# GEORGIAN MEDICAL NEWS

ISSN 1512-0112

No 7-8 (244-245) Июль-Август 2015

ТБИЛИСИ - NEW YORK

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Медицинские новости Грузии**

საქართველოს სამედიცინო სიახლენი

# GEORGIAN MEDICAL NEWS

**No 7-8 (244-245) 2015**

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

Издается в сотрудничестве и под патронажем
Тбилисского государственного медицинского университета

გამოიცემა თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტთან
თანამშრომლობითა და მისი პატრონაჟით

**ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ**

**ТБИЛИСИ - НЬЮ-ЙОРК**

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

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

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

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

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

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

**МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ ГРУЗИИ**

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

**НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР**

Лаури Манагадзе

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР**

Нино Микаберидзе

**НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**
**Зураб Вадачкориа - председатель Научно-редакционного совета**
Михаил Бахмутский (США), Александр Геннинг (Германия), Амиран Гамкрелидзе (Грузия),
Константин Кипиани (Грузия), Георгий Кавтарадзе (Грузия), Георгий Камкамидзе (Грузия),
Паата Куртанидзе (Грузия), Вахтанг Масхулия (Грузия), Тамара Микаберидзе (Грузия),
Тенгиз Ризнис (США), Реваз Сепиашвили (Грузия), Дэвид Элуа (США)

**НАУЧНО-РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**
**Лаури Манагадзе - председатель Научно-редакционной коллегии**
Архимандрит Адам - Вахтанг Ахаладзе, Амиран Антадзе, Нелли Антелава,
Рима Бериашвили, Лео Бокерия, Отар Герзмава, Лиана Гогиашвили, Нодар Гогебашвили,
Николай Гонгадзе, Манана Жвания, Ирина Квачадзе, Нана Квирквелия, Зураб Кеванишвили,
Гурам Кикнадзе, Палико Кинтраиа, Теймураз Лежава, Джанлуиджи Мелотти, Караман Пагава,
Николай Пирцхалаишвили, Мамука Пирцхалаишвили, Фридон Тодуа,
Кеннет Уолкер, Рамаз Хецуриани, Рудольф Хохенфеллнер, Кахабер Челидзе,
Тинатин Чиковани, Арчил Чхотуа, Рамаз Шенгелия

Website:
www.geomednews.org

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

**Версия:** печатная. **Цена:** свободная.
**Условия подписки:** подписка принимается на 6 и 12 месяцев.
**По вопросам подписки обращаться по тел.: 293 66 78.**
**Контактный адрес:** Грузия, 0177, Тбилиси, ул. Асатиани 7, III этаж, комната 313
тел.: 995(32) 254 24 91, 995(32) 222 54 18, 995(32) 253 70 58
Fax: +995(32) 253 70 58, e-mail: ninomikaber@hotmail.com; nikopir@dgmholding.com

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

**© 2001. Ассоциация деловой прессы Грузии**
**© 2001. The International Academy of Sciences,**
**Education, Industry & Arts (USA)**

**GEORGIAN MEDICAL NEWS**

Monthly Georgia-US joint scientific journal published both in electronic and paper formats of the Agency of Medical Information of the Georgian Association of Business Press; Georgian Academy of Medical Sciences; International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (USA).
Published since 1994. Distributed in NIS, EU and USA.

**SCIENTIFIC EDITOR**

Lauri Managadze

**EDITOR IN CHIEF**

Nino Mikaberidze

**SCIENTIFIC EDITORIAL COUNCIL**
**Zurab Vadachkoria - Head of Editorial council**
Michael Bakhmutsky (USA), Alexander Gënning (Germany), Amiran Gamkrelidze (Georgia), David Elua (USA), Konstantin Kipiani (Georgia), Giorgi Kavtaradze (Georgia), Giorgi Kamkamidze (Georgia), Paata Kurtanidze (Georgia), Vakhtang Maskhulia (Georgia), Tamara Mikaberidze (Georgia), Tengiz Riznis (USA), Revaz Sepiashvili (Georgia)

**SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD**
**Lauri Managadze - Head of Editorial board**
Archimandrite Adam - Vakhtang Akhaladze, Amiran Antadze, Nelly Antelava, Rima Beriashvili, Leo Bokeria, Kakhaber Chelidze, Tinatin Chikovani, Archil Chkhotua, Otar Gerzmava, Liana Gogiashvili, Nodar Gogebashvili, Nicholas Gongadze, Rudolf Hohenfellner, Zurab Kevanishvili, Ramaz Khetsuriani, Guram Kiknadze, Paliko Kintraia, Irina Kvachadze, Nana Kvirkvelia, Teymuraz Lezhava, Gianluigi Melotti, Kharaman Pagava, Nicholas Pirtskhalaishvili, Mamuka Pirtskhalaishvili, Ramaz Shengelia, Pridon Todua, Kenneth Walker, Manana Zhvania

**CONTACT ADDRESS IN TBILISI**

GMN Editorial Board
7 Asatiani Street, 3th Floor
Tbilisi, Georgia 0177

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

**CONTACT ADDRESS IN NEW YORK**

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

Phone: +1 (917) 327-7732

**WEBSITE**

www.geomednews.org

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статьи в редакцию необходимо соблюдать следующие правила:

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Фамилии отечественных авторов приводятся в оригинальной транскрипции.

8. При оформлении и направлении статей в журнал МНГ просим авторов соблюдать правила, изложенные в «Единых требованиях к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», принятых Международным комитетом редакторов медицинских журналов - http://www.spinesurgery.ru/files/publish.pdf и http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
В конце каждой оригинальной статьи приводится библиографический список. В список литературы включаются все материалы, на которые имеются ссылки в тексте. Список составляется в алфавитном порядке и нумеруется. Библиографическое описание литературы составляется на языке текста документа. В списке литературы сначала приводятся работы, написанные знаками грузинского алфавита, затем кириллицей и латиницей. Ссылки на цитируемые работы в тексте статьи даются в квадратных скобках в виде номера, соответствующему номеру данной работы в списке литературы.

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

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

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

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

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

## REQUIREMENTS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Please follow guidance offered to authors by The International Committee of Medical Journal Editors guidance in its Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals publication available online at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
http://www.icmje.org/urm_full.pdf
In GMN style for each work cited in the text, a bibliographic reference is given, and this is located at the end of the article under the title "References". All references cited in the text must be listed. The list of references should be arranged alphabetically and then numbered. References are numbered in the text [numbers in square brackets] and in the reference list and numbers are repeated throughout the text as needed. The bibliographic description is given in the language of publication (citations in Georgian script are followed by Cyrillic and Latin).

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

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

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

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

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

## ავტორთა საყურადღებოდ!

რედაქციაში სტატიის წარმოდგენისას საჭიროა დავიცვათ შემდეგი წესები:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

აღნიშნული წესების დარღვევის შემთხვევაში სტატიები არ განიხილება.

*Содержание:*

**Koval H., Chopiak V., Kamyshnyi A.**
mRNA TLR2 and TLR4 EXPRESSION IN THE ENDOMETRIUM TISSUE
IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS ASSOSIATED WITH INFERTILITY ..... 7

**Зильфян А.А.**
РЕЗУЛЬТАТЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИМПЛАНТАЦИИ КЕРАРИНГ
С ПОМОЩЬЮ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА У ПАЦИЕНТОВ С КЕРАТОКОНУСОМ ..... 12

**Ratiani L., Gamkrelidze M., Khuchua E., Khutsishvili T., Intskirveli N., Vardosanidze K.**
ALTERED MICROCIRCULATION IN SEPTIC SHOCK ..... 16

**Лучицкий В.Е.**
СИНДРОМ ТЕСТИКУЛЯРНОГО ДЕФИЦИТА У МУЖЧИН
С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ОЖИРЕНИЕМ ..... 25

**Искакова С.С., Уразаев О.Н., Бекмухамбетов Е.Ж., Дворацки Г., Дворацка М.**
ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА TREC (T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES)
У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА ..... 29

**Моисеенко И.О., Приступа Л.Н., Гарбузова В.Ю., Погорелова О.С., Ополонская Н.А.**
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО C825T ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА β3-СУБЪЕДИНИЦЫ
G-ПРОТЕИНА У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ОЖИРЕНИЯ ..... 36

**Квирквелия Н.Б., Шакаришвили Р.Р., Гугуцидзе Д.А., Хизанишвили Н.А.**
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ Х-СЦЕПЛЕННОЙ
МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ С КОНТРАКТУРАМИ ..... 40

**Gegelashvili M., Meca A., Schwartz S.J.**
RELIGIOUS EXCLUSIVITY AND PSYCHOSOCIAL FUNCTIONING ..... 45

**Жвания М.А.**
ЮВЕНИЛЬНЫЙ ДЕРМАТОМИОЗИТ И КАЛЬЦИНОЗ ..... 56

**Soliman A.T., Adel A., Soliman N.A., Elalaily R., De Sanctis V.**
PITUITARY DEFICIENCY FOLLOWING TRAUMATIC BRAIN INJURY
IN EARLY CHILDHOOD: A REVIEW OF THE LITERATURE ..... 62

**Ковалева Е.М., Похилько В.И., Чернявская Ю.И., Цвиренко С.М., Белорус А.И.**
ПРЕДИКТИВНАЯ МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ РАННИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ
У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЁННЫХ ДЕТЕЙ ..... 71

**Арвеладзе Г.А., Геладзе Н.М., Хачапуридзе Н.С., Бахтадзе С.З., Капанадзе Н.Б.**
МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ТЕРАПИИ (ОБЗОР) ..... 78

**Karalashvili L., Kakabadze A., Vyshnevska G., Kakabadze Z.**
ACELLULAR HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE AS A THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLD
FOR THE TREATMENT OF MUCOGINGIVAL DEFECTS ..... 84

**Avetikov D., Loza K., Starchenko I., Loza E., Marushchak M.**
EXPERIMENTAL-MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF EXPEDIENCY TO USE
THE SKIN GLUE «DERMABOND» FOR POSTOPERATIVE WOUND CLOSURE ..... 90

**Saladze T., Gogiashvili L., Tsagareli Z., Bakhutashvili Z., Kavtaradze T.**
HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES
OF ATHEROSCLEROTIC AND SENILE CALCIFIC AORTIC VALVE STENOSIS .....94

**Antonenko A., Vavrinevych O., Omelchuk S., Korshun M.**
PREDICTION OF PESTICIDE RISKS TO HUMAN HEALTH BY DRINKING
WATER EXTRACTED FROM UNDERGROUND SOURCES .....99

**Мамучишвили Н.И., Кучулория Т.С., Мчедлишвили И.М., Имнадзе П.Г., Мирзашвили Д.Ш.**
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЛЕПТОСПИРОЗА В ГРУЗИИ .....106

**Pruidze N., Khetsuriani R., Sujashvili R., Ioramashvili I., Arabuli M., Sanikidze T.**
ALTERATIONS OF PROPERTIES OF RED BLOOD CELLS MEMBRANES PROTEINS
OF DIFFERENT AGE AND SEX VOLUNTEERS .....110

НАУКА

# mRNA TLR2 and TLR4 EXPRESSION IN THE ENDOMETRIUM TISSUE IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS ASSOSIATED WITH INFERTILITY

**Koval H., Chopiak V., Kamyshnyi A.**

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi; Danylo Halytskyi Lviv National Medical University; Zaporizhia State Medical University, Ukraine*

Immune system of the female reproductive tract is presented by both congenital and adaptive mechanisms [1,2] having two main functions with different directions. On the one hand, making the first line of protection and being included into the immune system, connected with the mucous membranes - mucosa-associated-lymfoid tissue - MALT, it realizes the protective function against microbes, which is rather substantiated biologically considering the boundary of location and a high degree of contacts with microorganisms of the lower parts of the female reproductive organs [9,21,26-28]. At the same time, in the upper portions of the female reproductive system immunity plays the role of a main factor promoting tolerance to the semen antigens and fetal alloantigens promoting implantation, support and development of pregnancy [5,18,25,26,28]. Pattern recognition receptors (PRRs) play an important role in realization of congenital immunity of the reproductive tract, they identify pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and are mediators of cytokine production essential for the development of effective immunity. Toll-like receptors (TLRs) occupy a special place among PRPs. TLRs are presented on many cells – macrophages, natural killer cells, neutrophils and they are so to say "sensors" identifying structural conservative molecular components peculiar for pathogens and initiate immune response with further activation of adaptive immunity mechanisms [4]. PRRs role is especially topical for the systems, which are potential "entry gates" for infection including the female reproductive tract as well. mRNA 9 TLR was identified in the human endometrium [4,20,23,24,29]. Learning the role of TLRs in the formation of reproductive function disorders, especially in the context of continuous increase of infertility in the whole world is rather interesting.

One of the main causes of infertility is endometriosis. Endometriosis is a disease characterized by growth of the tissue morphologically similar to the endometrium outside the uterine cavity. In spite of a long history of examining this disease and a big number of theories concerning its origin, etiology and pathogenesis of endometriosis are not known exactly [2, 11, 15, 16]. In this respect we consider the examination of TLRs in case of endometriosis and infertility cause by it an important problem, which stipulated the aim of our research.

Objective: to detect mRNA TLR2 and TLR4 expression in the endometrium of women with endometriosis and infertility.

**Material and methods.** The material for the examination was taken from the tissue of eutopic endometrium obtained from 10 infertile women with endometriosis (examined group) and 10 women with infertility of a tubular genesis due to inflammatory process experienced earlier (control group). All the patients underwent careful instrumental and laboratory examination including microbiological on the basis if which the diagnosis was made. All the examinations were conducted with the informed consent keeping to confidential conditions. Endometrium tissue was obtained during operation while performing hysteroscopy.

mRNA TLR2 and TLR4 were detected in the endometrium tissue by means of polymerase chain reaction (PCR). First, the samples to be studied were grinded and homogenized by means of a mortar and pestle, then they were deparaffinated in xylene, and dehydration was made in descending concentrations of ethanol (100%, 96%, 70%).

