN&P21DBN=JRN&S21STN=1&S21REF=10&S21FMT=njuu_a11&C21COM=S&S21CN-R=20&S21P01=0&S21P02=0&S21COLORTERMS=0&S21P03=F&S21STR=%D0%9662201/2001\\$](http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?Z21ID=&I21DBN=JRN&P21DBN=JRN&S21STN=1&S21REF=10&S21FMT=njuu_a11&C21COM=S&S21CN-R=20&S21P01=0&S21P02=0&S21COLORTERMS=0&S21P03=F&S21STR=%D0%9662201/2001$)
- [Temporary guidelines for the application of the calculation method for substantiating the tentatively permissible concentrations (TPC) of pesticides in the mail]. TG No. 2283-81. Moscow. 1982. [in Russian].
- Goncharuk EI, Sidorenko GI. [Hygienic Standardization of the Chemical Substances in Soil: Manual]. Moscow: Medicine. 1986;320. [in Russian].
- PPDB: Pesticide Properties Data Base. University of Hertfordshire. Version: July 2020.
View at: Publisher Site: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>
- OECD Guidelines for the testing of chemicals. Guideline 423. Acute oral toxicity – Acute toxic class method. OECD, Paris. 2001; 14.
View at: Publisher Site: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en
- Public release summary on the evaluation of the new

- product Amitron 700WG Herbicide. 2018; 46.
View at: Publisher Site: https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/29506-amitron_700wg_herbicide_prs.pdf
10. Public release summary on the evaluation of the new active bicyclopiron in the product Talinor Herbicide. 2017; 54.
View at: Publisher Site: <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/26736-prs-bicyclopiron-talinor-herbicide.pdf>
 11. Public release summary on the evaluation of pydiflumetofen in the product Miravis Fungicide. 2018; 58.
View at: Publisher Site: https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/29011-pydiflumetofen_draft_prs-final_.pdf
 12. European Commission. Pydiflumetofen. 2019; 1: 197.
View at: URL: <https://echa.europa.eu/documents/10162/4d8943f7-5028-4c59-7421-8938ff1ef9c3>
 13. Classification of hazards to the terrestrial environment. A review. Draft report to the UN sub-committee of experts on the GHS: terrestrial environmental hazards. Document ENV/JM/HCL (2008) 3, OECD, Paris. 2008; 42.
View at: URL: <https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/doc/2008/ac10c4/UN-SCEGHS-15-inf29e.pdf>
 14. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 2. Test № 207: Earthworm, acute toxicity tests. OECD, Paris. 1984; 9.
View at: URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948293.pdf>
 15. Melnikov NN, Belan SR. [Comparative danger of soil contamination with herbicides – derivatives of simtriazines and some other six-membered heterocyclic compounds]. *Agrokhimiya*. 1997;2:66-7. [in Russian].
 16. Department of agriculture. Pydiflumetofen. New Active Ingredient Review. CAS 1228284-64-7; EPA PC CODE 090110. 2018. P. 1-2.
View at: URL: <https://www.mda.state.mn.us/sites/default/files/inline-files/Pydiflumetofen.pdf>
 17. US EPA-Pesticides; Amicarbazone: HED Human Health Risk Assessment for New Food Use Herbicide on Field Corn. 2005;86.
View at: URL: <https://archive.epa.gov/pesticides/chemicalsearch/chemical/foia/web/pdf/114004/114004-2005-08-10a.pdf>
 18. Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). Fourth revised edition. United Nations, New York and Geneva. 2011;694.
View at: URL: https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf

Article history
Received: 11.06.2021
Revision requested: 22.07.2021
Revision received: 24.08.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

ЭКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НОВЫХ ПЕСТИЦИДОВ ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Коршун М.М., Мартиянова Ю.В.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

ulia.martianova@gmail.com

Актуальность. Использование пестицидов в народном хозяйстве для уничтожения или подавления роста вредных растений и защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей болезней предусматривает обязательную оценку их эколого-гигиенической опасности.

Цель: оценка опасности трех новых пестицидов для защиты зерновых злаковых культур: амикарбазона из химического класса триазолоновых соединений, бициклопирона из класса трикетонных и пидифлуметофена из класса карбоксамидов, по показателям экотоксичности и поведения в окружающей среде.

Материалы и методы. Оценку опасности исследуемых пестицидов осуществили на основании данных источников информации об их физико-химических свойствах, параметрах токсикометрии для различных видов живых организмов и поведении в окружающей среде. Для интегральной оценки потенциальной опасности для наземных экосистем был рассчитан экотокс с учетом токсичности для млекопитающих, персистентности и максимальной нормы расхода. Для выявления лимитирующего звена миграции осуществлено математическое моделирование в системах «почва – вода», «почва – растения» и «почва – атмосферный воздух».

Результаты. Установлено, что амикарбазон является чрезвычайно токсичным для водорослей и высокотоксичным для высших водных растений (ВВР) (I класс опасности), среднетоксичным (IV класс) для млекопитающих, слаботоксичным (III класс) для птиц, почвенной мезофауны и беспозвоночных, практически нетоксичным для пчел и рыб; бициклопирон – чрезвычайно токсичный для ВВР (I класс) и среднетоксичный (II класс) для наиболее чувствительных водорослей, слаботоксичный (III класс) для птиц, рыб и беспозвоночных и практически нетоксичный для других представителей наземной фауны; пидифлуметофен является высокотоксичным (I класс) для рыб и беспозвоночных, среднетоксичным (II класс) как для водорослей, так и для ВВР, практически нетоксичным для всей наземной биоты. Доказано, что пидифлуметофен – высокостойкий и маломобильный

в почве; амикарбазон – стойкий и мобильный; бициклопирон – высокостойкий в лабораторных опытах и умеренно стойкий в полевых опытах, его подвижность колеблется в широком диапазоне: от очень мобильного до маломобильного в отдельных почвах. Опасность для наземных биоценозов всех исследуемых пестицидов при различных почвенно-климатических условиях ниже на (1-5) порядков по сравнению с высокостойким ДДТ; самой низкой является экотоксичность бициклопирона, высокой – пидифлуметофена. Все исследуемые вещества являются высокостойкими в воде. Ведущим звеном их миграции в окружающей среде является система «почва – вода водоемов» и в случае пидифлуметофена – также «почва – растения».

Ключевые слова: пестициды, экотоксичность, стабильность, миграция, оценка опасности.

ECOLOGICAL AND HYGIENIC ASSESSMENT OF NEW PESTICIDES FOR GRAIN CEREALS CHEMICAL PROTECTION

Korshun M.M., Martiianova Y.V.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

ulia.martianova@gmail.com

Relevance. The use of pesticides in the national economy is to destroy or inhibit the growth of harmful plants and to protect crops from pathogens requires a mandatory assessment of their environmental hygienic hazard.

Objective of our study is to assess the hazards of three new pesticides for cereal grains protection: amicarbazone from the chemical class of triazolinone compounds, bicyclopyrone from the class of tricetones and pydiflumetofen from the class of carboxamides, in terms of ecotoxicity and environmental behavior.

Materials and methods. Hazard assessment of amicarbazone, bicyclopyrone and pydiflumetofen was performed on the basis of data sources on their physico-chemical characteristics, toxicometry parameters for different species of living things and indicators of environmental behavior. For potential hazards integral assess for terrestrial ecosystems an ecotox was calculated taking into account mammalian toxicity, persistence and maximum rate consumption. To identify the limiting section of migration, the mathematical modeling was performed in the systems “soil-water”, “soil-plants” and “soil-atmospheric air”.

Results. Amicarbazone has been shown to be extremely toxic to algae and highly toxic to higher aquatic plants (HAP) (hazard class I), moderately toxic (class IV) to mammals, mildly toxic (class III) to birds, soil mesofauna and invertebrates, virtually non-toxic to bees and fish; bicyclopyrone - extremely toxic to HAP (class I) and moderately toxic (class II) to the most sensitive algae, mildly toxic (class III) to birds, fish and invertebrates and virtually non-toxic to other terrestrial fauna; pydiflumetofen is highly toxic (class I) to fish and invertebrates, moderately toxic (class II) to algae and HAP, virtually non-toxic to all terrestrial biota. Pydiflumetofen has been shown to be a highly resistant and poorly mobile in soil; amicarbazone is stable and mobile; bicyclopyrone is highly resistant in laboratory experiments and moderately stable in field experiments, its mobility varies in a wide range: from very mobile to less mobile in some soils. The danger for terrestrial biocenoses of all studied pesticides under different soil and climatic conditions is lower by (1–5) orders of magnitude in comparison with DDT; the lowest is the ecotoxicity of bicyclopyrone, the highest – pydiflumetofen. All test substances are highly stable in water. The leading section of their migration in environment is the system “soil – water of ponds” and in case of pydiflumetofen – “soil – plants” as well.

Key words: pesticides, ecotoxicity, stability, migration, hazard assessment.

MOLECULAR-GENETIC ASPECTS OF KABUKI MAKEUP SYNDROME. Review

¹Lastivka I.V. <https://orcid.org/0000-0002-9088-1301>

²Antsupva V.V. <https://orcid.org/0000-0002-7849-2602>

¹Babintseva A.H. <https://orcid.org/0000-0002-3859-6431>

³Unhurian M.D. <https://orcid.org/0000-0002-8385-6176>

²Ushko I.A <https://orcid.org/0000-0003-3017-7766>

¹Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

³Chernivtsi Regional Perinatal Center, Chernivtsi, Ukraine

antsupovavita@gmail.com

Relevance. Kabuki Makeup Syndrome (KS) is a rare monogenic genetic disease characterized by multiple malformations. The phenotype includes specific facial features, skeletal and dermatoglyphic abnormalities, mental retardation, short stature. Most cases are associated with de novo mutations in the *KMT2D* and *KMD6A* genes. However, in 25% of patients with KS, the genetic basis remains unknown, which indicates the genetic heterogeneity of the disease and encourages further accumulation of clinical experience in KS. The article summarizes current data on the molecular genetic aspects of the development of Kabuki Makeup Syndrome and describes its own clinical case of Kabuki Makeup Syndrome Type I.

Objective: to summarize the data on modern molecular-genetic aspects of the development of Kabuki makeup syndrome on the example of a clinical case.

Materials and methods. Analysis of scientific publications in the international electronic scientometric database Scopus, PubMed by keywords. Search depth – 15 years (2007-2021). The clinical case of Kabuki Makeup Syndrome from our own practice. Clinical and genealogical, molecular-genetic, cytogenetic, instrumental research methods.

Results. According to current data, the development of Kabuki Makeup Syndrome is due to mutations in the *KMT2D* (*MLL2*) gene, which belongs to the genes that control embryogenesis. *KMT2D* functions as a promoter of the expression of other genes and the *KDM6A* gene; encodes a large multidomain protein that interacts with the *SET1/COMPASS* complex. *KDM6A* is a cofactor physically associated with the *KMT2D-COMPASS* complex and exhibits demethylase activity in histone 3. Gene mutations *KMT2D* and *KDM6A* associated with KS lead to a lack of functioning of the corresponding enzyme, which leads to impaired methylation of histones and active genes in many organs and tissues of the body. Depending on the type of mutation in the *KMT2D* and *KMD6A* genes, there are two types of Kabuki Makeup Syndrome. KS type 1 with autosomal dominant type of inheritance due to pathogenic mutations in the *KMT2D* gene in a heterozygous state on chromosome 12q13.12. 70% of patients have KS1. Type 2 KS is an X-linked disease that develops as a result of a heterozygous pathogenic mutation in the *KDM6* gene. In most cases, KS mutations are sporadic, but families with parent-to-child transmission have been described. In patients with phenotypic signs of KS pathogenic mutations are detected in 75% of cases. Pathogenic mutations in the *KMT2D* gene can be detected in mosaic form, and the carrier can pass this mutation on to offspring. Pathogenic mutations have not been described in phenotypically healthy people.

Here is our own observation. The girl with a combined congenital heart defect and multiple stigmas of dysembryogenesis was born at 36 weeks with a weight of 2930, 49 cm long, on the Apgar scale 8/8 points from the third planned pregnancy in parents who already had an older healthy boy. In connection with multiple malformations, the girl underwent a syndromic diagnosis using the program «Face-2gene»; Kabuki Makeup Syndrome is suspected. Molecular genetic analysis revealed a pathogenic mutation (*c.11884C>T*) (*p.Gln3962**) in the *KMT2D* gene, which is associated with autosomal dominant Kabuki Makeup Syndrome of type 1 (*MedGen UID: 893727*).

Conclusions. Kabuki Makeup Syndrome has clinical and molecular polymorphisms. Most of the registered *KMT2D* mutations occur de novo and occur in episodic cases. The described case demonstrates the molecular-positive Kabuki Makeup Syndrome of type I. The identified variant *c.11884C>T* (*p.Gln3962**) in the *KMT2D* gene is associated with the autosomal dominant Kabuki Makeup Syndrome (*MedGen UID: 893727*). Verification of the diagnosis of the disease and prevention of KS in siblings is based on the results of molecular genetic analysis. The prognosis of this disease depends on the severity of heart disease and intellectual impairment. Early diagnosis determines the type and timing of therapeutic interventions, is crucial for medical and genetic counseling of the family.

Key words: Kabuki Makeup Syndrome, specific facial features, *KMT2D* and *KMD6A* genes mutations.

Relevance. Kabuki Makeup Syndrome (KS) or Niikawa-Kuroki Syndrome (OMIM 147920) is a rare genetic disease characterized by phenotypic traits, speech retardation, and autistic symptoms. The syndrome was first described by Japanese doctors N. Niikawa et al. and Y. Kuroki et al. in 1981. They identified the main clinical and phenotypic features: specific facial features, skeletal

abnormalities, mental retardation, growth deficit, dermatoglyphic abnormalities. Due to the presence of phenotypic facial features that resemble the appearance of actors of the Kabuki Theater, the disease was called «Kabuki Makeup Syndrome». The prevalence of KS in Japan is 1:32 000, in Western countries - 1:86 000 [1, 2]. The onset of the syndrome is associated with mutations in the *KMT2D* and

KDM6A genes. Pathogenic and non-pathogenic mutations in the *KMT2D* and *KDM6A* genes have been described in the literature [3]. In patients with phenotypic signs of KS pathogenic mutations are detected in 75 % of cases. Pathogenic mutations have not been described in phenotypically healthy people. Small deletions or insertions, nonsense and missense mutations, shift of the reading frame are described as the reason of development of the disease, some of them are pathogenic, some of them are of unknown clinical significance. In 25 % of patients with KS, the genetic basis remains unknown, which indicates the genetic heterogeneity of the disease and encourages further accumulation of clinical experience [4-8].

Objective: to summarize the data on modern molecular-genetic aspects of the development of Kabuki makeup syndrome on the example of a clinical case.

MATERIALS AND METHODS

Analysis of scientific publications in the international electronic scientometric database Scopus, PubMed by keywords. Search depth – 15 years (2007-2021). The clinical case of Kabuki Makeup Syndrome from our own practice. Clinical and genealogical, molecular-genetic, cytogenetic, instrumental research methods.