Total RNA was excreted by means of the kit "Trizol RNA Prep 100" (Isogen Lab., LTD, Russia) containing Trizol reagent (lytic reagent containing denaturant guanidinthiocyonate anf phenol with pH=4.0) and ExtraGene E (suspension of ion exchangers mixture). RNA was excreted according to the protocol.

Reverse transcription and obtaining kDNA was conducted by means of OT-1 kit of the company "Syntol" (Russia). The reaction mixture with general volume of 25 mcL contained 1 mcL of Random-6 primer, 2 mcL total RNA, 8,5 mcL deionized $H_2O$, purified of nucleases, 12,5 mcL 2,5x reaction mixture and 1 mcL revertase MMLV-RT. Reverse transcription was conducted at the temperature of 45°C during 45 minutes with the following heating to inactivate MMLV-RT during 5 minutes at the temperature of 92°C. kDNA obtained was immediately used in polymerase chain reaction (PCR) in the amount of 1-10 mcL or kept at the temperature -20°C, an at -70°C for a longer period.

To detect the level of the examined genes expression the amplificator CFX96™Real-Time PCR Detection Systems

(«Bio-Rad Laboratories, Inc.», the USA) and the kit of reagents Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, the USA) were used. Final reaction mixture for amplification included the dye SYBR Green, DNA-polymerase Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, per 0,2 mcL of direct and reverse specific primers, 1 mcL of matrix (kDNA). The reaction mixture was brought to a general volume 25 mcL by means of adding deionized $H_2O$.

Specific pairs of primers (5'-3') for analysis of the examined and reference genes were chosen by means of the software Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) and produced by the company Metabion (Germany) (Table 1).

Before amplification was initiated the initial denaturation during 10 minutes at the temperature 95°C was conducted. Amplification consisted of 45-50 cycles and was performed under the following conditions: denaturation - 95°C, 15 sec., annealing – 59-61°C, 30-60 sec., elongation - 72°C, 30 sec. As a reference gene to detect a relative value of changes of the examined genes expression level the gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was taken. A relative normalized amount of kDNA of target genes was detected by means of ΔΔCt method. Statistical analysis of PCR results was conducted by means of the software CFX Manager ™ (Bio-Rad, USA).

**Results and their discussion.** The analysis of mRNA TLR2 expression demonstrated that the examined endometrium of women with infertility and endometriosis has an increased expression of the given index as compared to the analogical one in the endometrium of the control group of women. The data are demonstrated on the Fig. 1. mRNA TLR2 expression in the examined endometrium of women with endometriosis is 16,1 times higher than that of the control group.

The analysis of mRNA TLR4 expression in the endometrium of women with infertility and endometriosis revealed the data indicative of an increased expression of this receptor as compared to the analogical one in the endometrium of women without endometriosis (with infertility of tubular genesis). The data are demonstrated on Figure 2. The results obrained are indicative of the fact that mRNA TLR4 level in the endometrium of women with endometriosis is 4,17 times higher that of the control. The comparison of expression levels of mRNA TLR2 and mRNA TLR4 shows that TLR2 level is in 3,88 times higher than TLR4 level.

*Table 1. The design of primers*

| Gene | Primer | Temperature melting (˚C) | Product length (bp) | Exon junction |
|---|---|---|---|---|
| TLR2 | F: 5´-TTCTCTCAGGTGACTGCTCG-3´ | 59.12 | 46 | 72/73 |
| | R: 5´-TGCAACACCAAACACTGGGA-3´ | 60.32 | | |
| TLR4 | F: 5´-TGCGTGAGACCAGAAAGCTG -3´ | 60.6 | 46 | 391/392 |
| | R: 5´-TAGGAACCACCTCCACGCAG-3´ | 61.54 | | |
| | R: 5´-CACACTCCCTGCCTTCTGTG-3´ | 60.6 | | |

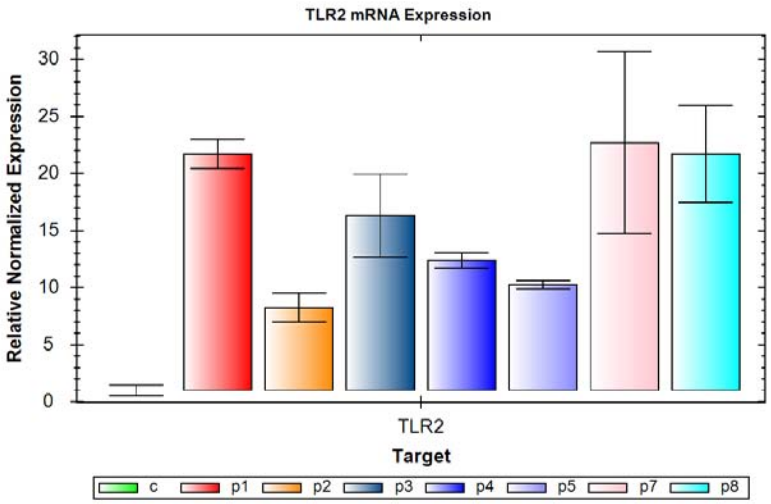



*Fig. 1. Relative normalized amount of kDNA of TLR2 gene. Normalization by ΔΔCt method with reference-gene GAPDH*

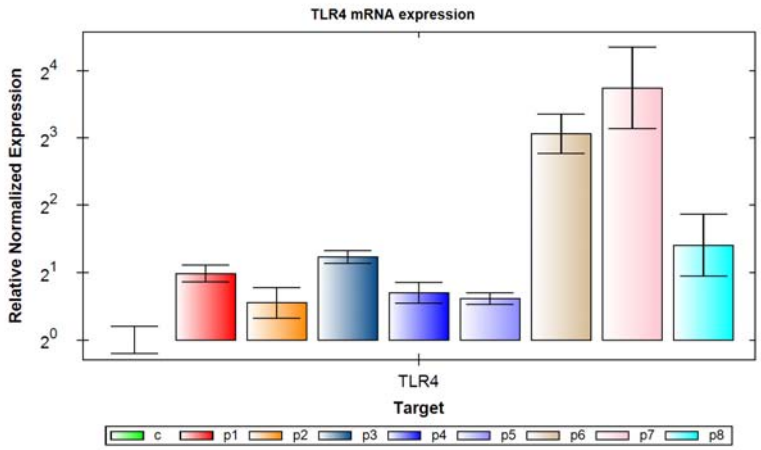



*Fig. 2. Relative normalized amount of kDNA gene TLR4. Normalization by ΔΔCt method with reference-gene GAPDH*

Thus, the data obtained are indicative of an increased mRNA expression in the examined samples of the endometrium of women with endometriosis and infertility in both receptors - TLR2 and TLR4, with rather higher expression of mRNA TLR2.

The results obtained are explained by the findings of microbiological examination of the vaginal discharge of the women examined, which found various pathogenic or opportunistic microorganisms (Enterococcus, E. Coli, Klebsiella, Chlamydia). Cytomorphological examination of the epithelium by Pap test detected in the majority of women (87%) II type, indicating inflammatory process in the uterine cervix or vagina.

TLR2 is known to differentiate microbe lipopeptides and peptidoglycan (PGN), gram-positive bacteria, lipoarabinomannan (LAM) and zymosan (component of the fungal wall), that are patterns of microbes frequently found in the female reproductive system [1, 7, 9]. In its turn, TLR4 recognizes lipopolysaccharide (LPS), mostly contained in the wall of gram-negative microorganisms, and as a ligand is frequently present in case of bacterial dysbiosis, which was proved by the results of microbiological examinations of the examined women [8, 19]. Higher expression of TLR2 than TLR4 can be explained by more frequent presence of microbes being ligands for TLR2 in the female reproductive tract.

Endometriosis is known to be associated with increased pro-inflammatory character of peritoneal fluid, and activation of TLR2 through MyD88-dependent signal way leads to activation of NF-kB transcription and synthesis of a big amount of anti-inflammatory cytokines [6]. In the same way, bacterial LPS, which is a ligand of TLR4, potentially stimulates macrophages to produce anti-inflammatory cytokines and growth factors such as HGF, VEGF, IL-6 and TNF-a in the abdominal cavity. At the same time, there are studies indicating that blockage of TLR4 by antiTLR4 antibodies substantially decreases the production of anti-inflammatory mediators, and adding cultural medium from TLR4-blocked macrophages causes a considerable inhibition of increasing endometrium cells [17, 22]. Therefore, known examinations are indicative of the connection of increased expression of Toll-like receptors and development of endometriosis. Other researchers indicate a considerable increase of TLR2 expression in the cervical canal of women with miscarriage of pregnancy of infectious genesis [12, 13, 14]. On the other hand, pregnancy and its successful outcome are known to depend on a number of conditions and cytokine regulation among them which is connected with activation of Tall-like receptors. It underlines a possible role of Tall-like receptors in the development of infertility and in case of endometriosis it requires further investigations. To our opinion, women with infertility should undergo careful microbiological examination, and in case pathological or opportunistic agents are found, they should receive treatment to normalize microbiota of the reproductive tract, which will promote decrease of TLR-dependent production of pro-inflammatory mediators and improve chances to cure infertility.

**Conclusions.** The data obtained may be indicative of an important role of TLR2 and TLR4 in the development of endometriosis and infertility associated with it.

The study has been conducted at Bukovinian State Medical University on the clinical base of the Center of Treatment of Infertility. Previous studies were performed at Danylo Halytskyi Lviv National University, PCR of the endometrium tissue was conducted at the molecular-genetic laboratory of Zaporizzhia State Medical University.

**Conflict of interests:** none.

**Acknowledgement:** we express our gratitude to the Rector of Bukovinian State Medical University, Professor Boychuk Taras Mykolayovych for his support and promotion in conducting the study; Professor, Director of the Center of Treatment of Infertility, Yuzko Oleksandr Mykhay-

lovych; Associate Professor Yuzko Tamara Anatoliyivna for their assistance and selection of patients on the base of the Center.

**REFERENCES**

1. Allhorn S., Böing C., Koch A.A. et al. TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium. Reprod Biol Endocrinol. 2008; 6: 40.
2. Burney R.O., Giudice L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. Fertil Steril. 2012; 98: 511–519.
3. Charles R., Wira C.R., Fahey J.V. Regulation of Mucosal Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Sex Hormones in Immune Protection Against Sexually Transmitted Pathogens. Am J Reprod Immunol. 2014; 72(2): 236 - 258.
4. Fazeli A., Bruce C., Anumba D.O. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. Hum Reprod. 2005; 20: 1372–1378.
5. Givan A.L., White H.D., Stern J.E., Colby E. et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. Am J Reprod Immunol. 1997; 38: 350-359.
6. Guo S.W. Nuclear factor-kappab (NF-kappaB): an unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? Gynecol Obstet Invest. 2007; 63:71–97.
7. Herath S., Fischer D.P., Werling D. et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. Endocrinology. 2006; 147:562–570.
8. Hirata T., Osuga Y., Hirota Y. et al. Evidence for the presence of Toll-like receptor 4 system in the human endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90: 548–556.
9. Horne A.W., Stock S.J., King A.E Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. Reproduction 2008; 135: 739-749.
10. Khan K.N., Kitajima M., Fujishita A. et al. Toll-like receptor system and endometriosis. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2013; 39(8): 1281–1292.
11. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki H. et al. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. Am J Reprod Immunol. 2008; 60: 383–404.
12. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K. et al. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. Fertil Steril. 2010; 94 (7): 2860–2863.
13. Khan K.N., Kitajima M., Imamura T. et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated growth of endometriosis by human heat shock protein 70 (Hsp70). Hum Reprod 2008; 23: 2210–2219.
14. Khan K.N., Masuzaki H., Fujishita A. et al. Regulation of hepatocyte growth factor by basal and stimulated-macrophages in women with endometriosis. Hum Reprod. 2005; 20: 49–60.
15. Khoufache K., Michaud N., Harir N. et al. Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review. Minerva Endocrinol. 2012; 37(1):75–92.
16. Kyama C.M., Debrock S., Mwenda J.M. et.al. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:123.
17. Latha M., Vaidya S., Movva S. et al. Molecular pathogenesis of endometriosis; Toll-like receptor-4 A896G (D299G) polymorphism: a novel explanation. Genet Test Mol Biomarkers. 2011; 15(3):181–4.
18. Lee S.K., Kim C.J., Kim D.J. et al. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. Immune Netw. 2015; 15(1): 16–26.
19. Palsson-McDermott E.M., O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology. 2004;113:153–162.
20. Pioli P.A., Amiel E., Schaefer T.M. et al. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. Infect Immun. 2004; 72: 5799–5806.
21. Pudney J., Quayle A.J., Anderson D.J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. Biol Reprod. 2005; 73 (6): 1253-1263.
22. Seung Geun Yeo, Yong Sung Won, Ho Yun Lee et al. Increased Expression of Pattern Recognition Receptors and Nitric Oxide Synthase in Patients with Endometriosis . Int J Med Sci. 2013; 10(9): 1199–1208.
23. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 335–376.
24. Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and grampositive bacterial cell wall components. Immunity 1999; 11: 443–451.
25. Trifonova R.T., Lieberman J., van Baarle D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. Am J Reprod Immunol. 2014; 71(3): 252-64.
26. Wira C.R., Fahey J.V. Sentman C.L. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev. 2005; 206: 306–335.
27. Wira C.R., Fahey J.V., Rodriguez-Garcia M. et al. Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens. Am J Reprod Immunol. 2014; 72: 236 - 258.
28. Wira C.R., Fahey J.V., Sentman C.L. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions. Immunol Rev. 2005; 206: 306–335.
29. Young S.L., Lyddon T.D., Jorgenson R.L. et al. Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. Am J Reprod Immunol. 2004; 52: 67–73.

**SUMMARY**

**mRNA TLR2 and TLR4 EXPRESSION IN THE ENDOMETRIUM TISSUE IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS ASSOSIATED WITH INFERTILITY**

**Koval H., Chopiak V., Kamyshnyi A.**

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi; Danylo Halytskyi Lviv National Medical University; Zaporizhia State Medical University, Ukraine*

Endometriosis is an important medical and social problem as it causes stable pelvic pains, afflicts women of the reproductive age, provokes infertility characterized by poor outcome of treatment. In recent times much attention is paid to the mechanisms of congenital immunity as possible mediators of the development of endometriosis and targets of therapy. The work deals with the investigation of the levels of mRNA TLR2 and TLR4 expression in the tissue of eutopic endometrium in women with endometriosis and infertility in comparison with women afflicted with infertility of a tubular character with the aim to define the role of TLR2 and TLR4 in the development of infertility in case of endometriosis. The study was conducted by means of polymerase chain reaction (PCR) real-time method. The results of the study are indicative of an increased TLR2 and TLR4 expression (especially TLR2) in the endometrium in women with endometriosis. The results obtained may be indicative of an important role of TLR2 and TLR4 in the development of endometrioid ectopia and should be considered while treating infertility in women with endometriosis.

**Keywords:** mRNA, toll-like receptors, TLR2, TLR4, endometrium, endometriosis, infertility.

**РЕЗЮМЕ**

**ЭКСПРЕССИЯ mRNA TLR2 и TLR4 В ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С БЕСПЛОДИЕМ**

**Коваль Г.Д., Чопяк В.В., Камышный А.М.**

*Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы; Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого; Запорожский государственный медицинский университет, Украина*

Эндометриоз является значимой медицинской и социальной проблемой, так как поражает женщин репродуктивного возраста и вызывает бесплодие, которое характеризуется низкой эффективностью лечения. В последнее время большое внимание уделяется механизмам врожденного иммунитета, как возможным медиаторам развития эндометриоза и мишеням терапии. В работе описаны исследования уровня экспресси мРНК TLR2 и TLR4 в ткани эутопического эндометрия у женщин с эндометриозом и бесплодием в сравнении с женщинами с бесплодием трубного характера с целью определения роли TLR2 и TLR4 в развитии бесплодия при эндометриозе. Исследования проводились с использованием метода ПЦР реал-тайм. Результаты исследования свидетельствуют о повышении экспрессии TLR2 и TLR4 (особенно TLR2) в ткани эндометрия женщин с эндометриозом. Полученные данные указывают на значимую роль TLR2 и TLR4 в развитии эндометриоидных эктопий и бесплодия у женщин с эндометриозом.

რეზიუმე

mRNA TLR2 და TLR4 ექსპრესია ენდომეტრიუმის ქსოვილში ქალებში უშვილობასთან ასოცირებული ენდომეტრიოზით

გ. კოვალი, ვ. ჩოპიაკი, ა. კამიშნი

ბუკოვინის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ჩერნოვცი; დ. გალიცკის სახ. ლვოვის ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი; ზაპოროჟიეს სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, უკრაინა

ბოლო დროს დიდი ყურადღება ეთმობა თანდაყოლილი იმუნიტეტის მექანიზმებს,როგორც ენდომეტრიოზის განვითარების ძირითად მედიატორებს და მკურნალობის სამიზნეებს. ენდომეტრიოზის დროს უშვილობის განვითარებაში TLR2 და TLR4 როლის განსაზღვრის მიზნით შესწავლილია TLR2 და TLR4 ექსპრესია ეუტოპიური ენდომეტრიუმის ქსოვილში ქალებში ენდომეტრიოზით მილის არასრულყოფილობით გამოწვეული უშვილობასთან შედარებით. გამოკვლევა ჩატარებულია პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის რეალ-თაიმის მეთოდით.

გამოვლინდა, რომ TLR2 და TLR4 ექსპრესია იმატებს (განსაკუთრებით TLR2) ენდომეტრიუმის ქსოვილში ქალებში ენდომეტრიოზით. მიღებული შედეგები მიუთითებს TLR2 და TLR4-ის მნიშვნელოვან როლზე ენდომეტრიული ექტოპიების და უშვილობის განვითარებაში ენდომეტრიოზით დაავადებულ ქალებში.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИМПЛАНТАЦИИ КЕРАРИНГ С ПОМОЩЬЮ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА У ПАЦИЕНТОВ С КЕРАТОКОНУСОМ

**Зильфян А.А.**

*Ереванский государственный медицинский университет им.М. Гераци;*
*Медицинский Центр "Шенгавит", Армения, Ереван*

Кератоконус является одним из наиболее распространенных в Армении дегенеративных заболеваний роговицы. Характерным для кератоконуса являются значительное снижение остроты зрения у пациентов в результате развития ложной миопии, правильного и неправильного астигматизма и помутнения роговицы [11]. Начало заболевания характерно для второй и третьей декады жизни; при этом, в большинстве случаев имеет место билатеральное течение заболевания [9].

До настоящего времени, основными методами коррекции и лечения кератоконуса считались оптические очки, жесткие контактные линзы и операционное вмешательство - кератопластика. Однако, в настоящее время, в офтальмологическую практику широко внедрены и положительно зарекомендовали себя новые методы лечения и коррекции кератоконуса: кросслинкинг роговицы, имплантация роговичных стромальных сегментов и факичных интраокулярных линз, персонализированная лазерная коррекция зрения с кросслинкингом. Наряду со столь многочисленными методами лечения и коррекции кератоконуса, невсегда удается выбрать наиболее оптимальную методику, поскольку по сей день отсутствует унифицированный подход хирургического лечения различных степеней кератоконуса. Рассматривая различные методики коррекции и лечения кератоконуса по отдельности, следует указать на их преимущества и недостатки. При кросслинкинге достигается лишь остановка прогрессии кератоконуса; имплантация факичных интраокулярных линз имеет лишь эффект коррекции зрения. В то время как при имплантации роговичных сегментов наблюдаются одновременно оба эффекта: стабилизация течения заболевания и улучшение остроты зрения [10]. Первые типы интрастромальных роговичных сегментов были внедрены в офтальмологическую практику для коррекции миопии [3,7]. В то же время уже 2004 г., американская ассоциация FDA (Food and Drug Administration) утвердила и рекомендовала использование конкретных типов роговичных сегментов (Intacs) при лечении и коррекции кератоконуса. [4]. Роговичные сегменты кераринг для коррекции кератоконуса оказались наиболее эффективными среди прочих сегментов [7]. Имплантация роговичных сегментов кераринг уже более 15 лет широко применяется во всем мире и на сегодняшний день является современной и высокоэффективной методикой лечения кератоконуса II-III стадии. Благодаря введению роговичных сегментов кераринг достигается значительное уплощение роговицы за счет воздействия сегментов на периферические зоны, что приводит к заметному повышению остроты зрения. В данном случае задействован закон толщины роговицы Баракера [6]. Эта методика, в известной степени, является универсальной, поскольку позволяет остановить прогрессию кератоконуса и улучшить или восстановить остроту зрения, тем самым улучшая качество жизни пациентов [1]. В последние годы, благодаря внедрению в офтальмологическую практику фемтосекундного лазера, результаты операции имплантации роговичных сегментов кераринг оказались более эффективными, что следует объяснить тем фактом, что в отличие от мануальной техники, когда роговичные тоннели создаются при помощи механического расслаивателя, именно фемтосекундный лазер позволяет выполнять тоннели с высокой точностью, с различным диапазоном и диаметром. Установлено также, что такие осложнения, как децентрация сегментов и их экструзия в раннем и позднем послеоперационном периодах, при выполнении операции с помощью фемтосекундного лазера, практически не наблюдаются [2,10,12]. Исходя из вышеизложенного, в большинстве случаев хирурги стараются выполнять имплантацию роговичных сегментов кераринг посредством фемтосекундного лазера.

Целью настоящего исследования явился анализ структурно-функциональных показателей глаз пациентов с кератоконусом III стадии, которым была выполнена имплантация роговичных сегментов кераринг фемтосекундным лазером.

**Материал и методы.** Прооперированы 58 глаз пациентов с кератоконусом III стадии, которым в Медицинском центре "Шенгавит" (Ереван, Армения) была выполнена имплантация роговичных интрастромальных сегментов кераринг с применением фемтосекундного лазера. Данная операция в Армении до недавнего времени выполнялись лишь эпизодически, на весьма ограниченном контингенте больных, исключительно без применения современной фемтосекундной лазерной технологии.

Изучаемый контингент офтальмологических больных с кератоконусом до и после операции прошёл

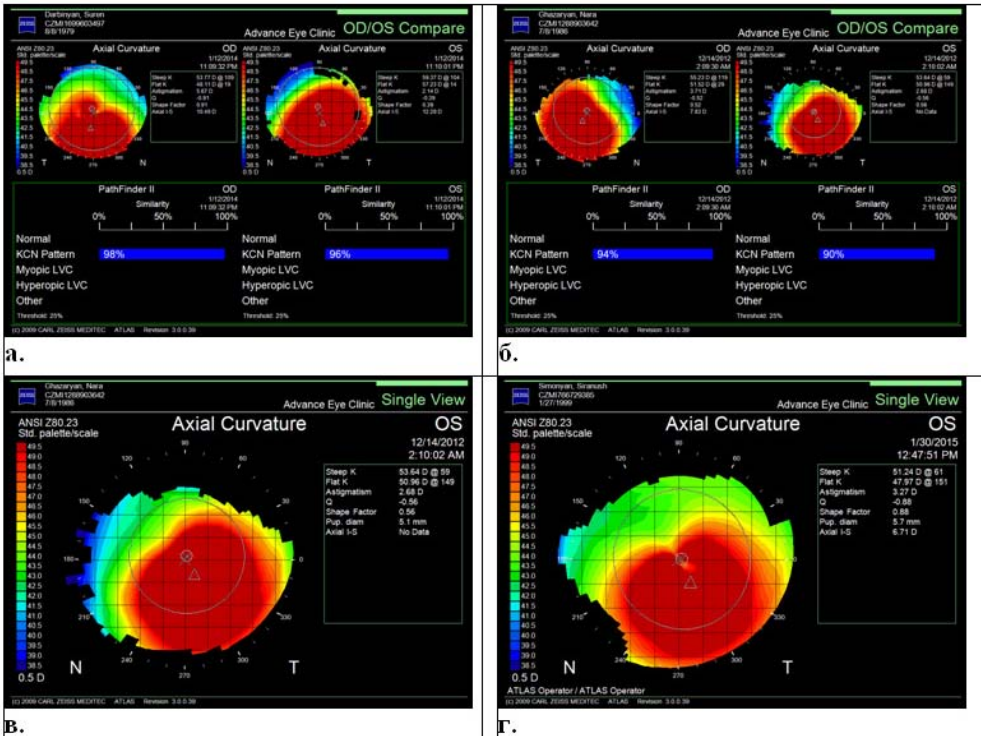



*Рис. 1. Топография роговицы на третьей стадии кератоконуса*
*а) билатеральньная топограмма роговицы пациента с выраженной протрузией;*
*б) топограмма пациентки с выраженной протрузией обоих глаз с наличием прогрессии заболевания;*
*в,г) левостороннее течение кератоконуса со значительным истончением центра роговицы*

полное специализированное офтальмологическое обследование с целью установления стадии и течения заболевания: рефрактометрию, кератометрию, визометрию без коррекции, а также пахиметрию, топографическое картирование роговицы с использованием 3D моделирования роговицы с применением прибора - Pentacam HR (Германия). У всех пациентов диагностирован кератоконус III стадии. Возраст пациентов варьировал в пределах от 19 до 29 лет. Прогрессия кератоконуса до операции выявлена у 28 пациентов, а у остальных 30 пациентов прогрессия заболевания не наблюдалась. Данные картирования роговицы пациентов с III стадией кератоконуса до выполнения операции с помощью топогрофа фирмы Carl Zeiss представлены на рис. 1.

Всем пациентам операция произведена одним и тем же хирургом на фемтосекундном лазере Ziemer Crystalline (Швейцария). Выполнена имплантация роговичных сегментов (одного или двух). Сначала операция произведена на одном, а спустя 1 неделю, при необходимости, на парном глазу. Во всех случаях операция прошла гладко, без осложнений. Наблюдения проводились в раннем и позднем послеоперационном периодах. Для оценки эффективности проведённой операции сравнивались данные параметров роговицы и остроты зрения до и спустя шесть месяцев после операции.

Статистический анализ производили с использованием критериев Стьюдента и компьютерной программы SPSS v13 ANOVA.

**Результаты и их обсуждение.** Как показали результаты статистического анализа у исследуемого контингента пациентов имело место улучшение всех параметров оптических показателей роговицы в относительно позднем послеоперационном периоде, т.е. спустя шесть месяцев. Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

У всех пациентов заметно увеличился радиус кривизны роговицы. Получены достоверные показатели, свидетельствующие о том, что в послеоперационном периоде заметно понижена сила преломления роговицы. У всех оперированных пациентов выявлена тенденция к приостановке прогрессии кератоконуса с одновременным повышением остроты зрения.

Особо следует указать на то обстоятельство, согласно которому, предпринятый нами операционный подход на относительно репрезентативном количестве пациентов, сопровождался весьма значительным повышением остроты зрения, о чем свидетельствовал анализ вариационных рядов одного и того же контингента больных, и, в первую очередь, весьма низкий показатель ошибки ($p<0,0005$).