RESULTS AND DISCUSSION

According to current research, the etiopathogenesis of the disease is associated with mutations in the *KMT2D* gene (also known as *MLL2*), which belongs to the family of mixed-cell leukemia genes required for embryogenesis and functions as a promoter of other genes and the *KDM6A* gene. *KMT2D* encodes a large multidomain protein that interacts with the *SET1/COMPASS* complex. *KDM6A* is a cofactor physically associated with the *KMT2D-COMPASS* complex and exhibits demethylase activity in histone 3. Together, the components of the *KMT2D-COMPASS* complex remove inhibitory epigenetic labels and add activating labels, namely mono-, di- or trimethylation of histone 3. Depending on the type of mutation in the genes that cause KS, there are two types: KS type 1 with autosomal dominant (AD) type of inheritance, which is caused by heterozygous pathogenic mutations in the *KMT2D* gene on chromosome 12q13.12 and KS type 2 – X-linked disease that develops as a result of a heterozygous pathogenic mutation in the *KDM6A* gene. In most patients (70 %) register KS1. Gene mutations *KMT2D* and *KDM6A* associated with KS, lead to a lack of functioning of the corresponding enzyme, which leads to impaired methylation of histones and activation of specific genes in many organs and tissues of the body. In most cases, KS mutations are sporadic, but families with parent-to-child transmission have been described. Pathogenic mutations in the *KMT2D* gene can be detected in a mosaic form, and the carrier can pass this mutation to offspring [4, 5, 8-11].

Various cytogenetic abnormalities have been described in patients with clinically established KS, which includes an annular X chromosome, translocations, inversions, duplications [8, 10, 11].

At KS there are mutations-negative and mutations-positive patients. Phenotypic signs of the disease in mutation-negative and mutation-positive patients do not differ [4, 8, 10, 11].

The phenotype of children with KS includes microcephaly, arched eyebrows with thickening to the center/thinning of the lateral part, wide nose, hypertelorism, elongated eye slits, antimongoloid incision of the eyes, long thick eyelashes, ectropion of the lateral part of the lower eyelid and short, short low-set auricles, micrognathia, thin upper lip, gothic palate and/or cleft palate, abnormalities of the teeth with the formation of a false bite, low hair growth on the back of the head, hyperelastic skin, hirsutism, skin pigmentation disorders, nail dysplasia [1-3, 6].

Among the skeletal anomalies in KS, the most common are anomalies of the sutures of the skull, spine and vertebrae, shoulders and ribs, hands, dislocations/subdislocations of the joints. KS is characterized by postnatal growth retardation that develops during the first years of life. By 6-10 years, some patients develop obesity. Delayed speech development in patients with KS occurs in 100 % of cases. Intellectual deficit from mild to moderate. Cases of autism-like behavior in children with KS have been described. Among neurologic displays muscular hypotension, coordinating disturbances, a delay of development of stato-kinetic skills can be observed. Neuroimaging reveals ventriculodilation of the lateral ventricles, hypoplasia of the corpus callosum, hypoplasia of the adenohypophysis. Seizures occur in 36-45 % of cases at any age, more often in girls. Ophthalmic findings include ptosis, strabismus, nystagmus, paralysis of the afferent nerve, microphthalmia. Features of dermatoglyphics – high fetal pads on the fingertips, increasing the ulnar radius, increasing the radius of the hypotenuse, the absence of the finger triradius – the only difficult on the palm. With corticosteroids can be defects of the kidneys and urinary tract, genitals, gastrointestinal tract, ENT organs, cardiovascular system, various hernias. In 40-50 % of cases, congenital heart defects (CHD) are diagnosed (defects in the valves or membranes of the heart, coarctation of the aorta, transposition of large vessels). Children with SK are prone to bronchopulmonary diseases with a prolonged course. Endocrine pathology is represented by hypothyroidism, diabetes, hypoglycemia or diabetes mellitus, late puberty, pituitary dwarfism. At KS the immune status is broken. There is a decrease in serum immunoglobulin classes (80 % – IgA deficiency), due to the fact that the genes *KMT2D* and *KDM6A* are involved in epigenetic regulation and affect the development of immunocompetent cells [1-3, 6-9].

Here is our own observation of early diagnosis of KS in a child. Girl O., born in 2019, was born from the third

desired and planned pregnancy, which took place against the background of the threat of miscarriage, polyhydramnios, hypothyroidism. The older brother is healthy from the first pregnancy. The second pregnancy ended in miscarriage in early pregnancy. The third pregnancy occurred against the background of drugs that promote conception. ATC in the fetus was diagnosed at 20 weeks of gestation.

Heredity through the mother is burdened with cardiovascular and oncopathological pathology; great-grandmother on the mother's line suffers from diabetes. Heredity on the paternal line is burdened by oncopathology; grandfather suffers from diabetes. Both parents suffer from hypothyroidism.

The baby was born at 36 weeks of gestation with a weight of 2930, length 49 cm, Apgar scale 8/8 points. Due to severe congenital heart disease (CHD), immediately after birth, the child was transferred to the Department of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery in Kyiv for examination and surgical treatment. Parents refused surgical treatment after reviewing the possible risks of surgical treatment and long-term prognosis. The child was transferred to the neonatal pathology department in Chernivtsi. The condition on admission was considered severe, which was due to the combined CHD and feeding problems. She was fed through a tube. Reflexes are suppressed, the tone of muscles is lowered. The crack of a soft palate is noted. Tissue turgor is reduced. Heart tones are rhythmic, loud, systolic murmur along the left edge of the sternum. The abdomen is soft, painless on palpation. The liver protrudes 2 cm from under the costal arch. Defecation without abnormalities.

The child was consulted by a geneticist, revealed multiple developmental abnormalities (CHD, cleft palate, protruding ear shells, arched eyebrows, long oblique eye slits, blue sclera, epicanthus, ectropion of the lower eyelids, wide tip of the nose, hand, hypothyroidism), dysplasia of the hip joints, muscular hypotension, delayed stato-kinetic development. Syndromological diagnostics was performed using the diagnostic program «Face2gene»; Kabuki Makeup Syndrome is suspected; molecular genetic testing is recommended to verify the diagnosis. Molecular genetic analysis revealed a pathogenic mutation (*c.11884C>T(p.Gln3962*)*) in the *KMT2D* gene, which is associated with autosomal dominant Kabuki Makeup Syndrome of type 1 (MedGen UID: 893727).

The child is offered registration of the status «Child with a disability»; observation in dynamics by a pediatric cardiologist, pediatric neurologist and geneticist is recommended.

CONCLUSIONS

Kabuki Makeup Syndrome has clinical and molecular polymorphisms. Most of the registered *KMT2D*

mutations occur de novo and occur in episodic cases. The described case demonstrates the molecular-positive Kabuki Makeup Syndrome of type I. The identified variant *c.11884C>T(p.Gln3962*)* in the *KMT2D* gene is associated with the autosomal dominant Kabuki makeup syndrome (MedGen UID: 893727). Verification of the diagnosis of the disease and prevention of KS in siblings is based on the results of molecular genetic analysis. The prognosis of this disease depends on the severity of heart disease and intellectual impairment. Early diagnosis determines the type and timing of therapeutic interventions, is crucial for medical and genetic counseling of the family.

REFERENCES

1. Jones KL. Smith's recognizable patterns of human malformation, 8th edition. Elsevier, 2021. 1088 p. View at: Scopus: <https://www.elsevier.com/books/smiths-recognizable-patterns-of-human-malformation/jones/978-0-323-63882-1>
2. Kozlova SI, Demikova NS. Hereditary syndromes and medical genetic counseling, 3th edition. KMK Scientific Publishing Partnership, 2007; 447: 93-94. View at: Publisher Site: <https://medkniga.com.ua/15726-nasledstvennie-sindromi-i-mediko-geneticheskoe-konsultirovanie-atlas-spravochnik-3-e-izd/>
3. Kabuki syndrome-1. OMIM: 147920. Mendelian inheritance in humans online. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, John Hopkins University, National Center for Biotechnology Information. National Medical Library. View at: Publisher Site: <https://www.omim.org/entry/147920?search=Kabuki&highlight=kabuki>
4. Maas NMC, Van de Putte T, Melotte C, Francis A, Schrandt-Stumpel C, Sanlaville D, Genevieve D, Lyonnet S, Dimitrov B, Devriendt K, Fryns J-P, Vermeesch JR. The C20orf133 gene is disrupted in a patient with Kabuki syndrome. *J Med Genet.* 2007;44(9):562-9. DOI: 10.1136/jmg.2007.049510 View at: Publisher Site: <https://jmg.bmj.com/content/44/9/562> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17586838/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597955/>
5. Zarate YA, Zhan H, Jones JR. Infrequent Manifestations of Kabuki Syndrome in a Patient with Novel MLL2 Mutation. *Mol Syndromol.* 2012;3(4):180-184 DOI: 10.1159/000342253 View at: Publisher Site: <https://www.karger.com/Article/FullText/342253> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23239960/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507269/>
6. Carosso GA, Boukas L, Augustin JJ, Nguyen HN, Winer BL, Cannon GH, Robertson JD, Zhang L,

- Hansen KD, Goff LA, Bjornsson Hans T. Precocious neuronal differentiation and disrupted oxygen responses in Kabuki syndrome. *JCI Insight*. 2019 Oct 17; 4(20): e129375. DOI: 10.1172/jci.insight.129375
View at: Publisher Site: <https://insight.jci.org/articles/view/129375>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31465303/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6824316/>
7. Olney AH, Schaefer GB, Kolodziej P. Kabuki Syndrome. *Ear, Nose & Throat Journal*. 1998 Sep;77(9):734
View at: Publisher Site: <https://journals.sagepub.com/toc/eara/77/9>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9787515/>
URL: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/014556139807700909>
8. Benjamin JS. Kabuki syndrome: Reversing Intellectual Disability by Promoting Open Chromatin. A dissertation submitted to Johns Hopkins University in conformity with the requirements for the degree of PhD. Baltimore, Maryland, 2015;149 p.
View at: Publisher Site: <https://jscholarship.library.jhu.edu/handle/1774.2/39652>
URL: <https://jscholarship.library.jhu.edu/bitstream/handle/1774.2/39652/BENJAMIN-DISSERTATION-2016.pdf?sequence=1>
9. Lim C, Jung S-T, Shin CH, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH, Ko JM, Cho T-J. Diagnosis and Management of Hip Dislocation in Patients with Kabuki Syndrome. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 2019;11(4):474-81. DOI: 10.4055/cios.2019.11.4.474
View at: Publisher Site: <https://eios.org/DOIx.php?id=10.4055/cios.2019.11.4.474>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31788172/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6867925/>
10. Shpargel KB, Mangini CL, Xie G, Ge K, Magnuson T. The KMT2D Kabuki syndrome histone methylase controls neural crest cell differentiation and facial morphology. *Development*. 2020 Jul 17;147(21):dev187997. DOI: 10.1242/dev.187997
View at: Publisher Site: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.187997>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32541010/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375479/>
11. Serbati N, Nasserredine S, Dehbi H, Nadifi S. Clinical Heterogeneity of Kabuki Syndrome: Study of Moroccan Patients. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res*. 2012;1(1):68-74.
View at: Publisher Site: <http://www.ijlbpr.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=114&id=452>

Article history

Received: 11.05.2021

Revision requested: 02.07.2021

Revision received: 19.08.2021

Accepted: 24.09.2021

Published: 30.09.2021

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ СИНДРОМУ ГРИМУ КАБУКІ. Огляд

¹Ластівка І.В., ²Анцупова В.В., ¹Бабінцева А.Х., ³Унгурян, ²Ушко Я.А.

¹Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

²Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ, Україна

³Чернівецький обласний перинатальний центр, Чернівці, Україна

antsupovavita@gmail.com

Актуальність. Синдром гриму Кабукі (КС) – це рідкісне моногенне генетичне захворювання, що характеризується множинними вадами розвитку. Фенотип включає специфічні риси обличчя, скелетні та дерматогліфічні відхилення, розумову відсталість, низький зріст. Більшість випадків пов'язані з мутаціями *de novo* у генах *KMT2D* та *KDM6A*. Однак у 25 % пацієнтів з КС генетична основа залишається невідомою, що свідчить про генетичну гетерогенність захворювання та спонукає до подальшого накоплення клінічного досвіду КС. В статті узагальнені сучасні дані щодо молекулярно-генетичних аспектів розвитку синдрому гриму Кабукі та описан власний клінічний випадок синдрому гриму Кабукі І типу.

Ціль: узагальнити дані про сучасні молекулярно-генетичні аспекти розвитку синдрому гриму Кабукі на прикладі клінічного випадку.

Матеріали та методи. Аналіз публікацій з міжнародних наукометричних електронних баз Scopus, PubMed за ключовими словами. Глибина пошуку – 15 років (2007-2021). Клінічний випадок синдрому гриму Кабукі з власної практики. Клініко-генетичні, молекулярно-генетичні, цитогенетичні, інструментальні методи дослідження.

Результати. За сучасними даними, розвиток синдрому гриму Кабукі обумовлений мутаціями гену *KMT2D* (*MLL2*), який належить до генів, що контролюють ембріогенез. *KMT2D* функціонує як промотор експресії інших генів та гену *KDM6A*; кодує великий мультидоменний протеїн, що взаємодіє з комплексом *SET1/COMPASS*. *KDM6A* є кофактором, фізично пов'язаним із комплексом *KMT2D-COMPASS*, та проявляє деметилазну активність в гістоні 3. Генні мутації *KMT2D* та *KDM6A*, пов'язані із КС, призводять до відсутності функціонування відповідного ферменту, що приводить до порушення метилювання гістонів та

активації специфічних генів у багатьох органах та тканинах організму. Залежно від виду мутації в генах *KMT2D* та *KMD6A*, виділяють два типи синдрому гриму Кабукі. КС 1-го типу з аутосомно-домінантним типом успадкування, обумовлений патогенними мутаціями в гені *KMT2D* в гетерозиготному стані на хромосомі 12q13.12. У 70 % хворих виявляють КС1. КС 2-го типу – Х-зчеплене захворювання, що розвивається в результаті гетерозиготної патогенної мутації в гені *KDM6*. У більшості випадків КС мутації є спорадичними, однак описані родини з передачею захворювання від батьків до дітей. У хворих з фенотиповими ознаками КС патогенні мутації виявляють в 75 % випадків. Патогенні мутації в гені *KMT2D* можуть бути виявлені в мозаїчній формі, а носій може передати цю мутацію нащадкам. Патогенні мутації не описані у фенотипово здорових людей.

Наводимо власне спостереження. Дівчинка з комбінованою уродженою вадою серця та множинними стигмами дизембриогенезу народилась на 36 тижні з вагою 2930, довжиною 49 см, за шкалою Апгар 8/8 балів від III планованої вагітності у батьків, які вже мали старшого здорового хлопчика. У зв'язку з множинними вадами розвитку дівчинці було проведено синдромологічну діагностику за допомогою програми «Face2gene»; запідозрений синдром гриму Кабукі. Молекулярно-генетичний аналіз виявив патогенну мутацію (*c.11884C>T(p.Gln3962*)*) у гені *KMT2D*, який асоціюється з аутосомно-домінантним синдромом Кабукі 1 типу (MedGen UID: 893727).

Висновки. Синдром гриму Кабукі має клінічний та молекулярний поліморфізм. Більшість із зареєстрованих мутацій *KMT2D* виникають de novo і зустрічаються в епізодичних випадках. Описаний випадок демонструє молекулярно-позитивний синдром гриму Кабукі I типу. Ідентифікований варіант *c.11884C>T(p.Gln3962*)* у гені *KMT2D* асоціюється з аутосомно-домінантним синдромом гриму Кабукі (MedGen UID: 893727). Верифікація діагнозу захворювання та профілактика КС у sibсів проводиться на основі результатів молекулярно-генетичного аналізу. Прогноз захворювання при цій патології залежить від тяжкості уражень серця та пошкодження інтелекту. Рання діагностика визначає тип та терміни терапевтичних втручань, має вирішальне значення для медико-генетичного консультування родини.

Ключові слова: синдром гриму Кабукі, специфічні риси обличчя, мутації генів *KMT2D*, *KMD6A*.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНДРОМА ГРИМА КАБУКИ. Обзор

¹Ластивка И.В., ²Анциупова В.В., ¹Бабинцева А.Х., ³Унгуриян, ²Ушко Я.А.

¹Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы, Украина

²Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

³Черновецкий областной перинатальный центр, Черновцы, Украина

antsupovavita@gmail.com

Актуальность. Синдром грима Кабуки (КС) – это редкое моногенное генетическое заболевание, характеризующееся множественными пороками развития. Фенотип включает специфические черты лица, скелетные и дерматоглифические отклонения, умственную отсталость, низкий рост. Большинство случаев связаны с мутациями de novo в генах *KMT2D* и *KMD6A*. Однако у 25% пациентов с КС генетическая основа остается неизвестной, что свидетельствует о генетической гетерогенности заболевания и побуждает к дальнейшему накоплению клинического опыта КС. В статье обобщены современные данные по молекулярно-генетическим аспектам развития синдрома грима Кабуки и описан собственный клинический случай синдрома грима Кабуки I типа.

Цель: обобщить данные о современных молекулярно-генетических аспектах развития синдрома грима Кабуки на примере клинического случая.

Материалы и методы. Анализ публикаций из международных наукометрических электронных баз Scopus, PubMed по ключевым словам. Глубина поиска – 15 лет (2007-2021). Клинический случай синдрома грима Кабуки из собственной практики. Клинико-генеалогические, молекулярно-генетические, цитогенетические, инструментальные методы исследования.

Результаты. По современным данным, развитие синдрома грима Кабуки обусловлено мутациями гена *KMT2D* (*MLL2*), который относится к генам, контролирующим эмбриогенез. *KMT2D* функционирует как промотор экспрессии других генов и гена *KDM6A*; кодирует большой мультидоменный протеин, взаимодействует с комплексом SET1/COMPASS. *KDM6A* является кофактором, физически связанным с комплексом *KMT2D*-COMPASS, и проявляет деметилазную активность в гистоне 3. Генные мутации *KMT2D* и *KDM6A*, связанные с КС, что приводит к отсутствию функционирования соответствующего фермента, приводит к нарушению метилирования гистонов и активации специфических генов во многих органах и тканях организма. В зависимости от вида мутации в генах *KMT2D* и *KMD6A*, выделяют два типа синдрома грима Кабуки. КС 1-го типа с аутосомно-доминантным типом наследования, обусловлен патогенными мутациями в гене *KMT2D* в гетерозиготном состоянии на хромосоме 12q13.12. У 70 % больных обнаруживают КС1. КС 2-го типа – Х-сцепленное заболевание, развивающееся в результате гетерозиготной патогенной мутации в гене *KDM6*. В большинстве случаев КС мутации являются спорадическими, однако описаны семьи с передачей заболевания от родителей к детям. У больных с фенотипическими признаками КС патогенные мутации обнаруживают в 75 % случаев. Патогенные мутации в гене *KMT2D* могут быть обнаружены в мозаичной форме, а носитель может передать эту мутацию потомкам. Патогенные мутации не описаны у фенотипически здоровых людей.

Приводим собственное наблюдение. Девочка с комбинированным врожденным пороком сердца и множественными стигмами дизембриогенеза родилась на 36 неделе с весом 2930, длиной 49 см, по шкале Апгар 8/8 баллов от III планируемой беременности у родителей, которые уже имели старшего здорового мальчика. В связи с множественными пороками развития девочке была проведена синдромологическая диагностика с помощью программы «Face2gene»; заподозрен синдром грима Кабуки. Молекулярно-генетический анализ выявил патогенную мутацию (*c.11884C>T(p.Gln3962*)*) в гене *KMT2D*, который ассоциируется с аутосомно-доминантным синдромом Кабуки I типа (MedGen UID: 893727).

Выводы. Синдром грима Кабуки имеет клинический и молекулярный полиморфизм. Большинство из зарегистрированных мутаций *KMT2D* возникают de novo и встречаются в эпизодических случаях. Описанный случай демонстрирует молекулярно-положительный синдром грима Кабуки I типа. Идентифицированный вариант *c.11884C>T(p.Gln3962*)* в гене *KMT2D* ассоциируется с аутосомно-доминантным синдромом грима Кабуки (MedGen UID: 893727). Верификация диагноза заболевания и профилактика КС у sibсов проводится на основе результатов молекулярно-генетического анализа. Прогноз заболевания при этой патологии зависит от тяжести поражений сердца и повреждения интеллекта. Ранняя диагностика определяет тип и сроки терапевтических вмешательств, имеет решающее значение для медико-генетического консультирования семьи.

Ключевые слова: синдром грима Кабуки, специфические черты лица, мутации генов *KMT2D*, *KMD6A*.

MACHINE LEARNING ALGORITHMS IMPLEMENTATION IN THE HEALTHCARE SYSTEM AS A PROSPECTIVE AREA FOR SCIENCE, HEALTHCARE, AND BUSINESS

Vasylevkiy Valerii <https://orcid.org/0000-0001-7981-6771>

Stepanov Ihor <https://orcid.org/0000-0002-5844-5972>

Koval Roman <https://orcid.org/0000-0002-0708-6594>

Soputnyak Mariya <https://orcid.org/0000-0002-6888-4047>

Liutianska Nataliia <https://orcid.org/0000-0001-5814-5147>

Sheyko Vladislav <https://orcid.org/0000-0003-3063-607X>

Stavnychyy Taras <https://orcid.org/0000-0001-5303-0383>

Limited liability company BIONITY, Kyiv, Ukraine

byblikpeper@gmail.com

Relevance. The current state of medicine is imperfect as in every other field. Some main discrete problems may be separated in diagnostics and disease management. Biomedical data operation difficulties are a serious limiting factor in solving crucial healthcare problems, represented in the statistically significant groups of diseases. Accumulation of life science data creates as possibilities as challenges to effectively utilize it in clinical practice. Machine learning-based tools are necessary for the generation of new insights and the discovery of new hidden patterns especially on big datasets. AI-based decisions may be successfully utilized for diagnosis of diseases, monitoring of general health, prediction of risks, treatment solutions, and biomedical knowledge generation.

Objective. To analyze the potential of machine learning algorithms in healthcare on exact existing problems and make a forecast of their development in near future.

Method. An analytical review of the literature on keywords from the scientometric databases Scopus, PubMed, Wiley. Search depth 7 years from 2013 to 2020.

Results. Analyzing the current general state of the healthcare system we separated the most relevant problems linked to diagnostics, treatment, and systemic management: diagnostics errors, delayed diagnostics (including during emergencies), overdiagnosis, bureaucracy, communication issues, and “handoff” difficulties. We examined details of the convenient decision-making process in the clinical environment in order to define exact points which may be significantly improved by AI-based decisions, among them: diagnosis of diseases, monitoring of general health, prediction of risks, treatment solutions, and biomedical knowledge generation. We defined machine learning algorithms as a prospective tool for disease diagnostics and management, as well as for new utilizable insights generation and big data processing.

Conclusion. Machine learning is a group of technologies that can become a cornerstone for dealing with various medical problems. But still, we have some problems to solve before the intense implementation of such tools in the healthcare system.

Keywords: machine learning, biomedical data science, healthcare problems, biomedical data processing.

Relevance. Nowadays, information technologies (IT) have a critical role in almost every field of our life, including healthcare. The development of the Biomedical Data Science sphere interconnects with gathering a significant mass of open electronic health records, developing new algorithms, and increasing computing power. Moreover, Biomedicine is one of the fastest-growing areas of knowledge over the past 30 years. As the statistics on PubMed show, in most areas of biology and medicine, the number of scientific articles doubles every few years. A large amount of data creates as possibilities as challenges, along with the development of data science allows structuring this information and, therefore, accesses it faster, using it more efficiently, generating new insights. It gives the possibility to solve a wide range of existing problems, which provides opportunities for both healthcare providers and patients. Diagnostic uncertainty is a weighty problem for healthcare providers. This phenomenon

defines as a “subjective perception of an inability to provide an accurate explanation of the patient’s health problem” [1]. According to the meta-analyzes article published in 2020, at least 0.7% of adult admissions involve a harmful diagnostic error [2]. Diagnostic uncertainty can lead to diagnostic delays, over-testing, and diagnostic errors, which can result in inadequate treatment prescription [3]. Based on the Global Health Data Exchange, 105,788 people died in 2019 from adverse effects of medical treatment, showing an increase of more than 1 percent compared to 1990. Dynamics show slow but persisting growth of iatrogenic harm for patients. We can interpret this fact as “adverse effects of healthcare system development,” which happened owing to fast data accumulation about new details and methods of diagnostics and treatment, which doctors can’t process successfully on their own in such short periods. The real numbers of iatrogenesis may be way higher than the following because to prove the adverse

effects of the treatment, full information about diagnostics and treatment should be stored and freely accessible [4]. Institute of Medicine (IOM) estimates the United States annually spends \$750 Billion in waste (approximately 30% of health care spending). IOM identified 6 waste domains: unnecessary services (\$210 billion annually); inefficient delivery of care (\$130 billion); excess administrative costs (\$190 billion); inflated prices (\$105 billion); prevention failures (\$55 billion), and fraud (\$75 billion) (www.theatlantic.com/health/archive/2012/09/how-the-us-health-care-system-wastes-750-billion-annually/262106/). Improving the quality of diagnostics and treatment by AI assistance in diagnosis of diseases, monitoring of general health, prediction of risks, treatment solutions, biomedical knowledge generation may significantly decrease costs for these domains in varying degrees. The current state of the health care system may improve with the integrated diagnostics. Integrated diagnostics is a combination of three independent diagnostic disciplines (radiology, pathology, and laboratory medicine) for therapeutic and diagnostic purposes using advanced information technology [5]. Machine learning (ML) algorithms may be an excellent tool for information collection and structurization as well as deep data analysis. Accurate diagnostics and treatment require both personal and general scientific data analysis. Personal medical data is successfully analyzed by a doctor, while the interpretation of large amounts of scientific data may significantly improve with artificial intelligence (AI). AI would also influence data storing, processing, and security as well as give some economic benefits. In this article, we will focus on the existing medical problems and their causes as well as possible solutions using ML.

METHOD

An analytical review of the literature on keywords from the scientometric databases Scopus, PubMed, Wiley. Search depth 7 years from 2013 to 2020.

RESULTS AND DISCUSSION

Relevant healthcare problems

As in any other area of our lives, the healthcare system evolves rapidly, but its development is unaccomplished. Lately, a lot of difficulties resolve, while some of them still exist. Analyzing previous researches, we have emphasized some of the most significant problems, which can be partially solved using ML algorithms as well as other methods of biomedical data science. Among them are diagnostics errors, delayed diagnostics (including during emergencies), overdiagnosis, bureaucracy, communication issues, “handoff” difficulties, which have a significant impact on the quality of healthcare. We will describe some of them as examples of cardiovascular system diseases, neurological disorders, oncology, and kidney disease.

1. Cardiovascular problems

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases (CVDs) are the number 1 cause of death globally. Heart attacks and strokes cause four out of five cardiovascular disease deaths. The proportion of deaths from non-communicable diseases is 41 million annually, leading to 71 % of deaths, respectively. Among them, cardiovascular disease is a global problem, killing 17.9 million people annually, or 31 % of all deaths each year [6]. Early diagnosis of atherosclerosis and blood clots may prevent complications such as stroke, heart attack, or pulmonary embolism. Late detection of atherosclerotic plaques can also lead to the development of aneurysms and problems with coronary, carotid, peripheral, renal arteries [7]. Early diagnostics has a significant effect on survival the earlier it carries out, the higher the chance of recovery [8]. Thus, monitoring of biomarkers as well as other predictors of CVDs that indicate the development of blood clots and atherosclerotic plaques can significantly improve the situation and reduce the total number of deaths related to the cardiovascular system. The rate of cholesterol testing two or more times in 3 years has been growing exponentially for the last twenty years. This tendency has a positive correlation with patients’ data accumulation, which gives more possibilities for efficient monitoring of lab test dynamics. Such an approach can be useful for any chronic disease. To illustrate that cholesterol level monitoring may be helpful as a predictor of cardiovascular events. As a result, we can enhance prophylactics and prescribe a preventive treatment, such as lipid-lowering drugs, before consequences develop [9].

According to WHO, CVDs, and two other groups of diseases (cancer and infectious diseases) are the main categories of average diagnostic errors in primary health care. Errors may occur when minor warning symptoms are missed or ignored in primary care [10]. Cross-analysis of a large population sample estimate from 15,000 to 165,000 misdiagnosed cerebrovascular events annually in United States emergency departments (EDs), disproportionately representing headache or dizziness. Some cerebrovascular diseases do not diagnose immediately, which can lead to mortality or disability of the patient [11]. Approximately 9% of cerebrovascular diseases go unnoticed at the initial ED presentation. The risk of misdiagnosis is higher if the patient’s complaints are minor, and the symptoms are mild, non-specific, or transient [12]. Another important one is deep vein thrombosis (DVT). There is a high risk of missing the diagnosis in a patient with deep vein thrombosis. According to Yuhong Zhang, the missed diagnosis of DVT in the lower extremities using ultrasound is about 50% in patients without DVT symptoms [13]. The most significant complication of DVT is pulmonary embolism (PE), which is a very life-threatening condition. PE may most likely lead to death without proper management, and its diagnostics may often delay clinical practice [14].

Also, there are a lot of errors related to cardiovascular medications. The ED and acute hospital is the most common locations at high risk for medication errors [15]. According to a study in 2016, cardiovascular drugs associate with 24.7% of medical errors. Among them, leading anticoagulants - 11.3% of the errors [16]. Besides, the use of incorrect doses of the drug and unnecessary drugs for the treatment of cardiovascular diseases can lead to the development of thrombosis [17].

2. Neurological disorders

2.1 Parkinson's disease. According to the statistics, about 1% of people over age 60 have Parkinson's disease (PD), and this percentage rises with aging [18]. In the case of early diagnosis, the efficiency of pharmacological management increases, and non-pharmacological management is also possible. The combination of these two approaches helps to manage present symptoms and prolongs an active and healthy life [19]. Early diagnostics may conduct with the help of neurochemical biomarkers, such as orexin, Dopamine, Dopamine receptors, and Dopamine Transporter Activity, α -Synuclein, and others [20]. PD misdiagnosing occurs in about 30% of all cases [21]. An accurate diagnosis of PD is essential both for patients care and researches associated with epidemiology, genetics, medical imaging, neurochemical biomarkers, and symptomatic and disease-modifying treatments [22].