*Таблица. Параметры роговицы и остроты зрения больных с кератоконусом III стадии с имплантацией роговичных сегментов кераринг до операции и спустя 6 месяцев*

| **Глаза с кератоконусом** (n=58) | **Исследуемые показатели** | | |
|---|---|---|---|
| | **радиус кривизны роговицы** | **сила преломления роговицы** | **острота зрения** |
| до операции | 6,9±0,09 | 49,28±0,7 | 0,15±0,02 |
| после операции | 7,21±0,09<br>0,025>p>0,01 | 47,1±0,67<br>0,025>p>0,01 | 0,41±0,04<br>p<0,0005 |

*примечание: p - по отношению показателей после операции к соответствующим показателям до операции*

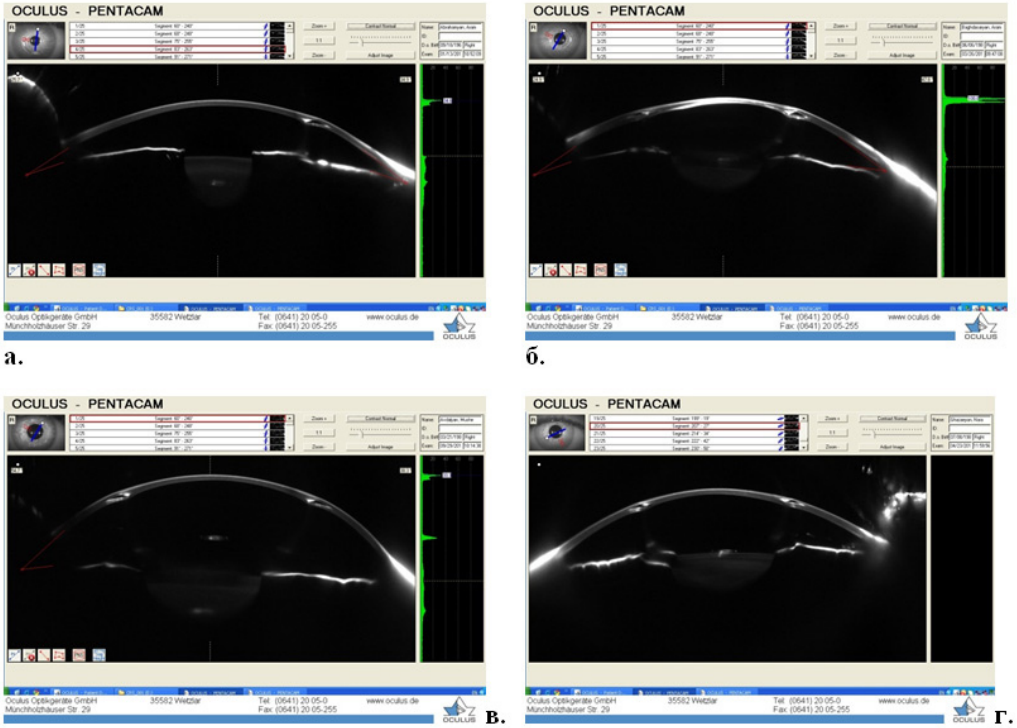



*Рис. 2. Результаты имплантации роговичных сегментов кераринг по данным снимков Шемфлюг*
*а) правильная локализация одного роговичного сегмента;*
*б) выраженная протрузия роговицы с ее центральным помутнением и имплантацией двух сегментов;*
*в,г) правильная на 2/3 глубины роговицы имплантация роговичных сегментов кераринг*

Всем пациентам повторно проведены специализированные методы исследования (визометрия, авторефкератометрия, топографическое картирование роговицы), а также, с целью выявления глубины и локализации роговичных сегментов кераринг осуществлено Шемфлюг картирование эктазированной роговицы (рис. 2).

Ни в одном случае, описанные в литературе осложнения: дислокация роговичных сегментов, инфекционные инфильтраты тоннелей, не наблюдались [12].

Таким образом, исследуемые показатели у пациентов, страдающих кератоконусом III стадии до и после операции, свидетельствуют о том, что проведенная операция - имплантация интрастромальных роговичных сегментов кераринг с помощью фемтосекундного лазера исключительно у всех исследуемых больных (независимо от вариабельности показателей авторефкератометрии) приводит к существенному улучшению остроты зрения на фоне увеличения радиуса кривизны и понижения силы преломления роговой оболочки. У всех пациентов в послеоперационном периоде в течение шести месяцев и более имела место стабилизация процесса прогрессии кератоконуса. На основании собственных результатов следует заключить, что имплантация роговичных сегментов посредством фемтосекундного лазера пациентам с кератоконусом III стадии является высокоэффективной и малоинвазивной методикой, оказывающей выраженный лечебный и рефракционный эффект, при таком грозном заболевании, каковым является кератоконус.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barraquer JL. Modification of refraction by means of intracorneal inclusions. Int Ophthalmol.Clin. 1966;6:53-78.
2. Burris TE, Ayer CT, Evensen DA, et al Effects of intras-

tromal corneal ring size and thickness on corneal flattening in human eyes. Refract Corneal Surg. 1991;7:46-50.
3. Cochener B, Le Floch G, Colin J, et al. Intra-corneal rings for correcting of weak myopias. J Fr Ophthalmol. 1998; 21:191-208.
4. Colin J, Cochener B, Savary G. et al. Correcting keratoconus with intracorneal rings. J Cataract Refract Surg. 2000;26:1117-1122.
5. Coskunseven E, Kymionis GD, Tsiklis NS, et al. One year result of intrastromal corneal ring segment implantation (KeraRing) using femtosecound laser in patients with keratoconus. Am J Ophthalmol. 2008;145:775-779.
6. Coskunseven E, Kymionis GD, Tsikilis NS, et al. Complication of intrastromal corneal ring segment implantation using a femtosecound laser for channel creation : a survey of 850 eyes with keratoconus. Acta Ophthalmol. 2009; 14.
7. Ferrara de A., Cunha P. Tecnica cirgica para correcao de myopia; anel corneano intra-estromal. Rev Bras Oftalmol. 1995; 54: 577-588.
8. Paranhos JF, Avila MP, Paranhos A Jr,Schor P. Evaluation of the impact of intrastromal ring segment implantation on the quality of life of patients with keratoconus using the NEI-RQL (National Eye Institute Refractive Error Quality of life)instrument. Br J Ophthalmol. 2009; 11.
9. Rabinowitz YS. Keratoconus. Surv Ophthalmol. 1998;42:297-319.
10. Shabayek MH, Alia JL.Intracorneal ring segment implantation by femtosecond laser for keratoconus correction. Ophthalmology 2007; 114(9): 1643-1652.
11. Tomidokoro A, Oshika T, Amano S, et al. Changes in anterior and posterior corneal curvatures in keratoconus. Ophthalmology 2000;107: 1328-1332.
12. Useda-Montanes A, Tomas JD, Alio JL.Correction of severe ectasia after LASIK with intracorneal ring segments. J Refract Surg.2008; 24(4)408-411.

## SUMMARY

## RESULTS AND EFFECTIVENESS OF KERARING IMPLANTATION WITH THE HELP OF FEMTOSECOND LASER PATIENTS WITH KERATOCONUS

**Zilfyan A.**

*M. Heratsi Yerevan State Medical University; "Shengavit" Medical Center, Yerevan, Armenia*

In our study 58 eyes with III stage keratoconus underwent surgery using femtosecond laser Ziemer Cristalline (Switzerland) intracorneal stromal ring segment implantation (Kerar-ing). We examine eyes before and after the surgery with the help of special ophthalmic equipment (visometry, tonometry, biomicroscopy, ophthalmoscopy autorefkeratometry, pakhimetry, and corneal topography). The last measurement was done with Scheimpflug camera on Pentacam (Oculus). In the present study there were no intraoperative complications. We compared outcomes before and 6 months after surgery. Statistical analisys was done with Styudents criteria. It was reviled that in all patients who underwent the intrastromal corneal ring Keraring implantation we get statistically significant improvement of all results.

**Keywords:** corneal segments, implantation, femtosecond laser, keratoconus.

## РЕЗЮМЕ

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИМПЛАНТАЦИИ КЕРАРИНГ С ПОМОЩЬЮ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА У ПАЦИЕНТОВ С КЕРАТОКОНУСОМ

**Зильфян А.А.**

*Ереванский государственный медицинский университет им.М. Гераци; Медицинский Центр "Шенгавит", Армения, Ереван*

В исследовании участвовали 58 больных с кератоконусом третьей стадии, которым выполнена операция имплантации роговичных сегментов керaринг фемтосекундным лазером Ziemer Cristalline (Швейцария). Наблюдения проводились в ранние и поздние послеоперационные сроки. Ни в одном случае интраоперационных и послеоперационных осложнений не выявлено. Статистический анализ производили с использованием критериев Стьюдента с применением компьютерной программы SPSS v13 (ANOVA). Учитывались радиус кривизны роговицы и сила ее преломления, а также показатели остроты зрения до и после операции. Как выявили данные статистического анализа, а также объективные исследования до и после операции, имплантация интрастромальных роговичных сегментов керaринг у всех исследуемых больных (независимо от вариабельности показателей авторефкератометрии) приводит к существенному улучшению остроты зрения на фоне увеличения радиуса кривизны и понижения силы преломления роговой оболочки. У всех пациентов в послеоперационном периоде в течение шести месяцев и более имела место стабилизация процесса.

## რეზიუმე

## ფემტოსეკუნდური ლაზერის მეშვეობით განხორციელებული კერარინგის იმპლანტაციის შედეგები და ეფექტურობა კერატოკონუსით პაციენტებში

ა. ზილფიანი

მ. ჰერაცის სახ. ერევნის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი; სამედიცინო ცენტრი "შენგავიტი", ერევანი, სასომხეთი

სტატიაში აღწერილია III სტადიის კერატოკონუსით დაავადებული 58 პირზე დაკვირვების

შედეგები, რომელთაც გაუკეთდათ რქოვანას სეგმენტების კერარინგის იმპლანტაცია ფემტოსეკუნდური ლაზერის - Ziemer Cristalline-ის (შვეიცარია) გამოყენებით. დაკვირვება ჩატარებულია ოპერაციის შემდგომ ადრეულ და მოგვიანებით პერიოდში. ინტრაოპერაციული და პოსტოპერაციული გართულება არ აღინიშნა ჩატარებული ოპერაციების არც ართ შემთხვევაში. მიღებული მონაცემების სტატისტიკური ანალიზი განხორციელდა სტიუდენტის კრიტერიუმის და კომპიუტერული პროგრამის SPSS v.13 (ANOVA)-ს მეშვეობით. შედეგების შეფასების დროს გათვალისწინებული იყო რქოვანას რადიუსის სიმრუდე, შუქტეხის ძალა, აგრეთვე, მხედველობის სიმახვილე ოპერაციამდე და ოპერაციის შემდეგ. ოპერაციამდე და ოპერაციის შემდგომი მონაცემების ობიექტურმა გამოკვლევამ აჩვენა,რომ კერარინგის გადანერგვის ყველა შემთხვევაში ადგილი ჰქონდა მხედველობის სიმახვილის არსებით გაუმჯობესებას, რადიუსის სიმრუდის მატების და რქოვანას გარსის შუქტეხის ძალის შესუსტების ფონზე. ყველა პაციენტს პოსტოპერაციულ პერიოდში და ოპერაციის შემდგომ ექვსი თვის განმავლობაში აღენიშნებოდა სტაბილიზაციის პროცესი.

---

## ALTERED MICROCIRCULATION IN SEPTIC SHOCK

**Ratiani L., Gamkrelidze M., Khuchua E., Khutsishvili T., Intskirveli N., Vardosanidze K.**

*Tbilisi State Medical University; Elizabeth Blackwell Hospital, Tbilisi, Georgia*

Sepsis is a systemic inflammatory response to an infection which may progress to septic shock. The latter is characterized by sustained hypotension despite vasopressor therapy and is caused by dysfunction in mechanisms that control vascular resistance. Hypotension and vaso-occlusion prevent adequate oxygen delivery to tissues, leading to organ failure and death. Mortality in SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) is 7-11%, mortality in septic shock is 45-57% [26]. Clinically, sepsis is characterized by a severe microvascular dysfunction that persists despite fluid resuscitation and leads to multi-organ failure even after normalization of hemodynamics in response to fluid resuscitation, vasopressors and the treatment of infection. Experimental results clearly indicate that microcirculatory dysfunction lies at the centre of sepsis pathogenesis. The mechanisms involved in microvascular alterations differ from those involved in the development of systemic hemodynamic alterations. It has been suggested that microvascular dysfunction under septic conditions is closely related to: arteriolar hyporesponsiveness to vasoconstrictors and vasodilators, the loss of adrenergic sensitivity and tone of smooth muscle cells lining the arterioles; increased capillary permeability that manifests as a breakdown of the microvascular endothelial barrier; loss of the anti-adhesive function of endothelial surfaces; coagulopathy; marked reduction in capillary density [4]. The endothelium is a major target of sepsis-induced pathologic events. Endothelial cell damage accounts for much of the pathogenesis of septic shock. Vascular endothelial cells are among the first cells in the body that come into contact with circulating bacterial molecules. Endothelial cells possess mechanisms to recognize structural patterns of bacterial pathogens and subsequently initiate the expression of inflammatory mediators, including cytokines, chemokines, and products of the complement system [78]. In response to these mediators the endothelium undergoes structural changes, such as swelling, deformation and possibly, apoptosis with detachment from the vasculature. Thus the breakdown of endothelial barrier function occurs. Endothelial hyperpermeability is a hallmark of cardiovascular alterations in severe sepsis that largely contributes to high morbidity and mortality. The often devastating clinical consequences of this process are net extravasation of fluid, a profound decrease in systemic vascular tone, and collapse of the microcirculation, leading to distributive shock, acute lung and kidney injury [33].