2.2 Multiple sclerosis. Multiple sclerosis (MS) is a potentially disabling autoimmune disease without efficient treatment and exact etiology. It is characterized by immune-mediated attacks on the central nervous system (CNS) and following demyelination and reversible or relapsing neurological symptoms [23]. Hence, it is obviously expedient to generate new insights on early laboratory diagnostics of MS by analyzing big patient data. According to the statistics, MS affects approximately 900,000 people in the United States and 2.5 million people worldwide [24]. Following the statistics from studying in the UK, peak incidence occurred between ages 40 and 50 years and maximum prevalence between ages 55 and 60 years [25]. Early diagnosis of MS is possible as a combination of symptoms (lasting at least 24 hours) and clinical tests, including early biomarkers: oligoclonal bands, anti-MOG antibodies, antinuclear antibodies [26]. It helps to decrease the possibility of disability and to lower the secondary relapse rate [27]. Misdiagnosis of MS brings certain risks associated with not receiving early-stage treatment [28]. The diagnostic error usually occurs when different disorders that aren't associated with demyelination and inflammation processes expose symptoms typical for MS [29]. Alternative conditions may frequently suggest by the presence of "red flags" in the clinical presentation. These are atypical for MS signs, symptoms, or findings that should be detected and investigated by radiographic, clinical, or laboratory methods to reduce the possibility of MS misdiagnosis [29].

2.3 Alzheimer's disease. Alzheimer's disease (AD) is

a detrimental worldwide social problem. The prognosis estimates that the number of AD patients only in the USA will rise from 5 million to 14 million by 2050 [30]. According to WHO, the total number of patients with dementia may reach 82 million in 2030 and 152 million in 2050 [31]. AD should diagnose in the preclinical phase or while AD-induced mild cognitive impairment (MCI) to decrease the possibility of irreparable brain damage. Some people with MCI have returned normal cognition without dementia related to AD due to on-time diagnostics and treatment [30]. Diagnostics of AD with the help of biomarkers measurement may prevent a significant number of false-positive diagnoses, as opposed to alone guidelines diagnostics [32]. In perspective, early biomarkers will become a required part in monitoring the effects of AD treatment [30]. Detection and measurement of biomarkers are also a significant part of AD drug development. It allows identifying better compatibility between designed drug and patient for clinical trials [33]. That's why the biomarkers monitoring process should simplify in all stages: from diagnostics to treatment. Patients and people associated with diagnostics and treatment of AD should be able to get fast access to correct and relevant measured biomarkers.

3. Oncology

3.1. Thyroid cancer. Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine cancer [34]. TC's are often overdiagnosed in the USA and South Korea, mainly by ultrasonography [35][36]. The most common way of thyroid tumor management is a radical thyroidectomy. It provokes an increase in hypoparathyroidism incidence in South Korea [36]. In 2015, the Korean Committee for National Cancer Screening Guidelines issued a recommendation against thyroid cancer screening with ultrasonography for healthy individuals [37]. Thyroid cancer has an estimated 5-year survival of 98.1% overall: 99.9% for localized disease and 55.5% for distant disease [34]. It may indicate that thyroidectomy may be irrational in some cases. So, harm from disease management may be more significant than one from the tumor itself. Fine-needle aspiration is the most common method in the diagnosis of TC. When performed, 70% of all thyroid tumors classify as benign, 4.0% as malignant, and 10% as suspicious or indeterminate, and 17% demonstrate an insufficient sample [38]. There are some non-specific biomarkers that may indicate a presence of the thyroid tumor [39] that all together and in combination with other existing diagnostic methods can more accurately suggest a possibility of TC. This approach will provide a more accurate prescription of thyroidectomy.

3.2. Prostate Cancer. Prostate Cancer (PC) is the second most common cancer in men. In the USA, 33,330 deaths occur from prostate cancer [34]. The implementation of the prostate-specific antigen (PSA) test increased the level of prostate cancer detection, resulting in overdiagnosis and overtreatment [40]. Undergoing radical pros-

tactomy or radiation therapy may lead to some complications (urinary symptoms, operative mortality) as well as long-term sequelae (urinary incontinence, impotence, and bowel dysfunction) [41]. In our opinion, a PSA blood test alone is not enough for the diagnosis, so we need more specific biomarkers (BM's) [42].

4. Kidney disease

Chronic kidney disease (CKD) is a significant disorder that affects a lot of people around the world. Over \$1 trillion is spent globally on end-stage renal disease care [43]. Unfortunately, it's often recognizable only by laboratory abnormalities in the latest stages. Late diagnostic caused no effective kidney disease treatment development [44] and may limit the number of BM's for early disease detection. Measuring glomerular filtration rate (GFR) is a "gold standard" for CKD assessment, but not specific enough, especially during the early stages of the disease [45]. There is a bid amount of BM's associated with kidney damage and, or loss of function, which can implement via ML methods for CKD management [46]. Factors such as age, gender, race, and family history are crucial for CKD. Moreover, hypertension, smoking, diabetes mellitus, and obesity can also lead to kidney disease. It's critical for patients and doctors to notion all aspects of effective diagnostics and treatment. Normal renal senescence and physiological loss of GFR should be noticed and differentiated from life-threatening signs of CKD. Complete analysis of the patient's data: including his age, comorbidity, in complex with albuminuria, GFR, and early biomarkers of kidney damage is a potentially efficient tool in CKD diagnostics and management [47].

Healthcare problems and data processing

Such tools as electronic health records gave a push for biomedical data science development but still, it doesn't look like we can use that vast amounts of data fluently. According to The Joint Commission Center for Transforming Healthcare Hand-off Communications Project, "hand-off is a transfer and acceptance of patient care responsibility achieved through effective communication". The hand-off is a process of medical information transmission from one health care provider to another for treatment or diagnostic propose. There are more than 4,000 hand-offs in a typical teaching hospital every day (<https://psnet.ahrq.gov/web-mm/triple-handoff>). A lot of essential information may get lost during a patient's data transfer between healthcare providers. The electronic health record system became a grandiose invention, which solved this problem to a large extent, but it still partially exists. Another serious difficulty is receiving essential medical data for urgent patient management when his person is unidentified. As we can see in modern devices, it may be partially solved by data storage on smartphones or other devices and proper linking these local systems to the electronic health record system. It also would be great to give patients the possibility to

participate in their biomedical data replenishment, but only under the doctor's control.

Such tools as electronic health records gave a push for biomedical data science development but still, it doesn't look like we can use that vast amounts of data fluently. We mentioned many BM's that may successfully use for the improvement activities in particular diseases diagnostics and management. But to do so, a lot of scientific information should be identified, analyzed, and verified in detail before the implementation of them in clinical practice. With the help of AI, we can gather a large amount of data about potential BM's from science resources like PubMed for diagnostic improvement. ML algorithms can become an excellent instrument for such BM's significance assessment and defining their role in disease diagnostics and management. Utilizing such an approach can potentially solve problems of overdiagnosis we have shown in part about oncology, help predict and detect chronic diseases in early stages and, generally, partially solve the problems we have listed earlier.

Comprehensive analysis of the patient's data: including his age, sex, race, comorbidity in complex with utilizing suitable diagnostic methods, as well as general scientific data is a promising tool for the healthcare future.

Machine learning algorithms and biomedical data processing

Decision-making in medicine is a responsible and complex task that requires taking into account a huge number of factors. Depending on the field of medicine, these factors and their number may vary, but even so, we can identify the most fundamental among them:

- Patient Laboratory Data / Clinical History / Genomics Data
- Psychological state / Human conditions
- Consumption of pharmaceuticals

Modern science is trying to describe and digitize these factors. It should be noted that the assessment of such factors requires the adoption of both general information and personal data. Since a human body is a complex object, it is difficult to make deductive conclusions about its nature, therefore, personal information is valuable. On the other hand, it is rather difficult to interpret personal data, therefore, for making an informed decision, the best strategy is to focus both on patient data and global information.

In the current technological situation, artificial intelligence is not able to take over decision-making, but modern machine learning algorithms can be an excellent tool for medical professionals. Such systems should have the following properties (table1):

- Good accuracy: machine learning algorithms should have near or higher accuracy than physicians.
- Good explanation ability: output result of a system should be interpretable for physicians.
- Ability to work with missing and noisy data: it is a widespread situation in medicine when data are

missing on noisy, so algorithms should be less sensitive as possible for this situation.

- Ability to use different input data with is count minimization: it very time and cost expensive to use a lot of input variables, algorithms should be able to work with different data, whit minimal volume.

- High performance: algorithms must be able to train fast and efficiently.

- Large coverage of output variables: the more output solutions a system has to offer, the higher its value.

- High differentiation power: there are a lot of subtypes of some diseases, so it is important to create very detailed systems for their classification.

We can highlight the following areas of medicine in which machine learning is actively implemented: diagnosis of diseases, monitoring of general health, prediction of risks, treatment solutions, biomedical knowledge generation. In general, the proliferation of machine learning in clinical practice is lagging behind the potential possible, given the opportunities already available.

Diagnosis of diseases is a classical topic, which people associate with using machine learning in medicine. Formally, this task can be described as predicting a certain class from the entire class pool based on input data, in the form of attributes for each patient. Lets, patient $P = \{p_1, p_2, \dots, p_k\}$, $|P|=k$, A is a set of attributes, $A = \{a_1, a_2, \dots, a_n\}$, $|A|=n$. A set of patients and their attributes form a matrix MAP, that is constructed by $P \times A$.

Set of classes $C = \{c_1, c_2, \dots, c_m\}$, for each row in MAP corresponds to some class, in the case of disease classification, each class is a specific disease. The task is based on a known predict class for new patient data, based on its attributes. The most popular classifiers are Support Vector Machine (SVM), Naive Bayes Classifiers, Random Forest, K-Nearest-Neighbour (KNN), neural network classifiers. In Table 1, we have shortly described them, their advantages and disadvantages.

A very prospective field is using external knowledge graphs for improving medical diagnosis results [48]. Knowledge graph $g = \{N, R\}$ is a set of medical entities as nodes (N) and relations between these entities {R}.

Sometimes we do not have a set of classes, but we want to subdivide and categorize sets of attributes. Examples of clustering algorithms are K-means Clustering, Agglomerative Clustering, Multikernel Learning algorithms, Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise (DBSCAN), Ordering Points To Identify the Clustering Structure (OPTICS).

Biomedical data security

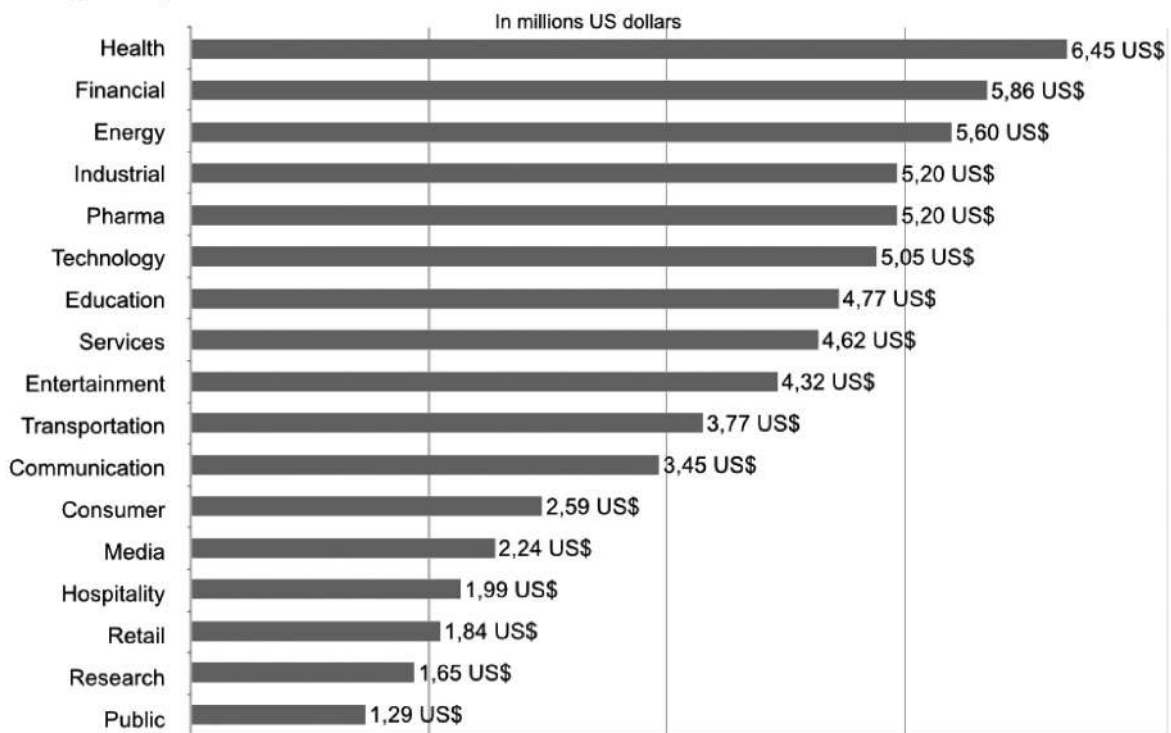
Accumulation of patients’ personal medical information, creation of new services for its archivation and processing caused the manifestation of an essential problem with data security. According to the Digital Guardian analysis published in 2019, the average total cost of a data breach by industry was the highest in the healthcare

Table 1

The most popular machine learning technologies

Method	Principle	Advantage	Disadvantage
Support Vector Machine [50]	Input vectors are non-linearly mapped to a very high-dimension feature space, where a linear decision surface is constructed.	<ul style="list-style-type: none"> · High accuracy · Work well with high dimensional space · Use less memory 	<ul style="list-style-type: none"> · High training time · Don't work well with overlapping classes
Simple Bayesian classifiers [51]	Probabilistic approaches, that make assumptions about how the data is generated, and posit a probabilistic model that embodies these assumptions; then they use a collection of labeled training examples to estimate the parameters of the generative model, classification of new examples is performed with Bayes' rule.	<ul style="list-style-type: none"> · Easy to implement · High performance · High explanation ability 	<ul style="list-style-type: none"> · Work bad, when there is a dependence between variables
Random forest	Random generation of a set of decision trees from a selected subset of a training set and making a conclusion about classification based on average result among them	<ul style="list-style-type: none"> · Fast to train with test data · Good explanation ability · Prevents overfitting of data 	<ul style="list-style-type: none"> · Slow in creating predictions once a model is made. · Must beware of outliers and holes in the data
K-Nearest-Neighbour	Classification occurs by determining the class to the k nearest neighbors, determined by a certain distance function, perhaps all Euclidean distance.	<ul style="list-style-type: none"> · Easy to implement · No training operations 	<ul style="list-style-type: none"> · High classification time · Missing values and outliers sensitivity
Neural Networks	Changing weights between layers with neurons in such a way as to minimize the selected loss function.	<ul style="list-style-type: none"> · Good accuracy · Ability take into account complex relationships 	<ul style="list-style-type: none"> · Low explanation ability · Possibility of local minimum · Possibility of overfitting

Figure 1:
Average total price of breached data in different industries



<https://digitalguardian.com/blog/whats-cost-data-breach-2019>

Fig. 1. Average total price of breached data in different industries

industry (\$429 per healthcare record) (Fig. 1) (<https://digitalguardian.com/blog/whats-cost-data-breach-2019>).

The reason for this phenomenon is that personal medical information cannot be changed once it was stolen, on the opposite of credit card or social insurance data. It can be proved with the annual report of the IBM company and Ponemon Institute, which states that the average data leakage cost in 2019 was 3,92 million dollars, while for healthcare it was 6,45 million dollars, two times higher than in any other field. From 2005 to 2019, 249,09 million people suffered from a data breach in healthcare and we can notice that the number of HACKs was consistently growing during this period [49].