The results of sepsis on the endothelium regulated vascular permeability are critical. lipopolisacharids (LPS) cause remodeling of the cytoskeleton of the endothelial cells which results in increasing permeability and vascular leakage. This effect of LPS at local sites of acute inflammation is mediated by the endogenous proinflammatory cytokines interleukin 1(IL-1) and Tumor necrosis factor - α (TNFα) [5]. Injection of LPS, and IL-1 and TNFα into the dermis overlying the cremasteric and rectus abdominis muscles of rats caused postcapillary venular leakage, which was neutrophil-dependent. Interestingly TNFα caused much weaker and less frequent vascular alterations than IL-1 [100]. The finding that TNF caused only minimal microvascular leakage is consistent with the report of Rampart et al, that TNF did not cause much edema or neutrophil accumulation in the skin of rabbits unless in the presence of

the vasodilator prostaglandin E2 (PGE2). There is evidence that an LPS-induced increase of endothelial permeability is achieved by enzymatic cleavage of adherens junction proteins [6]. Moreover, the response of the endothelial cells to cytokines frequently is combined with an increase of intracellular $Ca^{2+}$ which is related to contraction and separation of the cells [20]. Also, some endothelial cells, activated by oxidative stress, produce reactive oxygen species (ROS) which destroy other endothelial cells [41]. A number of in vitro studies revealed apoptotic cell death of endothelial cells in response to sepsis-related factors such as LPS and TNFα [83]. However, endothelial cells are relatively resistant to the effects of endotoxin, and several investigators failed to demonstrate convincing evidence of endothelial cell apoptosis during sepsis [81]. The result of all the above alterations at cellular level is the disruption of the endothelial barrier and the extravasation of liquid and proteins in the interstitial space, known as capillary leak. Vascular leakage leads to hypovolemia.

There are other mechanisms involved in excessive endothelial permeability. Gene targeting experiments in mice revealed that transmembrane receptor tyrosine kinase, Tie-2 expression during mouse development was restricted primarily to endothelial cells and their progenitors, the angioblasts and that Tie-2 signaling pathway was a key participant in vasculogenesis playing a critical role in the differentiation, proliferation, and survival of endothelial cells in the mouse embryo [29]. In sepsis, angiopoietin 1 (Ang1), a ligand for the Tie2 receptor, is antagonized by angiopoietin 2 (Ang2), which is upregulated by proinflammatory stimuli during sepsis along with other numerous vasoactive cytokines and destabilizes vascular endothelium and increases vascular leakage, consequently, contributing to sepsis pathophysiology. It was reported that mice engineered to inducibly overexpress Ang2 in the endothelium developed sepsis-like hemodynamic alterations, including systemic hypotension, increased cardiac output, and dilatory cardiomyopathy. Conversely, mice with cardiomyocyte-restricted Ang2 overexpression failed to develop hemodynamic alterations. Transgenic overexpression of Ang2 disrupts blood vessel formation in the mouse embryo. In adult mice and humans, Ang2 is expressed only at sites of vascular remodeling [57,89]. Induced overexpression of Ang2 caused capillary regression and loss of capillary-associated pericytes in endotoxemia model 12 hours after LPS injection [105]. Ang1 is produced and secreted by peri-endothelial cells and platelets, whereas Ang2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell granules called Weibel-Palade bodies [34]. Orfanos SE et al studied serum Ang2 levels in critically-ill patients and investigated potential relationships with inflammatory mediators and indices of disease severity in a prospective clinical study, as well as the effect of sepsis-related inflammatory mediators on Ang2 production by lung endothelium in vitro. Patients' serum Ang2 levels were significantly increased in severe sepsis as compared with patients with no systemic inflammatory response syndrome or sepsis and associated with disease severity. Revealed strong relationship of serum Ang2 with serum TNFα suggests that the latter may participate in the regulation of Ang-2 production in sepsis [90]. Several clinical studies provided further evidence for Ang1 and Ang2 as informative novel biomarkers of morbidity and mortality in patients with severe sepsis. To justify the use of circulating Ang2 as an additional routine diagnostic and/or prognostic test more large prospective clinical trials are required. Inhibition of the Ang2/Tie2 interaction during sepsis is a potential therapeutic target [13,69,82].

Insufficient availability of sphingosine 1-phospate (S1P), a potent barrier enchanting lipid produced by numerous cell types including platelets, can participate in alterations in vascular permeability leading to vascular leakage and compromised endothelial integrity. S1P might serve as therapeutic target molecule since it is involved in many processes that are relevant for sepsis onset and progression like regulation of vascular integrity and vascular tone [14,36] and cytokine secretion [90]. Plasma concentrations of Apolipoprotein M (ApoM), a carrier of S1P, have been decreased dramatically in sepsis patients, the degree of decrease reflecting the severity of the disease [50]. Another potent vascular permeability factor which may contribute to capillary leak syndrome is vascular endothelial growth factor (VEGF). Sepsis is associated with a time-dependent increase in circulating levels of VEGF in animal and human models of sepsis. Adenovirus-mediated overexpression of VEGF was shown to exacerbate the LPS-mediated toxic effects. Elevated VEGF levels were associated with disease severity and mortality is sepsis patients [97,100]. Another study found that VEGF levels were elevated in severe sepsis, but interestingly, were low in nonsurvivors. Low VEGF concentrations were associated with severe hematological dysfunction, possibly indicating disturbed VEGF production during severe sepsis [45]. Mobilization and differentiation of bone marrow - derived human endothelial progenitor cells (EPCs) is a mechanism of repair of injured endothelium. EPCs have been generally defined as circulating cells that express a variety of cell surface markers similar to those expressed by vascular endothelial cells, adhere to endothelium at sites of injury, and participate in vasculogenesis. EPCs, although heterogenous in phenotypical and biological properties [44,102], are critically involved in maintaining vascular homeostasis and in mediating macro- and microvascular repair under both physiological and pathological conditions [61,94,95]. The release of EPCs from the bone marrow is induced by up-regulated cytokines. Growth factors such as Ang1 and Ang2, VEGF, granulocyte monocyte – colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), erythropoietin (EPO) have been demonstrated to play crucial role in mobilization and proliferation of circulating EPCs [3,49,63]. In sepsis animal models, EPCs have contributed to vascular repair. Clinical trials

revealed an increase in EPCs in the peripheral blood, even at early times of diagnosis, and demonstrated that circulating numbers of EPCs were inversely associated with organ dysfunction in septic patients [10,18]. Severe sepsis is associated with significant impairment of the endothelial progenitor cell system. This is reflected by increased EPCs numbers, increased concentrations of proangiogenic mediators, and reduced proliferative capacity of the cells, respectively [71].

Recently, endothelial glycocalyx has also been shown to be involved in sepsis induced microcirculatory dysfunction. Glycocalyx is a structure at the luminal side of blood vessels consisting of proteoglycans and glycosaminoglycans. It protects the endothelium against pathogenic insults and plays an important role in vascular barrier function. As the interface between the blood and the endothelium, the intact glycocalyx mediates flow-induced shear stress on endothelial cells, facilitates the flow of red blood cells, limits adhesion of white blood cells and platelets to the endothelium, prevents transvascular protein leakage [19,87,99]. Due to its vulnerability, the endothelial glycocalyx may easily be altered by hypoxia, TNFα, oxidized lipoproteins and other nonphysiological conditions [65]. Glycocalyx shedding from endothelium may contribute to the microvascular dysfunction and development of edema in septic patients. The size of the glycocalyx is markedly decreased in sepsis and byproducts of its degradation are found in the blood [58,65]. Observational studies in critically ill patients with sepsis indicate that plasma levels of shed glycocalyx constituents correlate with disease severity and mortality [40,48,66]. Administration of hyaluronidase, which partially destroys the glycocalyx layer, mimics sepsis-induced alterations in microcirculatory perfusion [12]. Early findings about the nature of microcirculatory alterations during sepsis were obtained in animal models using intravital microscopy and laser Doppler flowmetry. Lam et al found a reduction in perfused capillary density and an increase in non-perfused capillaries along with enhanced heterogeneity of the blood flow [51]. These changes in capillaries have since been found in humans as well. Decreased density of perfused capillaries and elevated proportion of non-perfused capillaries with absent or intermittent blood flow have been revealed even in fluid-resuscitated patients with adequate arterial blood oxygenation and cardiac output [23,85]. Importantly, this is a dynamic process, as capillaries with stopped flow at a given time may be perfused a few minutes later [24].

Perfusion of the microcirculation in sepsis is severely compromised due to several contributing factors: decreased deformability of red blood cells with inherent increased viscosity; elevated levels of activated neutrophils with decreased deformability and increased aggregability due to the upregulation of adhesion molecules [54]; activation of the clotting cascade with fibrin deposition and the formation of microthrombi; dysfunction of vascular autoregulatory mechanisms by nitric oxide [2]; and finally, enhanced functional arteriovenous shunting of the microcirculation [42]. These factors lead to tissue dysoxia from impaired microcirculatory oxygen delivery (and/or from mitochondrial dysfunction) and progress sepsis to multiple organ failure. Blood flow through the microcirculation is dependent upon the erythrocyte deformability: ability of red blood cells (RBCs) to alter the shape and squeeze through capillaries. Several studies have demonstrated altered RBC morphology and rheology (aggregation and deformability) in animal models of septic shock and in patients with sepsis. During the refractory stage of shock, nearly all erythrocytes become crenated spheres [7,73,77,78,88]. In an optical microscopic examination of blood smears from septic patients an increased number of abnormal RBCs have been observed, including echinocytic and spheroechynocytic transformations, associated with an enhanced aggregation, decreased deformability in the stomatocytic RBCs and an increased viscosity in the blood containing echinocytes [74]. Several factors could be implicated in altered RBC deformability, including increased intracellular calcium and decreased ATP concentration, the effects of nitric oxide on RBC membrane fluidity [8], and a decrease in sialic acid (SA) in RBC membrane [73]. Increased production of ROS, decreased antioxidant defenses and subsequent development of oxidative stress which is characteristic of inflammatory states also affect RBC deformability. Superoxide anion can cause degradation of RBC membrane proteins (band 3 and spectrin) with formation of new protein bands. This reorganization of membrane proteins can decrease RBC deformability [43]. The aforesaid alterations of RBCs affects its ability to modulate the microcirculation, which has been recognized as an important additional function of erythrocytes besides oxygen transport. Interestingly, RBCs are considered to regulate perfusion by releasing vasodilators, such as nitric oxide (NO) and ATP in oxygen deprived environments. But few investigations have studied RBC rheology and the microcirculation in septic patients. Rheologic alterations of RBCs in sepsis lead to decreased microvascular flow, subsequent local tissue ischemia, and eventually multiorgan failure [23,27,75,85]. Worsening of red blood cell deformability is associated with poor outcome in septic patients [98].

Apart from decreased deformability, reduction in number of RBCs and development of anemia is also very common during severe sepsis [84]. The etiology of this anemia is multifactorial and includes altered erythropoiesis (apoptosis of erythroid precursors and lower erythropoietin concentrations for a given hematocrit) [67,91]. One major cause presumably is accelerated clearance of erythrocytes from circulating blood. Increased cytosolic $Ca^{2+}$ activity (which may result from $Ca^{2+}$ entry through PGE2-activated $Ca^{2+}$-permeable cation channels) [46,52] triggers suicidal erythrocyte death (eryptosis), which is characterized by erythrocyte shrinkage, blebbing and cell membrane phospholipid scrambling leading to phosphatidylserine exposure at the

erythrocyte surface. Phosphatidylserine exposing erythrocytes may adhere to vascular walls or may be engulfed by macrophages equipped with phosphatidylserine receptors. Adhesion of eryptotic erythrocytes to the vascular wall may lead to impairment of microcirculation [46,53]. Ceramide formation, similar to cellular $Ca^{2+}$ accumulation, stimulates eryptosis. Ceramide may be generated by acid sphingomyelinase which produces ceramide from membrane sphingomyelin. Sphingomyelinase is an anzyme stimulated by platelet-activating factor) [80]. This could be a significant pathophysiological mechanism leading to anemia and derangement of microcirculation during sepsis.

Microcirculation is characterized by heterogeneity with regard to rheologic properties in various organs and tissues. Heterogeneity of flow helps adequate supply of oxygen to tissues based on their metabolic demands. However, it makes certain microcirculatory units more vulnerable to damage by hypoxia during sepsis. Besides, in almost all vascular beds, capillary pO2 and haemoglobin saturation are significantly lower as compared with arterial values. The microvascular haematocrit is lower than the systemic haematocrit. This decrease is due to the Fahreus effect that induces axial migration of erythrocytes near the centre of vessels, resulting in differential erythrocyte and plasma velocities [25]. Due to all the above characteristics vulnerable segments of microcirculation are more prone to hypoxic damage. A possible pathophysiological mechanism underlying the impaired oxygen extraction by tissues, a prominent feature of sepsis, could be the shut-down of vulnerable microcirculatory units in the organ beds, promoting the shunting of oxygen transport from the arterial to the venous compartment leaving the microcirculation hypoxemic [42]. Microvascular alterations directly impair tissue oxygenation as suggested by lactate and NADH levels [1].

Activation of coagulation during sepsis may also play a key role in the pathogenesis of microvascular dysfunction, leading to deposition of thrombin in the microvasculature and a decrease in number of perfused capillaries. TNF and IL-1 act on the endothelial cells inhibiting the production of thrombomodulin, antithrombin-III, tissue plasminogen activator (PA) and heparan sulphate, which leads to the blockade of plasmin formation and fibrinolysis [76]. When vascular endothelium becomes damaged during sepsis, levels of endothelial thrombomodulin significantly decrease, and the body's ability to convert protein C to activated protein C (APC) which has antithrombotic, profibrinolytic and anti-inflammatory properties, also diminishes. The main effect of protein APC is to reduce the production of thrombin, by inactivating factors Va and VIII. In addition, protein C inhibits the influence of tissue factor on the clotting system, reduces the production of IL-1, IL-6, and TNF-α by monocytes, inhibits neutrophil chemotaxis, and promotes fibrinolysis by inactivating Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1). A number of studies have now shown that Protein C levels are significantly reduced in patients with severe infection [38,56]. Clinical trials have demonstrated that severe protein C deficiency in septic patients is associated with early death that results predominantly from refractory shock and multiple organ dysfunction [31]. There has been no evidence obtained that the exogenous administration of APC to patients with severe sepsis improves outcome. On the contrary, it increased the risk of serious bleeding [59,62]. Other antithrombotic agents have also not been beneficial, and all have increased the risk of hemorrhage [64]. Activated endothelial cells, on the other hand, overexpress the tissue factor (TF) and the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) triggering the exogenous coagulation cascade [72]. It has been shown that the endothelial LPS-induced overexpression of TF and PAI-1 might be regulated by NO [86]. The activated endothelial cells affect the coagulation mechanism by another way too. They secrete the von Willebrant factor [16] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895286/ - R20, which is critical for the adhesion and activation of platelets, and they overexpress on the cellular membrane agglutination proteins like E and P selectins [103], which stimulate the adhesion of platelets and monocytes on the endothelium. The consequence of these disorders is the formation of microthrombi which are able to alter the microcirculation of the capillaries and the perfusion of the vital organs. These alterations, which are recognized by the clinician as disseminated intravascular coagulation (DIC), are commonly associated with multiple organ dysfunction, and have important prognostic implications [55]. Here antithrombotic role of NO should be mentioned. NO released toward the vascular lumen is a potent inhibitor of platelet aggregation and adhesion [72]. NO also can inhibit leukocyte adhesion to the vessel wall either by interfering with the ability of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18 to form an adhesive bond with the endothelial cell surface or by suppressing CD11/CD18 expression on leukocytes. NO downregulates the endothelial overexpression and production of tissue factor (TF) [35,68]. This effect of NO may account for the remarkable increase in renal fibrin deposits that has been observed in LPS-challenged rats after treatment with NOS inhibitors [9]. In addition, and perhaps more importantly, electrical communication between endothelial cells may be altered during sepsis. Under normal conditions, adequate tissue perfusion, matching with metabolism is obtained by backward communication through perivascular nerves but also by transmission of information between endothelial cells which provides electrical communication between capillary networks and arterioles, a so-called conducted vasomotor response. It has been demonstrated that membrane electrical changes in arterioles are coupled to responses in capillary segments. The pathway for conducting of the electrical signal in capillaries is likely to be the endothelium, and in arteriolar network – either endothelium or smooth muscle cell layers [32,37]. This coupling enables electrical responses originating in either the endothelium or the smooth muscle to evoke robust vasomotor responses

along the entire vessel segment and provide coordinated vasodilation or vasoconstriction of resistance vessels over a relatively long vessel length [93]. Vascular cell communication is thought to play a key role in the coordination of microvascular blood flow control. Experimental studies have shown that conduction of vasomotor responses in arterioles may be altered in pathological conditions associated with microvascular dysfunction during sepsis. Under endotoxic conditions electrical communication between microvessels is markedly though reversibly impaired [60]. Increased neuronal NOS (nNOS) activity and the resultant elevated NO production could be the key factors responsible for the deficit in conducted vasoconstriction along the arteriole [15].

There are 3 stages in the process of microcirculation injury in systemic sepsis, the first – compensatory of early reversible stage, the second – progressive or intermediate, the third – refractory or irreversible. The first phase is characterized by vasoconstriction of precapillary arterioles and post capillary venules in response to intravascular volume depletion. This reaction is mediated by the activation of sympathetic nervous system and helps maintain systemic blood pressure. Movement of fluid into or out of the intravascular compartment is determined by the hydrostatic and oncotic pressure gradients between the microvascular and the interstitial spaces. Precapillary vasoconstriction decreases microvascular hydrostatic blood pressure promoting the net influx of protein-free fluid from the interstitial compartment into the vascular compartment. This is known as “transcapillary refill” [22,28]. A fall in the plasma albumin concentration appears to reflect deterioration. Hypoalbuminemia is caused by redistribution of albumin into extravascular space and dilution resulted from transcapillary refill and fluid administration, as well as decreased production of albumin by liver, due to favored hepatic production of acute phase proteins such as globulines, fibrinogen and haptoglobin. However lowered serum albumin does not necessarily lead to change in intravascular colloid-osmotic pressure and the formation of edema as the decreased albumin is compensated for by an increase in acute phase proteins. It is clear, that sepsis induced microvascular alterations, along with cellular metabolic changes and in particular mitochondrial dysfunction, play an important role in the development of organ dysfunction and death in patients with severe sepsis [24,85]. However, the relationship of these alterations to systemic variables and outcome is still not well defined. Several clinical studies suggested that microcirculatory alterations in severe sepsis are stronger predictors of outcome than global hemodynamic variables. Survival rates decreased markedly with severity of alterations in the proportion of perfused small vessels. In multivariable analysis focused on the early period of sepsis, proportion of perfused small vessels and lactate were independent predictors of survivale [92]. Early microcirculatory indices were more markedly impaired (lower flow velocity and more heterogeneous perfusion) in nonsurvivors compared with survivors. These same early indices, flow velocity and heterogeneity, were also more markedly impaired with increasing severity of systemic cardiovascular dysfunction (lower arterial pressure or increasing vasopressor requirement) [30]. In other studies, vascular density, and especially vascular density of perfused capillaries, has been associated with outcome, as well as the heterogeneity index, but not the velocity in perfused capillaries [85]. More importantly, evolution of microcirculatory alterations over time also differed in patients, rapidly improving in survivors but remaining disturbed in non-survivors [24,85].

In a clinical study by Sakr Y et al. [85] microcirculation (orthogonal polarization spectral imaging device) was the only discriminant between those who survived vs. those who died from multiple organ failure after shock had resolved. Hemodynamic parameters were similar for both groups. Organ failure is caused by a combination of injury to microcirculation and mitochondrial dysfunction leading to disoxia. Overproduced NO is known to inhibit mictochondrial respiration during sepsis, reversibly or irreversibly, depending on the duration of NO exposure and the mitochondrial complex inhibited. Irreversible inhibition of respiration has been ascribed to the generation of $ONOO^-$, though the results of other studies show that NO itself can cause persistent inhibition of respiration [21]. Although NO inhibits complex IV in a way that is always reversible, prolonged exposure to NO results in a gradual and persistent inhibition of complex I that is concomitant with a reduction in the intracellular concentration of reduced glutathione. This inhibition appears to result from S-nitrosylation of critical thiols in the complex because it can be immediately reversed by replenishment of intracellular reduced glutathione [17].

## REFERENCES

1. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood 2003; 101: 3765-3777.
2. Avontuur JA, Bruining HA, Ince C. Nitric oxide causes dysfunction of coronary autoregulation in endotoxemic rats. Cardiovasc Res. 1997; 35(2):368-76.
3. Bahlmann FH, De Groot K, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. Blood 2004; 103: 921-6.
4. Baker CH, Wilmoth FR. Microvascular responses to E. coli endotoxin with altered adrenergic activity. Circ Shock 1984; 12: 165-76.
5. Bannerman D.D., Fitzpatrick M.J. et al. Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. Infect Immun 1998; 66:1400–1407.
6. Bannerman DD, Sathyamoorthy M. et al. Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. J Biol Chem 1998; 273:35371–35380.

7. Baskurt OK, Gelmont D, et al. Red blood cell deformability in sepsis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 421-7.
8. Bateman RM, Jagger JE, et al. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280(6):2848-56.
9. Beach JM, McGahren ED, et al. Capillaries and arterioles are electrically coupled in hamster cheek pouch. Am J Physiol. 1998 ;275(4 Pt 2):1489-96.
10. Becchi C, Pillozzi S, et al. The increase of endothelial progenitor cells in the peripheral blood: a new parameter for detecting onset and severity of sepsis. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008;21(3):697-705.
11. Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 23;95(13):7631-6.
12. Cabrales P, Vazquez BY, et al. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. J. Appl Physiol 2007; 102:2251-9.
13. Calfee CS, Gallagher DJ. Et al. Plasma angiopoietin-2 in clinical acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. Critical Care Medicine 2012; 40: 1731–1737.
14. Camerer E, Regard JB, et al. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. J Clin Invest. 2009;119:1871–1879.
15. Carlson DE, Byrnes G.J. et al. Role of solute in the early restitution of blood volume after hemorrhage. Surgery 1983; 94:439-446.
16. Chandra A, Enkhbaatar P, et al. Sepsis: Emerging role of nitric oxide and selectins. Clinics. 2006; 61:71–76.
17. Clementi E, Brown GC, et al. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(13):7631-6.
18. Cribbs SK, Sutcliffe DJ, et al. Circulating endothelial progenitor cells inversely associate with organ dysfunction in sepsis. Intensive Care Med. 2012;38(3):429-36.
19. Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. Ann Biomed Eng 2012; 40: 828-839.
20. Cuschieri J, Gourlay D, et al. Modulation of endotoxin-induced endothelial function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. Shock. 2003;20:176–182.
21. Davies NA, Cooper CE, et al. Inhibition of mitochondrial respiration during early stage sepsis. Adv Exp Med Biol. 2003;530:725-36.
22. De Backer D, Donadello K, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. Crit Care Med. 2013;41(3):791-9.
23. De Backer D, Creteur J, et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166(1):98-104.
24. De Backer D, Cortes DO, et al. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. Virulence 2014; 5 (1):73-79.
25. De Backer D, Creteur J, et al. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. Crit Care Med 2006; 34:403-8.
26. Dellinger PR. Cardiovascular management of septic shock. Crit Care Med. 2003;31:946-955.
27. Donadello K, Reggiori G, et al. Worsening of red blood cell deformability is associated with poor outcome in septic patients. Critical Care Medicine 2009; 37; 128.
28. Drucker WR, Chadwick CD, Gann DS. Transcapillary refill in hemorrhage and shock. Arch Surg. 1981; 116(10):1344-53.
29. Dumont DJ, Gradwohl G, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. Genes Dev 1994; 8:1897-909.
30. Edul VS, Enrico C, et al. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. Crit Care Med. 2012; 40:1443-8.
31. Eichacker PQ, Danner RL, Suffredini AF, et al. Reassessing recombinant human activated protein C for sepsis: time for a new randomized controlled trial. Crit Care Med. 2005;33:2426–8.
32. Emerson GG, Segal SS. Electrical Coupling Between Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells in Hamster Feed Arteries. Role in Vasomotor Control. Circulation Research. 2000; 87: 474-479.
33. Farquhar I, Martin CM, et al. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. J Surg Res. 1996;61(1):190-6.
34. Fiedler U, Scharpfenecker M, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. Blood 2004; 103:4150-6.
35. Förstermann U, Closs EI, et al. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension. 1994; 23: 1121–1131.
36. Garcia JG, Liu F, et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. J Clin Invest. 2001; 108:689–701.
37. Gustafsson, Holstein-Rathlou. Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance Acta Physiologica Scandinavica 1999; 167(1): 11-21.
38. Hemmer CJ, Kern P, et al. Activation of the host response in human *Plasmodium falciparum* malaria: relation of parasitemia to tumor necrosis factor/cachectin, thrombin-antithrombin III, and protein C levels. Am J Med. 1991;91:37–44.
39. Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. Crit Care Med 2002; 30:207–213.
40. Henry CB, Duling BR. TNFα increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 279:2815–2823.
41. Huet O, Obata R, et al. Plasma-induced endothelial