Data breach in the insurance company Premera Blue Cross can be a good example of hacking. In May 2014, an employee of this company received a phishing email with a link to the document, which contained malware that allowed a malefactor to enter an internal network of the company and theft the medical data of 11 million people (<https://cutt.ly/6zDBjZG>). It's also important to protect portative devices from the access of the third person as happened in Chicago in 2013 when 4 unencrypted computers were stolen from Advocate Medical Group. 4 million patients suffering from this incident and financial loss was assessed to be billions of dollars (www.healthcareitnews.com/news/Advocate-Health-slapped-with-lawsuit-after-massive-data-breach). It should be noticed that data breaches can be caused not only by external attacks but also from the inside.

It's crucially important to constantly upgrade systems that work with biomedical data because their malfunction can lead to wrong treatment and lethal outcomes, as happened in the hospital in Germany in 2020 (www.wired.com/story/a-patient-dies-after-a-ransomware-attack-hits-a-hospital/#:~:text=A woman seeking emergency treatment, was widely reported on Thursday). AI-based systems, which we review in this article as a prospective accessory diagnostic instrument, require supporting mechanisms to confirm the authenticity of the data they operate. AI implementation in the healthcare system requires standardization of data sets it works with to prevent inaccurate results. Such systems, especially their data sets, must be protected from all types of data breaches. It's important not only to provide technical innovations in data security but also to check on the employees that have access to this information, implement the multi-layer revision of all the changes. Both for just storing patients' information and operating on it using AI-based systems, we can list some general recommendations for biomedical data security: use of anti-malware solutions and protection networks with effective firewalls; use of multi-factor authentication; use of security patch management, anti-social engineering, and phishing programs; investing in cybersecurity insurance; data encryption; creating reliable backups; investing in employee training; conducting frequent audits of the cybersecurity system.

Contributors. All the authors did the literature search, read, and agreed to the final manuscript.

Declaration of interests. We declare no competing interests.

CONCLUSION

In this article, we have detected some severe healthcare system problems and reviewed their possible solutions using ML algorithms. Based on our analysis, the healthcare system was upgraded significantly by inventions like HER's, but still, we have target points for its improvement. Machine learning is a group of technologies that can become a cornerstone for dealing with various medical problems. Utilizing various types of AI will be useful for the understanding of the risk factors, behavioral patterns, and features of the therapeutic pathway to provide adequate in-time treatment. To implement this technique, healthcare should focus on big data accumulation and structurization, making the substrate for further investigations and market development. It's necessary to provide an interdisciplinary approach for universal AI formation, concentrating on the realization of technologies for global scientific data mining and processing. This strategy will give us the possibility to use AI as a full-fledged accessory diagnostic instrument and improve many medical issues. The application of ML algorithms, in perspective, can provide a tool for comparison outputs of laboratory and clinical studies with existing healthcare standards in order to help in the development of more advanced diagnostic methods and personalized treatment by generating new insights and detecting hidden corrections. All of the mechanisms described above will allow gathering large amounts of big data that will set a stage for the future development of biomedical data science. The development of AI-based systems requires control over the data it works with to provide accurate and reliable results. Weighty economic benefits to be expected for patients and the healthcare system in general. We believe that in the near future AI will become a fully functional diagnostic instrument, collaborating with physicians in order to provide the best quality of medical services. We believe, it will be possible for future AI's to substantially optimize healthcare reducing, making the lives of both patients and healthcare providers a bit better.

REFERENCES

1. Bhise V, Rajan SS, Sittig DF, Morgan RO, Chaudhary P, Singh H. Defining and Measuring Diagnostic Uncertainty in Medicine: A Systematic Review. *J Gen Intern Med.* 2018 Jan;33(1):103-5. DOI: 10.1007/s11606-017-4164-1.
View at: Scopus: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11606-017-4164-1>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28936618/>
2. Gundersen CG, Bilan VP, Holleck JL, Nickerson P, Cherry BM, Chui P, Bastian LA, Grimshaw AA, Rodwin BA. Prevalence of harmful diagnostic errors in hospitalised adults: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Qual Saf.* 2020 Dec;29(12):1008-18. DOI: 10.1136/bmjqs-2019-010822.
View at: Publisher Site: <https://qualitysafety.bmj.com/content/29/12/1008>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269070/>
3. Singh H, Schiff GD, Graber ML, Onakpoya I, Thompson MJ. The global burden of diagnostic errors in primary care. *BMJ Qual Saf.* 2017 Jun;26(6):484-94. DOI: 10.1136/bmjqs-2016-005401.
View at: Publisher Site: <https://qualitysafety.bmj.com/content/26/6/484>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27530239/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5502242/>
4. Carver N, Gupta V, Hipskind JE. Medical Error. 2020 Oct 5. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. PMID: 28613514. Bookshelf ID: NBK430763
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613514/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430763/>
5. Lippi G, Plebani M. Integrated diagnostics: the future of laboratory medicine? *Biochem Med (Zagreb).* 2020 Feb 15;30(1):010501. DOI: 10.11613/BM.2020.010501.
View at: Publisher Site: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/30/1/10.11613/BM.2020.010501>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31839719/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6904966/>
6. World Health Organization. Assessing National Capacity for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases Global Survey. *Global Survey 2015.* Geneva, 2016
View at: Publisher Site: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246223>
7. Fok PW, Lanzer P. Media sclerosis drives and localizes atherosclerosis in peripheral arteries. *PLoS One.* 2018 Oct 26;13(10):e0205599. DOI: 10.1371/journal.pone.0205599
View at: Publisher Site: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0205599>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30365531/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6203409/>
8. Taylor CJ, Ordóñez-Mena JM, Roalfe AK, Lay-Flurrie S, Jones NR, Marshall T, Hobbs FDR. Trends in survival after a diagnosis of heart failure in the United Kingdom 2000-2017: population based cohort study. *BMJ.* 2019 Feb 13;364:l223. DOI: 10.1136/bmj.l223.

- View at: Publisher Site: <https://www.bmj.com/content/364/bmj.l223>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30760447/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6372921/>
9. Doust J, Glasziou P. Monitoring in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2013 Aug;34(2):85-92.
 View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24151344/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799222/>
 10. Diagnostic Errors: Technical Series on Safer Primary Care. Geneva: World Health Organization; 2016. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 View at: Publisher Site: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-errors>
 URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252410/9789241511636-eng.pdf>
 11. Newman-Toker DE, Moy E, Valente E, Coffey R, Hines AL. Missed diagnosis of stroke in the emergency department: a cross-sectional analysis of a large population-based sample. *Diagnosis (Berl).* 2014 Jun;1(2):155-66. DOI: 10.1515/dx-2013-0038.
 View at: Publisher Site: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/dx-2013-0038/html>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344918/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5361750/>
 12. Tarnutzer AA, Lee SH, Robinson KA, Wang Z, Edlow JA, Newman-Toker DE. ED misdiagnosis of cerebrovascular events in the era of modern neuroimaging: A meta-analysis. *Neurology.* 2017 Apr 11;88(15):1468-77. DOI: 10.1212/WNL.00000000000003814
 View at: Publisher Site: <https://n.neurology.org/content/88/15/1468>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28356464/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386439/>
 13. Zhang Y, Xia H, Wang Y, Chen L, Li S, Hussein IA, Wu Y, Shang Y, Yao S, Du R. The rate of missed diagnosis of lower-limb DVT by ultrasound amounts to 50% or so in patients without symptoms of DVT: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019 Sep;98(37):e17103. DOI: 10.1097/MD.00000000000017103.
 View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2019/09130/The_rate_of_missed_diagnosis_of_lower_limb_DVT_by.32.aspx
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31517841/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6750306/>
 14. Walen S, Damoiseaux RA, Uil SM, van den Berg JW. Diagnostic delay of pulmonary embolism in primary and secondary care: a retrospective cohort study. *Br J Gen Pract.* 2016 Jun;66(647):e444-50. DOI: 10.3399/bjgp16X685201.
 View at: Publisher Site: <https://bjgp.org/content/66/647/e444>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27114207/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4871310/>
 15. Michaels AD, Spinler SA, Leeper B, Ohman EM, Alexander KP, Newby LK, Ay H, Gibler WB; American Heart Association Acute Cardiac Care Committee of the Council on Clinical Cardiology, Council on Quality of Care and Outcomes Research; Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative, and Resuscitation; Council on Cardiovascular Nursing; Stroke Council. Medication errors in acute cardiovascular and stroke patients: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2010 Apr 13;121(14):1664-82. DOI: 10.1161/CIR.0b013e3181d4b43e.
 View at: Publisher Site: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0b013e3181d4b43e>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20308619/>
 16. Muroi M, Shen JJ, Angosta A. Association of medication errors with drug classifications, clinical units, and consequence of errors: Are they related? *Appl Nurs Res.* 2017 Feb;33:180-5. DOI: 10.1016/j.apnr.2016.12.002.
 View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0897189716303767?via%3Dihub>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28096015/>
 17. Gelchu T, Abdela J. Drug therapy problems among patients with cardiovascular disease admitted to the medical ward and had a follow-up at the ambulatory clinic of Hiwot Fana Specialized University Hospital: The case of a tertiary hospital in eastern Ethiopia. *SAGE Open Med.* 2019 Jul 18;7:2050312119860401. DOI: 10.1177/2050312119860401.
 View at: Publisher Site: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2050312119860401>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31367379/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6643177/>
 18. Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev.* 2014 Mar;14(100):19-30. DOI: 10.1016/j.arr.2014.01.004.
 View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163714000051?via%3Dihub>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24503004/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989046/>
 19. Rees RN, Acharya AP, Schrag A, Noyce AJ. An early diagnosis is not the same as a timely diagnosis of Parkinson's disease. *F1000Res.* 2018 Jul 18;7:F1000 Faculty Rev-1106. DOI: 10.12688/f1000research.14528.1.eCollection 2018
 View at: Publisher Site: <https://f1000research.com/articles/7-1106/v1>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30079229/>
 PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6053699/>

20. Emamzadeh FN, Surguchov A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. *Front Neurosci.* 2018 Aug 30;12:612. DOI: 10.3389/fnins.2018.00612.
View at: Publisher Site: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00612/full>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30214392/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125353/>
21. Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord.* 2017 Sep;32(9):1264-310. DOI: 10.1002/mds.27115.
View at: Publisher Site: <https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.27115>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887905/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5685546/>
22. Adler CH, Beach TG, Hentz JG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E, Sabbagh MN, Sue LI, Jacobson SA, Belden CM, Dugger BN. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. *Neurology.* 2014 Jul 29;83(5):406-12. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000641.
View at: Publisher Site: <https://n.neurology.org/content/83/5/406>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24975862/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4132570/>
23. Lane M, Yadav V. Multiple Sclerosis. *Textbook of Natural Medicine.* 2020:1587-1599.e3. DOI: 10.1016/B978-0-323-43044-9.00199-0.
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323430449001990?via%3Dihub>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7348625/>
24. Culpepper WJ, Marrie RA, Langer-Gould A, Wallin MT, Campbell JD, Nelson LM, Kaye WE, Wagner L, Tremlett H, Chen LH, Leung S, Evans C, Yao S, LaRocca NG; United States Multiple Sclerosis Prevalence Workgroup (MSPWG). Validation of an algorithm for identifying MS cases in administrative health claims datasets. *Neurology.* 2019 Mar 5;92(10):e1016-e1028. DOI: 10.1212/WNL.0000000000007043.
View at: Publisher Site: <https://n.neurology.org/content/92/10/e1016>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30770432/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6442008/>
25. Mackenzie IS, Morant SV, Bloomfield GA, MacDonald TM, O'Riordan J. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the UK 1990-2010: a descriptive study in the General Practice Research Database. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 2014;85:76-84. DOI: 10.1136/jnnp-2013-305450
View at: Publisher Site: <https://jnnp.bmj.com/content/85/1/76>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24052635/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3888639/>
26. Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 23;16(1):272. DOI: 10.1186/s12974-019-1674-2.
View at: Publisher Site: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-019-1674-2>
27. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018 Feb;17(2):162-73. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
View at: Publisher Site: [https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422\(17\)30470-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanneur/article/PIIS1474-4422(17)30470-2/fulltext)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29275977/>
28. Kaisey M, Solomon AJ, Luu M, Giesser BS, Sicotte NL. Incidence of multiple sclerosis misdiagnosis in referrals to two academic centers. *Mult Scler Relat Disord.* 2019 May;30:51-6. DOI: 10.1016/j.msard.2019.01.048.
View at: Publisher Site: [https://www.msard-journal.com/article/S2211-0348\(19\)30048-3/fulltext](https://www.msard-journal.com/article/S2211-0348(19)30048-3/fulltext)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30738280/>
29. Solomon AJ. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2019 Jun;25(3):611-35. DOI: 10.1212/CON.0000000000000728.
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/continuum/Abstract/2019/06000/Diagnosis,_Differential_Diagnosis,_and.5.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31162308/>
30. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2020 Mar 10. DOI: 10.1002/alz.12068.
View at: Publisher Site: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/alz.12068>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32157811/>
31. World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia 2017-2025. Geneva

2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
View at: Publisher Site: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259615>
URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259615/9789241513487-eng.pdf?sequence=1>
32. Bloudek LM, Spackman DE, Blankenburg M, Sullivan SD. Review and meta-analysis of biomarkers and diagnostic imaging in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;26(4):627-45. DOI: 10.3233/JAD-2011-110458.
View at: Publisher Site: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad110458>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21694448/>
33. McKhann GM, Albert MS, Sperling RA. Changing diagnostic concepts of Alzheimer's disease. In: Hampel H, Carrillo MC, eds. *Alzheimer's disease – Modernizing concept, biological diagnosis and therapy*. Basel, Switzerland: Karger; 2012: p. 115–21.
View at: Publisher Site: <https://www.karger.com/Book/Home/256724>
Scielo: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-61632013000200007
34. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21590.
View at: Publisher Site: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21590>
35. Morris LG, Tuttle RM, Davies L. Changing Trends in the Incidence of Thyroid Cancer in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016 Jul 1;142(7):709-11. DOI: 10.1001/jamaoto.2016.0230.
View at: Publisher Site: <https://jamanetwork.com/journals/jamaotolaryngology/fullarticle/2513194>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27078686/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4956490/>
36. Ahn HS, Kim HJ, Welch HG. Korea's thyroid-cancer "Epidemic" – screening and overdiagnosis. *N Engl J Med*. 2014 Nov 6;371(19):1765-7. DOI: 10.1056/NEJMp1409841.
View at: Publisher Site: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMp1409841>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25372084/>
37. Ahn HS, Welch HG. South Korea's Thyroid-Cancer "Epidemic" – Turning the Tide. *N Engl J Med*. 2015 Dec 10;373(24):2389-90. DOI: 10.1056/NEJMc1507622.
View at: Publisher Site: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1507622>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26650173/>
38. Theoharis CG, Schofield KM, Hammers L, Udelsman R, Chhieng DC. The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1215-23. DOI: 10.1089/thy.2009.0155.
View at: Publisher Site: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2009.0155>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19888859/>
39. Wang W, Chang J, Jia B, Liu J. The Blood Biomarkers of Thyroid Cancer. *Cancer Manag Res*. 2020 Jul 6;12:5431-8. DOI: 10.2147/CMAR.S261170.
View at: Publisher Site: <https://www.dovepress.com/the-blood-biomarkers-of-thyroid-cancer-peer-reviewed-fulltext-article-CMAR>
40. Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jan 31;(1):CD004720. DOI: 10.1002/14651858.CD004720.pub3.
View at: Publisher Site: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004720.pub3/abstract>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23440794/>
41. Prabhu V, Lee T, McClintock TR, Lepor H. Short-, Intermediate-, and Long-term Quality of Life Outcomes Following Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Rev Urol*. 2013;15(4):161-77.
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24659913/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3922321/>
42. Qu M, Ren SC, Sun YH. Current early diagnostic biomarkers of prostate cancer. *Asian J Androl*. 2014 Jul-Aug;16(4):549-54. DOI: 10.4103/1008-682X.129211.
View at: Publisher Site: <https://www.ajandrology.com/article.asp?issn=1008-682X;year=2014;volume=16;issue=4;spage=549;epage=554;aulast=Qu>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24830695/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4104079/>
43. Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med*. 2010 Nov;268(5):456-67. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2010.02269.x.
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2796.2010.02269.x>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20809922/>
44. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C; Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005 Aug 17;294(7):813-8. DOI: 10.1001/jama.294.7.813.
View at: Publisher Site: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/201386>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16106006/>
45. Bosch JP. Renal reserve: a functional view of glomerular filtration rate. *Semin Nephrol*. 1995 Sep;15(5):381-5.
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8525139/>
46. Herrera J, Rodríguez-Iturbe B. Stimulation of tubular secretion of creatinine in health and in conditions as-