oxidative stress is related to the severity of septic shock. Crit Care Med. 2007;35:821–826.
42. Ince C, Sinaasappel M Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. Crit Care Med. 1999; 27(7):1369-77.
43. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. Crit Care 2005; 9(Suppl. 4):13-19.
44. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC: Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. Blood 2005; 106:1525- 1531.
45. Karlsson S, Pettilä V et al. Vascular Endothelial Growth Factor in Severe Sepsis and Septic Shock. Anesthesia & Analgesia 2008; 106 (6): 1820-1826.
46. Kempe DS, Akel A, et al. Suicidal erythrocyte death in sepsis. J Mol Med (Berl). 2007; 85(3): 273-81.
47. Kim KL, Shin IS, et al. Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin 2 in endothelial progenitor cells. Cardiovasc Res 2006; 72:394-402.
48. Köhler M, Kaufmann I, et al. The endothelial glycocalyx degenerates with increasing sepsis severity. Crit Care. 2011; 15(Suppl 3): 22.
49. Krautkrämer E, Grouls S, et al. Mobilization of circulating endothelial progenitor cells correlates with the clinical course of hantavirus disease. J Virol. 2014; 88(1):483-9.
50. Kumaraswamy SB, Linder A, et al. Decreased plasma concentrations of apolipoprotein M in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. Crit Care. 2012;16: 60.
51. Lam C, Tyml K, et al. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. J Clin Invest 1994;94(5):2077–2083.
52. Lang F, Qadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. Blood Purif. 2012; 33(1-3):125-30.
53. Lang F, Gulbins E, et al. Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes. Cell Physiol Biochem 2010; 26: 21–28.
54. Linderkamp O, Ruef P, et al. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. Pediatr Res. 1998; 44(6):946-50.
55. Loscalzo J, Nitric oxide insufficiency, platelet activation and arterial thrombosis. Circ Res 2001; 88: 756-62.
56. Macias WL, Nelson DR. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. Crit Care Med. 2004;32(5 Suppl):223-8.
57. Maisonpierre PC, Suri C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science 1997; 277(5322):55-60.
58. Marechal X, Favory R, et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory disfucntion and vascular oxidative stress. Shock 2008; 29:572-6.
59. Martí-Carvajal AJ, Solà I, et al. Human recombinant activated protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. Editorial Group: Cochrane Anaesthesia Group. Published Online: 2012.
60. Mc Kinnon RL, Lidington D, et al. Reduced arteriolar conducted vasoconstriction in septic mouse cremaster muscle is mediated by nNOS-derived NO. Cardiovascular Research 2006; 69: 236-244.
61. Mervin C. Yoder Human Endothelial Progenitor Cells Cold Spring Harb Perspect Med. Jul 2012; 2(7).
62. Minneci PC, Deans KJ, et al. Antithrombotic therapies for sepsis: a need for more studies. Crit Care Med. 2006;34:538–41.
63. Moore MA, Hattori K, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. Ann N Y Acad Sci 2001; 938: 36-45.
64. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med. 1986;163:740–745.
65. Nieuwdorp M, Meuwese MC, et al. Tumor necrosis factor –alpha inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. Atherosclerosis 2009: 202:296-303.
66. Nelson A, Berkestedt I, et al. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. Shock 2008; 30: 623-627.
67. Nguyen Ba V, Peres Bota D, et al. Time course of hemoglobin concentrations in nonbleeding intensive care unit patients. Crit Care Med 2003; 31: 406-10.
68. Noci MV, Velasco F, et al. The effect of exogenous nitric oxide on plasminogen activator inhibitor in experimentally induced endotoxemia. Fibrinolysis 1996; 10:21-5.
69. Ong TD, McClintock E, et al. Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. Critical Care Medicine 2010; 38(9): 1845–1851.
70. Orfanos SE, Kotanidou A, et al. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. Crit Care Med. 2007 Jan;35(1):199-206.
71. Patschan SA, Patschan D, et al. Endothelial progenitor cells (EPC) in sepsis with acute renal dysfunction (ARD). Critical Care 2011; 15:R94.
72. Perez-Ruiz A, Montes R, et al. Regulation by nitric oxide of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator Inhibitor -1 in endothelial cells. Thromb Haemost 2002; 88:1060-5.
73. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, et al. Red blood cell rheology in sepsis. Intensive Care Med 2003: 29: 1052-61.
74. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, et al. Effects of colloid solutions on red blood cell shape in septic patients. Intensive Care Med 2002: 28 (Suppl.1): 306.
75. Poraicu D. Sandor S, et al. Decrease in red blood cell filterability seen in intensive care. II. Red blood cell crenellation “in vivo” as morphological evidence of increased red blood cell viscosity in low flow states. Resuscitation 1983; 10:305-316.
76. Powars D, Larsen R, et al. Epidemic meningococcemia and purpura fulminans with induced protein C deficiency. J Infect Dis. 1993;17:254–261.
77. Poschl JM, Leray C, et al. Endotoxin binding to erythrocyte membrane and erythrocyte deformability in human sepsis and in vitro. Crit Care Med 2003: 31: 924-8.

78. Poschl JM, Ruef P, et al. The effect of different Escherichia coli endotoxins on red blood cell deformability. Clin Hemorheol 1995: 15: 749-53.
79. Price SA, Spain DA, et al. Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. J Surg Res 1999; 83: 75-80.
80. Pries AR, Ley K, et al. Generalization of the Fahraeus principle for microvessel networks. Am J Physiol. 1986; 251(6 Pt 2):1324-32.
81. Remick DG, Biological Perspectives. Pathophysiology of Sepsis. Am J Pathol 2007; 170:1435-1444.
82. Ricciuto DR, dos Santos CC, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. Crit Care Med. 2011; 39(4):702-10.
83. Robaye B, Mosselmans R, et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. Am J Pathol. 1991; 138:447–453.
84. Rogiers P. Zhang H. Leeman M, et al. Erythropoietin response is blunted in critically ill patients. Intensive Care med 1997; 23: 159-62.
85. Sakr Y., Dubois M.J. et al. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. Crit. Care Med. 2004;32: 1825–1831.
86. Schleef RR, Loskutoff DJ. Fibrinolytic system of vascular endothelial cells. Role of plasminogen activator inhibitors. Haemostasis. 1988;18:328–341.
87. Secomb TW, Hsu R, Pries AR. A model for red blood cell motion in glycocalyx-lined capillaries. Am J Physiol 1998; 274:H1016-22.
88. Spolarics Z, Condon MR, et al. Red blood cell dysfunction in septic glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004: 286: 2118-26.
89. Suri C, Jones PF, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 1996; 87:1171-80.
90. Teijaro JR, Walsh KB, et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. Cell 2011;146:980–991.
91. Todd JC. Mollitt DL. Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis. Critical Care Medicine 1995: 23(3): 459-465.
92. Trzeciak S, Dellinger RP, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: Relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. Ann Emerg Med. 2007;49(1):88-98.
93. Tyml K, Wang X, et al. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281:1397-406.
94. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circ Res 2004; 95:343-35.
95. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. Trends Cardiovasc Med 2004; 14: 318-322.
96. Uyesaka N, Hasegawa S, et al. Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins. Biorheology 1992: 29: 217-29.
97. Van der Flier M, van Leeuwen HJ, et al. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. Shock 2005; 23(1):35-8.
98. Vincent JL, Piagnerelli M. Transfusion in the intensive care unit. Crit Care Med 2006; 34(suppl. 5): 96-101.
99. Vogel J, Sperandio M, et al. Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20:1571-8.
100. Yano K, Liaw PC, et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality J Exp Med. 2006; 203(6):1447-58.
101. Yi ES, Ulich TR. Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. Am J Pathol. 1992;140:659-663.
102. Yoder MC, Ingram DA: The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? Biochim Biophys Acta 2009; 1796: 50-54.
103. Zardi EM, Zardi DM, et al. Prostacyclin in sepsis: A systematic review. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007;83:1–24.
104. Zhang F.X. Kirchning C.J. et al. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-κ B through interleukin- J. Biol. Chem. 1999; 274:7611-7614.
105. Ziegler T, Horstkotte J, et al. Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis. J Clin Invest. 2013;123(8):3436–3445.

## SUMMARY

## ALTERED MICROCIRCULATION IN SEPTIC SHOCK

**Ratiani L., Gamkrelidze M., Khuchua E., Khutsishvili T., Intskirveli N., Vardosanidze K.**

*Tbilisi State Medical University; Elizabeth Blackwell Hospital, Tbilisi, Georgia*

Retrospective data analysis of microcirculation in septic shock was conducted. Sepsis is characterized by a severe microvascular dysfunction that persists despite fluid resuscitation and leads to multi-organ failure even after normalization of hemodynamics in response to fluid resuscitation, vasopressors and the treatment of infection. Several clinical studies suggest that microcirculatory alterations in severe sepsis are stronger predictors of outcome than global hemodynamic variables. Microvascular dysfunction under septic shock is related to: increased capillary permeability that manifests as a breakdown of the microvascular endothelial barrier (factors which may contribute to capillary leak syndrome include endogenous

proinflammatory cytokines, angiopoietin 2, vascular endothelial growth factor); arteriolar hyporesponsiveness to vasoconstrictors and vasodilators, the loss of adrenergic sensitivity and tone of smooth muscle cells lining the arterioles; loss of the anti-adhesive function of endothelial surfaces; decreased density of perfused capillaries (due to several contributing factors: decreased deformability of erythrocytes and neutrophils; activation of the clotting cascade with fibrin deposition and the formation of microthrombi; dysfunction of vascular autoregulatory mechanisms by nitric oxide; enhanced functional arteriovenous shunting of the microcirculation).

**Keywords:** septic shock, microcirculatory.

**РЕЗЮМЕ**

**ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПРИ СЕПТИЧЕСОМ ШОКЕ**

**Ратиани Л.Р., Гамкрелидзе М.М., Хучуа Э.П., Хуцишвили Т.А., Инцкирвели Н.А., Вардосанидзе К.Д.**

*Тбилисский государственный медицинский университет; Госпиталь им. Елизабет Блеквел, Тбилиси, Грузия*

Проведен анализ ретроспективной и текущей научной литературы по вопросу изменения микроциркуляции при септическом шоке. Проанализированы 108 зарубежных источников за 1984-2015 гг.

На основании данных обзора следует заключить, что сепсис характеризуется тяжелой микроваскулярной дисфункцией, которая персистирует несмотря на восполнение жидкости, и ведет к полиорганной недостаточности даже после нормализации кровообращения в ответ на восполнение жидкости, применение вазопрессоров и лечение инфекции. Согласно некоторым клиническим исследованиям, можно полагать, что микроциркуляторные изменения при тяжелом сепсисе являются более надежными прогностическими критериями исхода, чем глобальные гемодинамические переменные. Микроваскулярная дисфункция при септическом шоке связана со следующими факторами: повышенная капиллярная проницаемость, проявляющаяся как нарушение микроциркуляторного эндотелиального барьера; пониженная чувствительность артериол к вазоконстрикторам и вазодилятаторам, потеря адренергической чувствительности и тонуса клеток гладких мышц артериол; потеря анти-адгезивной функции эндотелиальных покровов. К факторам, способствующим синдрому капиллярной утечки относятся эндогенные провоспалительные цитокины, ангиопоэтин 2, васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF). Уменьшению количества перфузируемых капилляров могут способствовать следующие факторы: снижение деформабельности эритроцитов и нейтрофилов; активация каскада свертывания крови с образованием фибрина и формированием микротромбов; дисфункция механизмов васкулярной ауторегуляции оксидом азота; повышенное функциональное артериовенозное шунтирование крови в микроциркуляции.

რეზიუმე

მიკროცირკულაციური ცვლილებები სეპტიური შოკის დროს

ლ. რატიანი, მ. გამყრელიძე, ე. ხუჭუა,
თ. ხუციშვილი, ნ. ინწკირველი, ქ. ვარდოსანიძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერიტეტი; ელიზაბეტ ბლექველის ჰოსპიტალი, თბილისი, საქართველო

გაანალიზებულია რეტროსპექტული და თანამედროვე ლიტერატურის მონაცემები სეპტიური შოკის დროს მიკროცირკულაციური ცვლილებების შესახებ. შესწავლილია 1984-2015 წწ. 108 წყარო.

ავტორების მიერ გამოტანილია დასკვნა, რომ სეფსისისთვის დამახასიათებელია მძიმე მიკროვასკულური დისფუნქცია, რომელიც, სითხის აღდგენის მიუხედავად, ნარჩუნდება და სითხის აღდგენის, ვაზოპრესორებისა და ინფექციის მკურნალობის საპასუხოდ ჰემოდინამიკის მოწესრიგების შემდეგაც კი მულტიორგანულ დაზიანებას იწვევს. კლინიკური კვლევების ნაწილი უჩვენებს, რომ მძიმე სეფსისის დროს განვითარებული მიკროცირკულაციური ცვლილებები დაავადების გამოსავლის უფრო ზუსტი პროგნოზული ფაქტორებია, ვიდრე ზოგადი ჰემოდინამიკური მაჩვენებლები. მიკროვასკულური დისფუნქცია სეპტიური შოკის დროს უკავშირდება: კაპილარების კედლის გაზრდილ განვლადობას, რაც მიკროვასკულარული ენდოთელური ბარიერის დარღვევით ვლინდება (კაპილარებში ჟონვის სინდრომის ხელშემწყობ ფაქტორებს შორისაა ენდოგენური პროანთებითი ციტოკინები, ანგიოპოეტინ2, ვასკულური ენდოთელური ზრდის ფაქტორი), ვაზოკონსტრიქტორებისა და ვაზოდილატატორების მიმართ არტერიოლების დაქვეითებული რეაქტიულობა, არტერიოლთა კედლების გლუვკუნთოვანი ქსოვილის ადრენერგული მგრძნობელობის დაკარგვა და ტონუსის შემცირება; ენდოთელიუმის საფარის ანტიადჰეზიური ფუნქციის დაკარგვა; მოფუნქციონირე კაპილარების რაოდენობის შემცირება. ამ უკანასკნელის მიზეზი რამდენიმე ხელშემწყობი ფაქტორია: ერითროციტებისა და ნეიტროფილების შემცირებული დეფორმაბელობა; სისხლის შედედების რეაქციათა კასკადის აქტივაცია ფიბრინის წარმოქმნითა და მიკროთრომბების ფორმირებით; აზოტის ოქსიდის მონაწილეობით აუტორეგულაციური პროცესების მექანიზმების დარღვევა; მიკროცირკულაციის ფუნქციური არტერიოვენოზური შუნტირების ზრდა.