- sociated with reduced nephron mass. Evidence for a tubular functional reserve. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Mar;13(3):623-9. DOI: 10.1093/ndt/13.3.623. View at: Academic: <https://academic.oup.com/ndt/article/13/3/623/1848120>
47. Glasscock RJ, Denic A, Rule AD. The conundrums of chronic kidney disease and aging. *J Nephrol*. 2017 Aug;30(4):477-83. DOI: 10.1007/s40620-016-0362-x. View at: Scopus: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40620-016-0362-x> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27885585/>
48. Jiang J, Li X, Zhao C, Guan Y, Yu Q. Learning and inference in knowledge-based probabilistic model for medical diagnosis. *Knowledge-Based Systems*. 2017;138: 58-68, ISSN 0950-7051. DOI: 10.1016/J.KNOSYS.2017.09.030. View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950705117304495?via%3Dihub> Publisher Site: <https://dl.acm.org/doi/abs/10.1016/j.knosys.2017.09.030> Booksc: <https://ur.booksc.eu/book/67269701/cc2c8c>
49. Seh AH, Zarour M, Alenezi M, Sarkar AK, Agrawal A, Kumar R, Khan RA. *Healthcare Data Breaches: Insights and Implications*. Healthcare (Basel). 2020 May 13;8(2):133. DOI: 10.3390/healthcare8020133. View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/2227-9032/8/2/133> PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32414183/> PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7349636/>
50. Cortes C, Vapnik V. Support-vector networks. *Mach Learn*. 1995; 20: 273-97. DOI: 10.1007/BF00994018 View at: Scopus: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00994018> URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/bf00994018.pdf>
51. McCallum A, Nigam K. A comparison of event models for naive bayes text classification. In: AAAI-98 workshop on learning for text categorization. 1998, July;752(1): 41-8. View at: Bibsonomy: <https://www.bibsonomy.org/bibtex/2fa46d1cc0dd56ab40a7f722e569a1fd3/jil> URL: <https://www.cs.cmu.edu/~knigam/papers/multi-nomial-aaaiws98.pdf>

Article history
Received: 18.04.2021
Revision requested: 02.06.2021
Revision received: 29.07.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

ВПРОВАДЖЕННЯ АЛГОРИТМІВ МАШИННОГО НАВЧАННЯ В СИСТЕМІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ НАПРЯМОК ДЛЯ НАУКИ, ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я ТА БІЗНЕСУ

Василевський В., Степанов І., Коваль Р., Сопутняк М., Лютянська Н., Шейко В., Ставничий Т.

Товариство з обмеженою відповідальністю BIONITY, Київ, Україна

byblikpeper@gmail.com

Актуальність. Сучасний стан медицини є недосконалим. Серед основних проблем можна виділити діагностику і лікування захворювань. Труднощі роботи з біомедичними даними є серйозним обмежуючим фактором у вирішенні найважливіших завдань охорони здоров'я, які представлені в статистично достовірних групах захворювань. Велика кількість даних в природничих науках створює як можливості, так і проблеми для їх ефективного використання в клінічній практиці. Інструменти на основі машинного навчання необхідні для генерації нових ідей і виявлення нових прихованих закономірностей, особливо при великих наборах даних. Рішення на основі штучного інтелекту можуть успішно використовуватися для діагностики захворювань, моніторингу загального стану здоров'я, прогнозування ризиків, прийняття рішень для лікування і отримання біомедичних знань.

Ціль: проаналізувати потенціал алгоритмів машинного навчання в охороні здоров'я на існуючих проблемах і зробити прогноз їх розвитку в найближчому майбутньому.

Метод. Аналітичний огляд літератури по ключовим словам із наукометричних баз даних Scopus, PubMed, Wiley. Глибина пошуку 7 років з 2013 по 2020 рік.

Результати. Аналізуючи сучасний загальний стан системи охорони здоров'я, ми виділили найбільш актуальні проблеми, пов'язані з діагностикою, лікуванням і системним управлінням: помилки діагностики, пізня діагностика (в тому числі під час надзвичайних ситуацій), гіпердіагностика, бюрократія, проблеми з комунікацією і труднощі передачі даних. Ми вивчили деталі процесу, зручного для прийняття рішень в клінічному середовищі, для того, щоб визначити точні моменти, які можуть бути значно поліпшені за допомогою рішень, прийнятих на основі штучного інтелекту, в тому числі: діагностика захворювань, моніторинг загального стану здоров'я, прогнозування ризиків, рішення про лікування і отримання біомедичних знань. Ми позначили алгоритми машинного навчання як перспективний інструмент для діагностики та лікування захворювань, а також для генерації нових корисних ідей і обробки великих наборів даних.

Висновок. Машинне навчання – це група технологій, які можуть стати основним фактором для вирішення різних медичних проблем. Але все ж є ряд проблем, які потрібно вирішити перед інтенсивним впровадженням таких інструментів в систему охорони здоров'я.

Ключові слова: машинне навчання, біомедичні дані, проблеми охорони здоров'я, обробка біомедичних даних

ВНЕДРЕНИЕ АЛГОРИТМОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В СИСТЕМЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ДЛЯ НАУКИ, ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И БИЗНЕСА

Василевский В., Степанов И., Коваль Р., Сопутняк М., Лютянская Н., Шейко В., Ставничий Т.

Общество с ограниченной ответственностью BIONITY, Киев, Украина

byblikpeper@gmail.com

Актуальность. Современное состояние медицины несовершенно. Среди основных проблем можно выделить диагностику и лечение заболеваний. Трудности работы с биомедицинскими данными являются серьезным ограничивающим фактором в решении важнейших задач здравоохранения, которые представлены в статистически достоверных группах заболеваний. Большое количество данных в естественных науках создает как возможности, так и проблемы для их эффективного использования в клинической практике. Инструменты на основе машинного обучения необходимы для генерации новых идей и обнаружения новых скрытых закономерностей, особенно при больших наборах данных. Решения на основе искусственного интеллекта могут успешно использоваться для диагностики заболеваний, мониторинга общего состояния здоровья, прогнозирования рисков, принятия решений для лечения и получения биомедицинских знаний.

Цель: проанализировать потенциал алгоритмов машинного обучения в здравоохранении на существующих проблемах и сделать прогноз их развития в ближайшем будущем.

Метод. Аналитический обзор литературы по ключевым словам из наукометрических баз данных Scopus, PubMed, Wiley. Глубина поиска 7 лет с 2013 по 2020.

Результаты. Анализируя современное общее состояние системы здравоохранения, мы выделили наиболее актуальные проблемы, связанные с диагностикой, лечением и системным управлением: ошибки диагностики, поздняя диагностика (в том числе во время чрезвычайных ситуаций), гипердиагностика, бюрократия, проблемы с коммуникацией и трудности передачи данных. Мы изучили детали процесса, удобного для принятия решений в клинической бреде, для того, чтобы определить точные моменты, которые могут быть значительно улучшены с помощью решений, принятых на основе искусственного интеллекта, в том числе: диагностика заболеваний, мониторинг общего состояния здоровья, прогнозирование рисков, решения о лечении, и получение биомедицинских знаний. Мы обозначили алгоритмы машинного обучения как перспективный инструмент для диагностики и лечения заболеваний, а также для генерации новых полезных идей и обработки больших наборов данных.

Вывод. Машинное обучение – это группа технологий, которые могут стать основным фактором для решения различных медицинских проблем. Но все же есть ряд проблем, которые нужно решить перед интенсивным внедрением таких инструментов в систему здравоохранения.

Ключевые слова: машинное обучение, биомедицинские данные, проблемы здравоохранения, обработка биомедицинских данных

3D PRINTING OF A LOWELL MAKES MASK IN PLA

¹ Elmoutawakkil Nidal <https://orcid.org/0000-0003-2524-9286>

² Seffar Alae-Eddine <https://orcid.org/0000-0002-3741-4341>

³ Elmoutawakkil Dalal

³ Hacib Nabil

¹ Bellemkhannate Samira

¹ Casablanca's Dental Consultation and Treatment Center, Casablanca, Morocco

² University Hospital Center Ibn Rochd, Casablanca, Morocco

³ The private sector in orthodontics and implantology, Casablanca, Morocco

nidalelmoutawakkil@yahoo.fr

Relevance: The new pandemic crisis caused by the Covid19 virus has led to a global shortage of personal protective equipment including FFP2 masks necessary for the exercise of professionals in direct contact with positive patients.

Objective: 3D print a PLA mask similar to the FFP2 mask with the addition of an ULPA filter

Methods. The designed mask is based on the general morphology of the FFP2 standard. This is how we downloaded the prototype of the «LOWELL MAKES». We have adapted this prototype to our craniofacial dimensions on the «Meshmixer» software, to finally export the prototype in STL format to print it by fused deposition modeling (FDM) via the 3D printer «XYZ Junior 1.0» equipped with a PLA (polylactic acid) filament.

Results. The total duration of the printing of the full mask (the cover, the body of the mask, and the retentive filter grid) was around 4h30 min. Regarding the choice of the filter, we opted for two solutions, the first to cut an FFP2 mask and to use the parts obtained as being filters (doubled), the second being a commercial ULPA or HEPA filter. A ULPA (Ultra Low Penetration Air) filter can theoretically filter dust, pollen, and bacteria from the air with an efficiency of 99.999 % thanks to a size of 0.1 microns. Remember that the average size of the Covid-10 virus is around 0.1 μm and that the porosity of the FFP2 mask allows particles to be filtered with a diameter of around 0.6 μm at 94 %. In order to maximize the filtering effect while wearing this mask, we opted for the interposition of a ULPA filter covered by an FFP2 filter. We tested the tightness of this mask by checking for side leaks by maintaining a stabilized sheet on the outer cover by suction during inhalation. We have also added to the edges of the mask in contact with the face a peripheral silicone seal, polymerized on the face, to avoid any marks or scars after removal of this mask while increasing the comfort of the practitioner. The protocol that we chose by superimposing two filters (the first having a porosity of 0.6 μm and the second of 0.1 μm) allowed us to potentiate the filtration. This allowed the filter to be used for 40 hours. The total cost price of the mask is around 9 €.

Conclusions. The «open source» community makes it possible to popularize 3D printing while making it easier for any 3D printer owner to appropriate their protective equipment at a reduced price, however, intellectual property remains a concern, in particular for medical parts that cannot be procured promptly during a pandemic crisis similar to that caused by the Covid-19 virus.

Keyword: Lowell Makes mask, PLA, 3D printing, ULPA filter.

Relevance. In the context of the new pandemic caused by the COVID-19 virus, the quarantine measures adopted have raised tensions and fears among the general public; A reckless consequence of this is the impulse purchase of personal protective equipment (PPE), leaving the health professionals who need it most in short supply; Besides, facing the globally declared quarantine state, the factories responsible for manufacturing this equipment have suspended their activity as well as their export. This is how members of the global 3D printing community embarked on the design of several reusable PPE with interchangeable filters, mainly manufactured using high-temperature filament extrusion office printers, the cost of which remains reduced. Until today, the PPE that is still needed mainly includes surgical masks, FFP2 masks, and respiratory hoods with controlled air purification. However, since this PPE is intended to be reusable, careful consideration should be given to compatibility with available disinfection techniques while ensuring

that all such devices are monitored on an ongoing basis for tightness and condition before each use.

To ensure the best fit, customization of these masks can be achieved in several ways:

- by printing several sizes
- by experimenting with flexible materials
- by surface scanning the faces to virtually adjust these masks on an individual basis.

Although this individualized approach may limit the production throughput, the improvement in final rendering and wearing comfort may justify this impact on throughput [1].

A 2004 study conducted by the National Institute for Occupational Safety and Health, involving 3,997 heads and a second study in 2005 suggesting a workplace protection factor (WPF) for respiratory masks, found together that there were substantial and significant differences between the effectiveness of one-size-fits-all face masks. The WPF regression analysis

found the most important of the 12 facial dimensions to be bigonial width, face width (bizgomatic width), face length (chin-saddle length), and nose protrusion (Fig. 1). Although not formally tested, the 2005 data was almost normally distributed and suggested a basis for three potential mask sizes. For the design of our model, we opted for a medium to large size mask for testing (Chin-Sellion = 132 mm, bigonial = 96 mm, nose = 43 mm) [2].

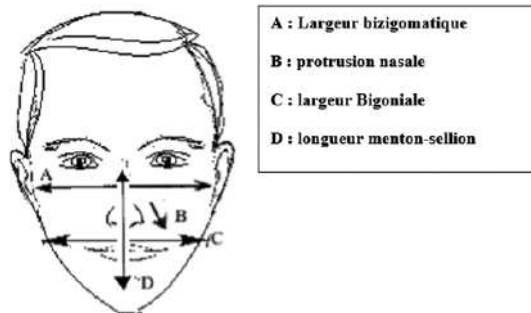


Fig. 1. Diagram of the four major metric values for the adaptation of the mask [3]

Nowadays, there are several versions of 3D printed masks, in parallel, The «FDA» (administration of food and drugs), the «NIH» (the national institute of health), and the «United States Veterans Association» are working together to validate and certify several prototypes of FFP2 masks, some of which are currently being tested. In the meantime, and on a more individual scale, many designs of face masks have been proposed and tested by researchers, physicians, and commercial entities with varying degrees of success. In any case, end users should clearly understand that only prototypes are available at this point and that they must pass several fit tests to assess their quality as PPE.

3D printing transmits a digital file to an additive manufacturing device such as a 3D printer to create a three-dimensional solid object layer by layer. Digital files are often made available to the general community in the creator's space in «STL», «OBJ» or even «CAD» formats. Digital files are processed, edited, and prepared in software such as «GrabCAD», «Meshmixer», «iiiSlic3r» and «Meshlab».

The Copper3D NanoHack Mask [4] illustrates the limitations of community-generated designs and wants design improvements based on local testing. This mask can be printed with a polylactic acid (PLA) filament as a flat part and is intended to be then manually assembled into its final three-dimensional configuration after heating to 55 to 60 ° C (131 to 140 F°) by forced hot air (e.g. a hairdryer) or by immersing it in hot water (Fig. 2). In particular, all joints should be manually sealed to ensure an airtight fit. The mask features a simple air inlet port into which two reusable filters can be inserted, with a screw cap to hold them in place. This design has several drawbacks, due to its

flat architecture, only one mask can be printed by most desktop printers at a time, which limits the throughput of manufacturing. Practically, initial tests have shown difficulty in folding these masks created using conventional PLA filament, with large gaps along the hard-to-mitigate knuckles. If sealed successfully, the mask may provide limited airflow for some users and a second breathing port can be envisioned by mirroring the first port on the design software. Due to these multiple limitations, this mask is currently undergoing revisions by the original designer.



Fig. 2. NanoHack Copper3D mask model [4]

The Thingiverse Kvatthro [5] user-designed HEPA mask can also be fabricated using most desktop printers. PLA filament is suggested due to the ability to adapt the mask to the individual wearer after exposure to heat, which is important to ensure the best possible seal under working conditions. This device is available in male and female versions and leaves room to insert an interchangeable HEPA filter into a port on the front of the mask (Fig. 3).



Fig. 3. HEPA mask design with a box for inserting the filter [5]

A similar design has been proposed by the Chinese company Creality [6], with a different configuration of the filter holder, intended for the insertion of layers of folded tissue or filters (Fig. 4).

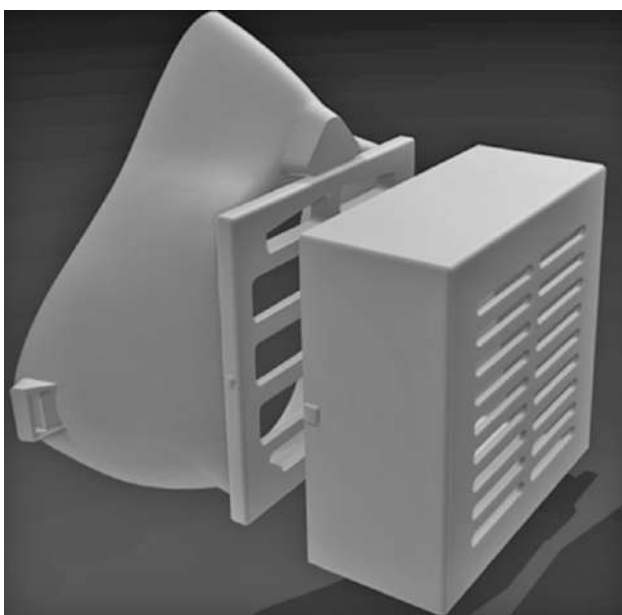


Fig. 4. Creality mask and goggles design [6]

The Lowell Makes mask is a variation of the replaceable front filter design which offers the advantage of printing without supports or adhesion [7] (Fig. 5). Although these masks are an alternative to FFP2 masks, they are not approved by the «FDA» or «NIOSH» or any other federal or state regulatory agency. They should not be considered as replacing an FFP2 mask, especially if the latter is available [8].

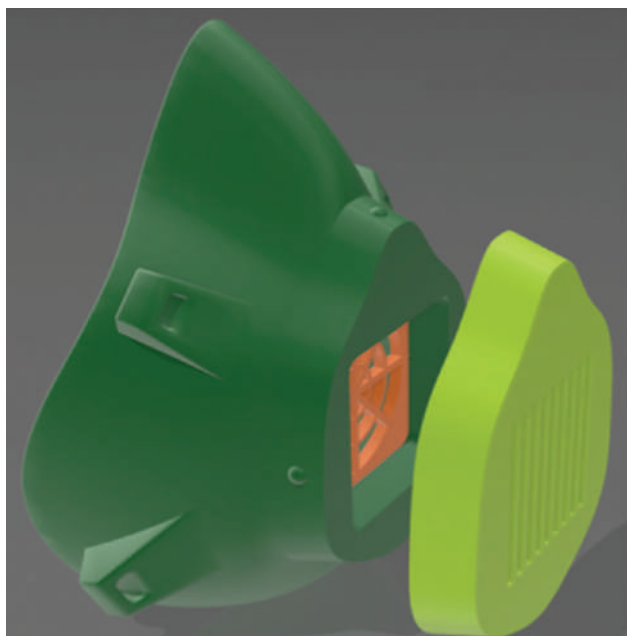


Fig. 5. Lowell Makes mask design, with the filter held in place by a grid inside the mask and a cap on the front of the mask [7]

MATERIAL AND METHOD

The designed mask is based on the general morphology of the FFP2 standard. This is how we downloaded the prototype of the «LOWELL MAKES» mask available

on the platform of the same firm. We have adapted this prototype to our craniofacial dimensions on the «Mesh-mixer» software, to finally export the prototype in STL format to print it by fused deposition modeling (FDM) via the printer available in the department of removable prosthodontics in the dental consultation and treatment center of Casablanca (Fig. 6).

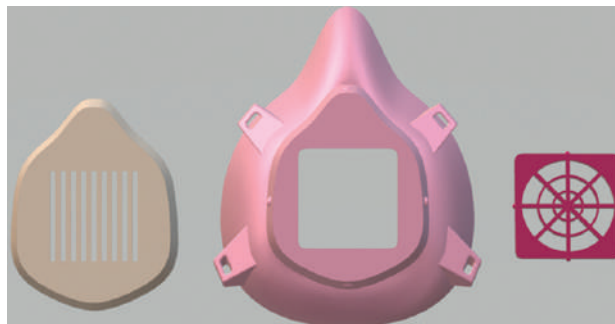


Fig. 6. Adaptation of the Lowell Makes mask prototype to our facial proportions [7]

RESULTS AND DISCUSSION

After exporting the STL file of each element making up the mask (the cover, the body of the mask, and the retentive filter grid) to the «XYZ Junior 1.0» 3D printer equipped with a PLA (polylactic acid) filament. The total duration of the printing of the full mask was around 4h30 min; the final rendering of the mask being smooth and free of any artifact, no finishing took place (Fig. 7).



Fig. 7. The final rendering of the mask being smooth and free of any artifact, no finishing took place

Regarding the choice of the filter, we opted for two solutions, the first to cut an FFP2 mask and to use the parts obtained as being filters (doubled), the second being a commercial ULPA or HEPA filter cut from a sold coil in large surfaces specializing in air filtration (Fig. 8).

HEPA (high-efficiency particulate air) filtration is a standard developed by the United States Energy Commission. HEPA filters are the world's most efficient way to filter the air from dirt, pollens, bacteria, and any particle in the air larger than 0.3µm. They are used in hospitals,



Fig. 8. Placement of the HEPA filter in the Lowells Makes mask printed in PLA cut from a coil

pharmaceutical companies, laboratories, and electronics companies to remove all fine dust. To qualify as HEPA, a filter must remove 99.97 % of 0.3-micron particles.

A ULPA (Ultra Low Penetration Air) filter can theoretically filter dust, pollen, and bacteria from the air with an efficiency of 99.999 % thanks to a size of 0.1 microns. Remember that the average size of the Covid-10 virus is around 0.1 μm and that the porosity of the FFP2 mask allows particles to be filtered with a diameter of around 0.6 μm at 94 %.

In order to maximize the filtering effect while wearing this mask, we opted for the interposition of a ULPA filter (U15, U 17) covered by an FFP2 filter.

We tested the tightness of this mask by checking for side leaks by maintaining a stabilized sheet on the outer cover by suction during inhalation, to maximize this seal the two filters were taped to the outer face of the orifice of the mask. Mask and the cover were fixed with tacks (Fig. 9).

Finally, to make it easier to wear the mask, we attached elastic bands to it in two ways, first putting an elastic on each side (left and right) to wear it around the outer pavilion of the ears, however, this method caused lesions and injuries to the ears, the second method being to adapt the length to the coronal diameter and to have an elastic band per side (top and bottom) making sure to cross them during the wearing, this last method not only makes wearing the mask easier but also facilitates also its implementation for veiled personnel.

We have also added to the edges of the mask in contact with the face a peripheral silicone seal, polymerized on the face, to avoid any marks or scars after removal of this mask while increasing the comfort of the practitioner.

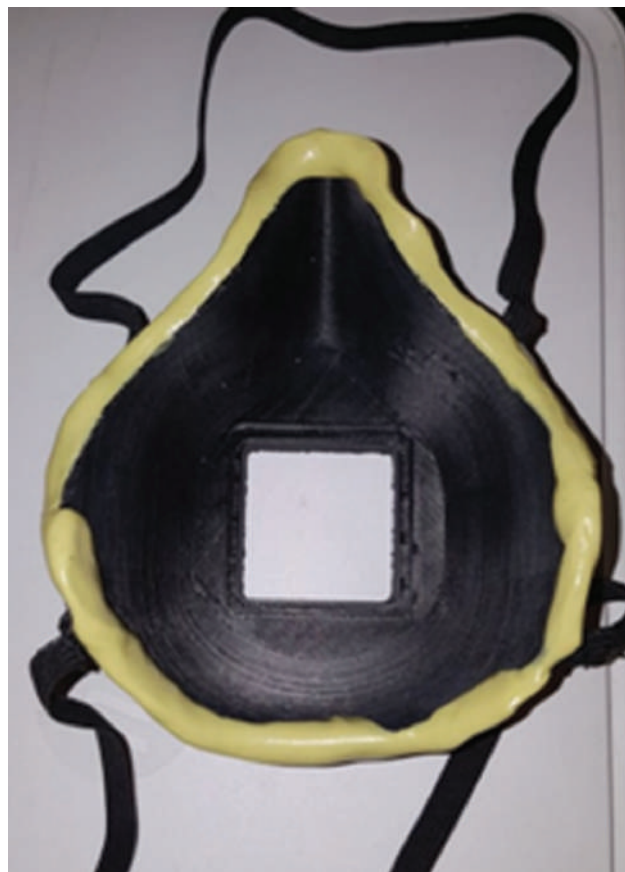


Fig. 9. Additional fixing of the cover using office tacks and addition of a heavy silicone flexible seal to the Lowells Makes mask printed in PLA

The French society of hospital hygiene (HF2H) as well as the WHO recommends changing the FFP2 mask after 8 hours of wearing or each time it is wet, taking into account the global shortage incurred during the past few months following the pandemic caused by the Covid-19 virus, the medical staff had to make reusable masks ready for disinfection [9].

The protocol that we chose by superimposing two filters (the first having a porosity of 0.6 μm and the second of 0.1 μm) allowed us to potentiate the filtration while ensuring the judicious use of PPE, in fact instead of

wearing conventionally the FFP2 mask for 8 hours, the decomposition of the latter offered 5 doubled portions allowing us to use it for 40 hours.

The disinfection of the mask begins with its disassembly on an operating field, the filters are discarded the external and internal surfaces are disinfected by spraying with 5 % hypochlorite or using a surface disinfectant based on quaternary ammonium, the mask is then wiped and stored in a special box, taking into account the degradation of the PLA in contact with water, immersion remains prohibited.

The price of the mask (without filter) is 4 €, in fact, a spool of PLA, costing on average 60 €, allows the printing of 15 reusable masks.

A ULPA filter costs about \$ 50 to make 10 individual filters; Thus the total cost price of the mask is around 9 €.

CONCLUSION

The «open source» community makes it possible to popularize 3D printing while making it easier for any 3D printer owner to appropriate their protective equipment at a reduced price, however, intellectual property remains a concern, in particular for medical parts that cannot be procured promptly during a pandemic crisis similar to that caused by the Covid-19 virus.

The lack of clinical experience requires the implementation of a codified protocol to scientifically test the validity of these 3D printed medical devices with the aim of future certification putting them on the same footing as FFP2 / FFP3 masks.

REFERENCES

- Ramanathan K, Antognini D, Combes A, Paden M, Zakhary B, Ogino M, MacLaren G, Brodie D, Shekar K. Planning and provision of ECMO services for severe ARDS during the COVID-19 pandemic and other outbreaks of emerging infectious diseases. *Lancet Respir Med*. 2020 May;8(5):518-26. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30121-1
View at: Publisher Site: [https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(20\)30121-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(20)30121-1/fulltext)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32203711/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102637/>
- Ziqing Z, Coffey C, Roland BA. The Effect of Subject Characteristics and Respirator Features on Respirator Fit. *J.occup.Envir. Hyg*. 2005 Dec;2(12):641-9. DOI: 10.1080/15459620500391668
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15459620500391668>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16298949/>
- Provenzano D, Rao YJ, Mitic K, Obaid S.N, Pierce D, Huckenpahler J, Berger J, Goyal SH, Loew M.H. Rapid Prototyping of Reusable 3D-Printed N95 Equivalent Respirators at the George Washington University. Preprints. 2020 March: 2020030444. DOI: 10.20944/preprints202003.0444.v1
View at: Publisher Site: <https://www.preprints.org/manuscript/202003.0444/v1>
- About NanoHack. Accessed 24 Mar 2020.
View at: Publisher Site: <https://copper3d.com/hackthepandemic/>
- HEPA Mask. Accessed 24 Mar 2020.
View at: Publisher Site: <https://www.thingiverse.com/thing:4222563>
- Makers Guide. Accessed 24 March 2020.
View at: Publisher Site: <https://creality.com/info/makers-guide-3d-printed-face-mask-no-worries-on-mask-shortage-and-virus-infection-i00248i1.html>
- COVID-19 Response. Accessed 24 March 2020.
View at: Publisher Site: <https://lowellmakes.com/covid-19-response/>
- Tino R, Moore R, Antoline S, Ravi P, Wake N, Ionita CN, Morris JM, Decker SJ, Sheikh A, Rybicki FJ, Chepelev LL. COVID-19 and the role of 3D printing in medicine. *3D Print Med*. 2020 Apr 27; 6(1):11. DOI: 10.1186/s41205-020-00064-7
View at: Publisher Site: <https://threedmedprint.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41205-020-00064-7>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32337613/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7183817/>
- Société française d'Hygiène Hospitalière (SF2H). Avis du 04 mars 2020 relatif aux indications du port des masques chirurgicaux et des appareils de de protection respiratoire de type FFP2 pour les professionnels de santé.
View at: URL: <https://www.sf2h.net/wp-content/uploads/2020/02/Avis-Masque-SF2H-SPILF-04.03.2020.pdf>

Article history
Received: 25.03.2021
Revision requested: 22.04.2021
Revision received: 20.08.2021
Accepted: 24.09.2021
Published: 30.09.2021

3D ДРУК «LOWELL MAKES» МАСКИ З PLA НИТКОЮ

¹Ельмутаваккіл Нідаль, ²Сеффар Алае-Еддін, ³Ельмутаваккіл Далал,
³Хаціб Набіл, ¹Белемханнат Саміра

¹ Стоматологічний консультаційний і лікувальний центр Касабланки, Касабланка, Марокко

² Університетська клініка Ibn Rochd, Касабланка, Марокко

³ Приватний сектор ортодонції та імплантології, Касабланка, Марокко

nidalelmoutawakkil@yahoo.fr

Актуальність. Нова пандемічна криза, викликана вірусом Covid 19, призвела до глобальної нестачі засобів індивідуального захисту, включаючи маски FFP2, які необхідні для використання фахівцями, які перебувають в прямому контакті з Covid позитивними пацієнтами.

Мета. 3D-друк PLA маски, аналогічної масці FFP2, з додаванням фільтра ULPA (Ultra Low Penetration Air).

Методи. Розроблена маска заснована на загальних морфологічних стандартах маски FFP2. Таким чином, ми завантажили прототип маски «LOWELL MAKES». Ми адаптували цей прототип до наших черепно-лицьових розмірів за допомогою програмного забезпечення «Meshmixer». В результаті, експортували прототип в формат STL для друку за допомогою методу FDM (fused deposition modeling / моделювання методом пошарового накладання розплавленої полімерної нитки) на 3D-принтері «XYZ Junior 1.0», оснащеному PLA (polylactic acid) ниткою.

Результати. Загальна тривалість друку повної маски (зовнішній шар, основа маски і сітка утримуючого фільтру) становила близько 4 год 30 хв. Що стосується вибору фільтра, ми використовували два варіанти: перший - вирізані, подвійні частини маски FFP2 використовували в якості фільтрів, другий - використовували комерційний фільтр ULPA (Ultra Low Penetration Air) або HEPA (High-efficiency particle absorption). Фільтр ULPA теоретично може фільтрувати пил, пилок і бактерії з повітря з ефективністю 99,999% завдяки розміру пор 0,1 мікрон. Середній розмір вірусу Covid-10 становить близько 0,1 μm, а пористість маски FFP2 дозволяє фільтрувати частки діаметром близько 0,6 μm в 94% випадків. Щоб максимізувати ефект фільтрації при носінні цієї маски, ми вирішили використовувати фільтр ULPA, перекритий фільтром FFP2. Ми перевірили щільність цієї маски, перевіривши бічну відсутність герметичності, утримуючи стабілізований лист на зовнішній поверхні в результаті присмокування під час вдиху. Ми також додали до країв маски, що контактує з лицем, периферійне силіконове ущільнення, яке полімеризоване на обличчі, щоб уникнути будь-яких слідів або шрамів після видалення цієї маски, одночасно збільшуючи комфорт практикуючого лікаря. Технологія, яку ми обрали - шляхом накладення двох фільтрів (перший з пористістю 0,6 μm, а другий 0,1 μm). Це дозволило нам посилити фільтрацію і використовувати фільтр протягом 40 годин. Загальна собівартість маски становить близько 9 €.

Висновки. Спільнота відкритого програмного забезпечення дає можливість популяризувати 3D-друк, разом з тим дозволяє будь-якому власникові 3D-принтеру використовувати своє обладнання за зниженою ціною. Однак питання інтелектуальної власності, як і раніше, потребує вирішення. Зокрема, щодо медичних засобів, які неможливо придбати в найкоротші терміни під час пандемічної кризи, викликаній вірусом Covid-19.

Ключові слова: Lowell Makes маска, PLA, 3D друк, ULPA фільтр.

3D ПЕЧАТЬ «LOWELL MAKES» МАСКИ С PLA НИТЬЮ

¹Ельмутаваккіл Нидаль, ²Сеффар Алае-Эддин, ³Ельмутаваккіл Далал, ³Хаджиб Набиль,
¹Белемханнат Самира

¹ Стоматологический консультационный и лечебный центр Касабланки, Касабланка, Марокко

² Университетская клиника Ibn Rochd, Касабланка, Марокко

³ Частный сектор ортодонтии и имплантологии, Касабланка, Марокко

nidalelmoutawakkil@yahoo.fr

Актуальность. Новый пандемический кризис, вызванный вирусом Covid 19, привел к глобальной нехватке средств индивидуальной защиты, включая маски FFP2, необходимые для использования специалистами, находящимися в прямом контакте с Covid положительными пациентами.

Цель. 3D-печать PLA маски, аналогичной маске FFP2, с добавлением фильтра ULPA (Ultra Low Penetration Air).

Методы. Разработанная маска основана на общих морфологических стандартах маски FFP2. Таким образом, мы загрузили прототип маски «LOWELL MAKES». Мы адаптировали этот прототип к нашим черепно-лицевым размерам с помощью программного обеспечения «Meshmixer». В результате, экспортировали прототип в формат STL для печати с помощью метода FDM (fused deposition modeling / моделирование методом послойного наложения расплавленной полимерной нити) на 3D-принтере «XYZ Junior 1.0», оснащенном PLA (polylactic acid) нитью.

Результаты. Общая продолжительность печати полной маски (внешний слой, основа маски и сетка удерживающего фильтра) составляла около 4 ч 30 мин. Что касается выбора фильтра, мы использовали два варианта: первый - вырезанные, двойные части маски FFP2 использовали в качестве фильтров, второй - использовали коммерческий фильтр ULPA (Ultra Low Penetration Air) или HEPA (High-efficiency particle absorption). Фильтр ULPA теоретически может фильтровать пыль, пыльцу и бактерии

из воздуха с эффективностью 99,999% благодаря размеру пор 0,1 микрон. Средний размер вируса Covid-10 составляет около 0,1 μm , а пористость маски FFP2 позволяет фильтровать частицы диаметром около 0,6 μm в 94% случаев. Чтобы максимизировать эффект фильтрации при ношении этой маски, мы решили использовать фильтр ULPA, перекрытый фильтром FFP2. Мы проверили плотность этой маски, проверив боковое отсутствие герметичности, удерживая стабилизированный лист на внешней поверхности в результате присасывания во время вдоха. Мы также добавили к краям маски, контактирующей с лицом, периферийное силиконовое уплотнение, полимеризованное на лице, чтобы избежать каких-либо следов или шрамов после удаления этой маски, одновременно увеличивая комфорт практикующего врача. Технология, которую мы предпочли - путем наложения двух фильтров (первый с пористостью 0,6 μm , а второй 0,1 μm). Это позволило нам усилить фильтрацию и использовать фильтр в течение 40 часов. Общая себестоимость маски составляет около 9 €.

Выводы. Сообщество открытого программного обеспечения дает возможность популяризировать 3D-печать, вместе с тем позволяет любому владельцу 3D-принтера использовать свое оборудование по сниженной цене. Однако вопрос интеллектуальной собственности по-прежнему требует решения. В частности, в отношении медицинских средств, которые невозможно приобрести в кратчайшие сроки во время пандемического кризиса, вызванному вирусом Covid-19.

Ключевые слова: Lowell Makes маска, PLA, 3D печать, ULPA фильтр.

ДО 180-РІЧЧЯ НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ.

НАРИС ПРО МИКОЛУ НИКИФОРОВИЧА ЗАЙКА –
ВИДАТНОГО ПАТОФІЗІОЛОГА,
УЧНЯ ОЛЕКСАНДРА ОЛЕКСАНДРОВИЧА БОГОМОЛЬЦЯ

**МИКОЛА НИКИФОРОВИЧ ЗАЙКО –
ВИЗНАЧНИЙ ВЧЕНИЙ І ПЕДАГОГ**

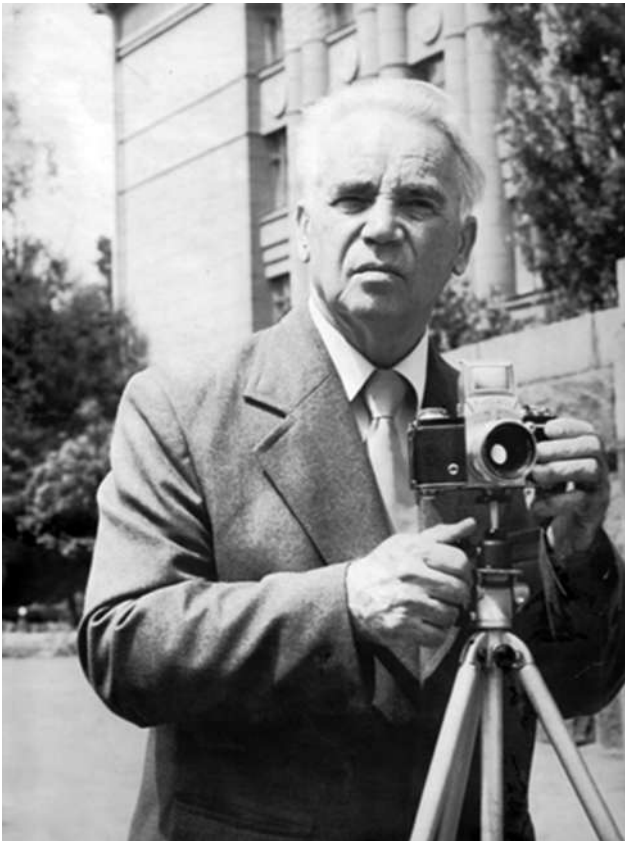


Національний медичний університет імені О.О. Богомольця іде до свого ювілею, відзначаючи 180 років своєї діяльності. За цей майже двохсотрічний період в його стінах працювали найвидатніші представники теоретичної і клінічної медицини, які зробили вагомий внесок у розвиток нових напрямів медичної науки, створювали і очолювали кафедри і готували майбутніх лікарів. Серед них чільне місце займає постать члена-кореспондента АМН СРСР, Заслуженого діяча науки УРСР, Лауреата державної премії УРСР в галузі науки, доктора медичних наук, професора Зайка Миколи Никифоровича, який, починаючи з 1960 року, був завідувачем кафедри патологічної фізіології. Визначний вчений, талановитий організатор науки, чудовий педагог, він зробив неоціненний внесок у розвиток патофізіології і сприяв піднесенню авторитету Київського медичного інституту.

Зайко М.Н. пройшов яскравий шлях становлення як науковець і педагог. Він навчався на медичному факультеті 2 Московського державного університету у 1926-1931 рр. Курс патологічної фізіології ним було пройдено безпосередньо у О.О. Богомольця, який тоді в університеті очолював відповідну кафедру. Як обдарованого випускника, О.О. Богомолець рекомендував М.Н.

Зайка до вступу до аспірантури при Академії наук СРСР в Ленінграді. Після закінчення аспірантури він працював в Інституті експериментальної медицини під керівництвом таких видатних вчених, як професор Ю.С. Лондон, академік М.М. Анічков. Одночасно М.Н. Зайко займався викладацькою діяльністю в ІІ Ленінградському медичному інституті на кафедрі патологічної фізіології, яку очолював один із найстаріших учнів О.О. Богомольця професор Л.Р. Перельман. У 1949 р. під керівництвом М.М. Анічкова він захистив докторську дисертацію «Експериментальні дослідження нейропаралітичного кератиту», що була його першою фундаментальною працею з проблем нервової трофіки, вивченню якої він в подальшому присвятив свою наукову діяльність.

У 1950 р. М.Н. Зайка було обрано завідувачем кафедри патологічної фізіології Одеського медичного інституту, де він працював до 1960 р. Тут він організував одну з перших в Україні радіоізотопну лабораторію, що розширило можливості патофізіологічних досліджень, зокрема при вивченні ролі гісто-гематичних бар'єрів в організмі в нормальних і патологічних умовах.



У 1955-1957 рр. М.Н. Зайко перебував у науковому відрядженні у м. Йена (Німецька демократична республіка), де він організував першу самостійну кафедру в університеті ім. Ф. Шиллера, а також радіоізотопну лабораторію. Уряд НДР високо оцінив діяльність М.Н. Зайка, нагородивши його медаллю «За заслуги перед державою», а керівництво університету вручило йому медаль ім. Ф. Шиллера.

У 1960 р. М.Н. Зайка було обрано завідувачем кафедри патологічної фізіології Київського медичного інституту ім. О.О. Богомольця, і на цій посаді він працював до 1986 р., після чого, до кінця свого життя (1991 р.), обіймав посаду професора кафедри.

М.Н. Зайко мав славу найкращого лектора медичного інституту. Маючи виразну зовнішність, красивий за тембром голос, демонструючи бездоганне знання мови, своїм темпераментом, енергійним викладанням чітко побудованого змісту лекції він відразу захоплював слухачів. Микола Никифорович дуже ретельно готувався як до студентських лекцій, так і до виступів перед науковцями і лікарями, приділяючи велику увагу ілюстративному матеріалу, який він готував власноруч. Лекції він вважав одним із найважливіших елементів навчання студентів.

Микола Никифорович захоплювався фотографуванням. У його фотоколекції були чудові знімки, і навіть портрети багатьох відомих людей.

За часів його завідування кафедра, за результатами своєї діяльності, багато років визнавалася найкращою і на факультеті, і в інституті, була переможцем в різного роду змаганнях, притаманних для того часу, і мала багато відзнак.

Як учений-патофізіолог, М.Н. Зайко разом із своїми учнями, співробітниками кафедри багато років розробляв одну із важливих медико-біологічних проблем – проблему нервової трофіки і неврогенних дистрофій. Були розроблені експериментальні моделі нейродистрофічного процесу шляхом вибіркового перетину чутливих, рухових, симпатичних і парасимпатичних нервів, вивчені постденерваційні зміни в різноманітних органах і тканинах із застосуванням морфологічних, біохімічних і функціональних



методів дослідження, що дозволило встановити закономірності розвитку нейродистрофічного процесу. Матеріали досліджень було опубліковано в численних журналах і збірниках наукових праць, вони доповідались на наукових конференціях і з'їздах.

Як організатор науки, М.Н. Зайко майже 30 років очолював спочатку Київське, а потім Українське наукові товариства. Під його керівництвом і за його безпосередньої активної участі було проведено майже всі республіканські конференції патофізіологів до 1991 року.

М.Н. Зайко дійсно був Учителем з великої літери, і до нього охоче тягнулася наукова молодь, до якої він ставився з великою повагою. Все те найкраще, що він отримав від своїх славетних вчителів, всі ті знання і досвід, якими він володів, він щиро дарував своїм учням, серед яких багато відомих учених – академік НАН та НАМН України Г.М. Бутенко, академік НАМН України О.Г. Резніков, члени-кореспонденти НАМН України Е.В. Гюллінг і В.А. Міхньов, член-кор. АПН України Ю.В. Биць, професори О.В. Атаман, В.О. Горбань, Л.О. Попова, О.І. Сукманський та ін. За час роботи на кафедрі патофізіології в Київському медичному інституті він підготував 7 докторів наук і 13 кандидатів наук, а в цілому за 57 років наукової і педагогічної діяльності під його керівництвом підготовлено 23 доктори наук і 36 кандидатів наук. Багато з його учнів очолювали і продовжують очолювати кафедри патологічної фізіології у закладах вищої медичної освіти, лабораторії в науково-дослідних інститутах.

Одним з найбільших досягнень М.Н. Зайка було створення авторського колективу, який під його керівництвом написав і видав у 1977 році підручник «Патологічна фізіологія», що був визнаний одним із найкращих підручників для студентів, і у 1981 році колектив авторів (серед них 7 співробітників кафедри) отримав Державну премію України. Підручник багато років перевидавався, був виданий українською, російською, англійською і румунською мовами.

Ще одним із задуманих і реалізованих ним проектів було започаткування у 1974 році щорічних читань О.О. Богомольця, як данини пам'яті великому ученому, під керівництвом якого він робив свої перші кроки в науці. Ці читання набули великої популярності, і в них охоче брали участь найбільш відомі вчені, як патофізіологи, так і представники інших медичних і біологічних спеціальностей.

Ім'я М.Н. Зайка – людини благородної душі і великого розуму назавжди збережеться у вдячній пам'яті його учнів, в історії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, історії кафедри патофізіології, якій Микола Никифорович Зайко присвятив понад 30 років свого творчого життя.

**Колектив кафедри патофізіології
НМУ імені О.О. Богомольця**