GEORGIAN MEDICAL NEWS
No 7-8 (244-245) 2015

# СИНДРОМ ТЕСТИКУЛЯРНОГО ДЕФИЦИТА У МУЖЧИН С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ОЖИРЕНИЕМ

**Лучицкий В.Е.**

*ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев, Украина*

Частота андрогенодефицитных состояний у мужчин, по разным данным, составляет примерно 30% и является строго ассоциированной со старением организма [14]. Согласно результатам длительных исследований установлено, что процент мужчин со сниженными уровнями тестостерона (Т) в крови (менее 12 нмоль/л) растет с возрастом: около 1% мужчин до 40 лет, более 20% - до 60 лет и более 40% - до 80 лет [7]. В ряде исследований продемонстрирована связь низких уровней Т общего (Тобщ) и свободного (Тсв) у мужчин с СД 2 типа, висцеральным ожирением (О), инсулино-резистентностью (ИР), гликированным гемоглобином и симптомами гипогонадизма (ГГ) [9]. Лонгитудинальные исследования (MMAS и MRFIT) свидетельствуют, что низкие уровни Тобщ, Тсв и секс-стероид-связующего глобулина (СССГ) являются предикторами и независимыми факторами риска развития СД 2 типа у мужчин [5,8]. Сахарный диабет является одним из самых распространенных заболеваний: в 2012 году он был диагностирован у 22,3 млн. лиц, это около 7% населения США и является причиной 176 млрд. долларов прямых и 69 млрд. долларов косвенных расходов [6]. СД 2 типа составляет 90-95% всех случаев диабета [12] и наблюдается его постоянный рост**.** Низкий уровень тестостерона ассоциируется с повышенной распространенностью заболеваний, развивающихся у мужчин старших возрастных групп: сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением, сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертензией (АГ) и повышенной смертностью [13]. У мужчин среднего возраста низкий уровень тестостерона в крови также является предиктором риска развития метаболического синдрома и его составляющих, причем риск развития абдоминального ожирения у них возрастает в 2,7 раза, СД 2 типа - в 2,1 раза, артериальной гипертензии - в 1,8 раза, гиперлипидемии - в 1,5 раза по сравнению с мужчинами с нормальной концентрацией Т в крови [10]. Несмотря на то, что связь между ИР и низкими уровнями Т обусловлена не только влиянием ожирения, висцерально-абдоминальная жировая ткань является существенным компонентом этого «порочного круга», причем взаимосвязь является бинаправленной, поскольку падение массы тела и повышение уровня Т в крови на фоне тестостерон-заместительной терапии (ТЗТ) приводят к уменьшению показателей ИР [11].

У гипогонадных мужчин тестостеронзаместительная терапия реверсирует часть неблагоприятных профилей риска развития СД и атеросклероза [11]. ТЗТ уменьшает тотальную жировую массу тела у мужчин с ГГ и у стареющих мужчин, что является подтверждением потенциирующей роли дефицита Т в развитии ожирения. В то же время, таких работ недостаточно и остается ряд проблемных вопросов: в полной мере не выяснены патогенетические механизмы, лежащие в основе взаимосвязей СД 2, ожирения и андрогенодефицита; непонятно обусловлена ли эта ассоциация обратимой причиной, либо в основе ее лежит взаимосвязь с наследственностью, состоянием общего здоровья, образом жизни, факторами окружающей среды.

Цель исследования - изучение функционального состояния гипофизарно-половой системы у мужчин старших возрастных групп, страдающих сахарным диабетом 2 типа с висцерально-абдоминальным ожирением и без него.

**Материал и методы.** Обследовано 89 мужчин в возрасте 46-76 лет (средний возраст 58,1±4,3 лет) с СД 2 типа, длительностью заболевания от 1 года до 12 лет. Обследованные мужчины были разделены на группы в зависимости от наличия или отсутствия ожирения (индекса массы тела (ИМТ) - ≥28 баллов, ВОЗ, 1997) и синдрома тестикулярной недостаточности (СТД) (симптомы андрогенодефицита и уровень Тобщ в крови <10,4 нмоль/л) [3]. Для оценки функционального состояния гипофизарно-половой системы определяли в крови концентрацию общего и свободного тестостерона, эстрадиола ($E_2$), лютропина (ЛГ) радиоиммунологическим методом. Обследованные пациенты были разделены на 4 группы: I группа – мужчины с СД 2 типа и ожирением (n=21); II группа - мужчины с СД 2 типа без ожирения (n=23); III группа - мужчины с СД 2 типа с ожирением и СТД (n=23); IV группа - мужчины с СД 2 типа без ожирения с СТД (n=22). Контрольную группу составили 40 мужчин без сахарного диабета, ожирения и половой дисфункции в возрасте 45-73 года.

Статистическая обработка данных проведена посредством пакета статистических приложений Excel с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки (M±m). Достоверность разницы между полученными результатами оценивали по критерию Стьюдента. Различие между сравниваемыми группами считалось достоверным при p<0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Определение концентрации Тобщ в крови показало достоверное снижение средних показателей у пациентов всех обследованных групп

по сравнению с показателями контрольной группы (таблица 1). Наиболее низкий средний уровень отмечался у пациентов с СД 2 типа, ожирением и СТД, причем наблюдалась достоверная разница между показателями III и IV групп (таблица 2). Отмечено достоверное снижение средних уровней Тсв у пациентов всех групп по сравнению с показателями контрольной группы (таблицы 1, 2). Наиболее низкий уровень гормона наблюдался у пациентов III группы, однако достоверной разницы между средними уровнями в группах не отмечалось. Необходимо отметить, что у пациентов с СД 2 типа, ожирением и андрогенодефицитом отмечалось наибольшее количество пациентов с низкими уровнями Тсв в крови, а наименьшее их количество было среди мужчин с СД 2 типа и ожирением (I группа).

Средний уровень $E_2$ в крови у пациентов с СД 2 типа и ожирением проявил тенденцию к повышению по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (таблица 1). У пациентов II, III и IV групп достоверного увеличения средних показателей $E_2$ в крови не отмечалось (таблицы 1, 2). Анализ индивидуальных показателей выявил, что во всех группах были пациенты с выраженным повышением концентрации $E_2$ (более 50% от показателя верхней границы нормальных колебаний), однако такие пациенты превалировали в IV группе (5 пациентов). С целью выявления относительного андрогенодефицита определялся коэффициент соотношения концентрации общего тестостерона и уровня эстрадиола ($T/E_2$), который был достоверно снижен у пациентов с СД 2 типа и ожирением (63,00±8,20) и в меньшей степени у пациентов с СД 2 типа без ожирения (112,40±8,16) по сравнению с контрольной группой (136,40±11,30). Определение коэффициента $T/E_2$ как маркера субклинического андрогенодефицита у мужчин с СД 2 типа является более простым способом, чем определение индекса биодоступного тестостерона, что требует сложных

*Таблица 1. Концентрация гормонов гипофиза и половых желез у обследованных пациентов с СД 2 типа в зависимости от наличия или отсутствия ожирения*

| Группа пациентов | Стат. показатель | Т общ, нмоль/л | Т св, пг/мл | $E_2$, пмоль/л | ЛГ, МЕ/л |
|---|---|---|---|---|---|
| СД 2 типа с ожирением | M±m | 9,7±0,7 | 10,6±1,7 | 0,28±0,08 | 3,9±0,7 |
| | n | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | p | <0,001 | <0,0 1 | 0,05> 0,1 | >0,5 |
| СД 2 типа без ожирения | M±m | 11,9±1,0 | 12,1±1,3 | 0,16±0,05 | 5,0±0,7 |
| | n | 23 | 23 | 23 | 23 |
| | p | <0,001 | <0,02 | > 0,5 | >0,2 |
| | $p_1$ | <0,02 | >0,2 | > 0,2 | >0,2 |
| Контрольная группа | M±m | 19,9±1,8 | 16,7±1,9 | 0,14±0,02 | 4,2±0,5 |
| | N | 40 | 15 | 28 | 34 |

*примечание: p - по сравнению с контрольной группой; $p_1$- по сравнению с группой с ожирением*

*Таблица 2. Концентрация гормонов гипофиза и половых желез у обследованных пациентов с СД 2 типа, ожирением и наличием/отсутсвием СТД*

| Группа пациентов | Стат. показатель | Т общ, нмоль/л | Т св, пг/мл | $E_2$, пмоль/л | ЛГ, МЕ/л |
|---|---|---|---|---|---|
| СД 2 типа с ожирением и СТД | M±m | 7,2±0,3 | 9,1±0,6 | 0,16±0,06 | 3,7±0,7 |
| | n | 23 | 23 | 23 | 23 |
| | p | <0,001 | <0,001 | >0,5 | >0,5 |
| СД 2 типа без ожирения с СТД | M±m | 8,9±0,4 | 10,0±0,9 | 0,2±0,04 | 5,1±0,5 |
| | n | 22 | 22 | 22 | 22 |
| | p | <0,001 | <0,01 | >0,1 | >0,1 |
| | $p_1$ | <0,001 | >0,2 | >0,5 | >0,1 |
| Контрольная группа | M±m | 19,9±1,8 | 16,7±1,9 | 0,14±0,02 | 4,2±0,5 |
| | n | 40 | 15 | 28 | 34 |

*примечание: p - по сравнению с контрольной группой; $p_1$- по сравнению с группой с ожирением*

математических расчетов. Полученные результаты концентрации половых гормонов в сыворотке крови у обследованных пациентов свидетельствуют о наличии не только абсолютного, но и относительного андрогенодефицита у мужчин с СД 2 типа. Средние уровни ЛГ в крови пациентов обоих групп не отличались достоверно от показателей контрольной группы (таблицы 1, 2). Анализ уровней ЛГ у отдельных больных указывает на полиморфизм данных - наблюдались как повышенные, так и нормальные уровни гормона. Эти данные свидетельствуют о сочетанном поражении центрального и периферического звеньев гипофизарно-гонадной системы и снижении ее функциональной активности у части обследованных пациентов.

Симптомы андрогенодефицита - ЭД, снижение либидо, энергичности, повышенную утомляемость, депрессивное настроение, нарушение когнитивных функций, уменьшение массы и силы мышц наблюдались у всех пациентов с СТД (III и IV группы). Согласно результатам анализа опросника AMS более выраженая симтоматика андрогенодефицита наблюдалась у пациентов с СД 2 типа и ожирением по сравнению с пациентами с СД 2 типа и СТД без ожирения (48,7±1,0 vs 42,1± 0,7 баллов соответственно, p<0,001). Считают, что ожирение является одним из основных факторов возрастного падения уровня тестостерона [15]. Полученные нами результаты подтвердили достоверное снижение среднего уровня Тобщ в крови у мужчин, больных СД 2 типа и ожирением. Необходимо отметить, что этот показатель был достоверно ниже, чем аналогичный показатель у мужчин, больных СД 2 типа без ожирения. Согласно результатам наших исследований, проведенных ранее, сниженный уровень Тобщ в крови наблюдался у 39% обследованных пациентов с СД 2типа, а у мужчин с СД 2 типа и ожирением - в 56,5% случаев [1], более выраженное снижение уровней Тобщ наблюдается у пациентов, больных СД 2 типа с ожирением и симптомами андрогенодефицита. Средние уровни Тсв в крови у обследованных нами пациентов были сниженными, как у мужчин с СД 2 типа и ожирением, так и у мужчин с СД 2 типа, ожирением и СТД. Уровни тестостерона были обратно-пропорциональны ИМТ и ОТ (r=-0,21 и r=-0,23, соответственно). Более низкие уровни Т в нашем исследовании наблюдались у пациентов с ожирением, СД 2 типа и СТД, подтверждая данные литературы о том, что ожирение связано с повышенной частотой ГГ, а наличие СД у мужчин ассоциируется с повышением низких уровней Т, особенно Тсв [4].

Результаты исследования свидетельствуют о наличии не только абсолютного, но и относительного андрогенодефицита у мужчин с СД 2 типа, наряду с сочетанным поражением центрального и периферического звеньев гипофизарно-гонадной системы и снижения ее функциональной активности.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Лучицький В.Є. Андрогендефіцитний стан у чоловіків, хворих на цукровий діабет 2 типу. Ендокринологія. 2013; 8(3): 85-86.
2. Allan C.A., McLachlan R.I. Androgens and obesity. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010; 17(3): 224-232.
3. Chandel A., Dhindsa S., Topivala S. et al. Testosterone concentration in young patients with diabetes. Diabetes Care. 2008; 31: 2013-2017.
4. Dhindsa S., Miller M.G., McWhirter C.L. et al. Testosterone concentrations in diabetic and nondiabetic obese men. Diabetes Care 2010; 33(6): 1186-1192.
5. Feldman H.A., Goldstein I, Hatzichrisou D.G et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates; results of the MMAS. J Urol. 1994; 151: 54–61.
6. Ganz M., Wintfeld N., Li Q. et al. The association of body mass index witn the risk of type 2 diabetes: a case-control study nested in an electronic health records system in the United States. Diabetol & Metabolic Syndr. 2014; 6: 50.
7. Hackett G., Kell P., Ralph D. et al. British society for sexual medicine guide-lines on the management of erectile dysfunction. J Sex Med. 2008; 5: 1841-1846.
8. Haffner S.M., Shaten J., Stern M.P. et al. Low levels of sex hormone-binding globulin and testosterone predict the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in men. MRFIT Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial. Am J Epidemiol. 1996; 143: 889–897.
9. Kupelian V., Page S.T., Araujo A.B. et al. Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91: 843–850.
10. Mazur A., Westerman R., Werdecker A., Muelle U. Testosterone and type 2 diabetes in men. Aging Male 2014; 17(1): 18-24.
11. Moon du G., Rim J.W., Kim J.J et al. Prevalence of symptoms and associatede of testosterone deficiency syndrome in the Korean general population. J Sex Med. 2014; 11(2):583-594.
12. National Diabetes Statistics Report. 2014. Available on: http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/statsreport14/national-diabetes-report-web.pdf.
13. Rao P.M., Kelly D.M., Jones T.H. Testosterone and insuline resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. Nat Rev Endocrinol. 2013; 9: 479-493.
14. Traish A.M., Miner M.M., Morgentaler A., Zitzman M. Testosterone deficiency. Amer J Med. 2011; 124: 578-587.
15. Wu F.C., Tayar A., Pye S.R. et al. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. J Clin Endocrinol Metab. 2008; (93): 2737-2745.

**SUMMARY**

**TESTICULAR DEFICIT SYNDROME IN MEN WITH TYPE 2 DIABETES AND OBESITY**

**Luchytskyy V.**

*SI «V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism NAMS of Ukraine », Kyiv, Ukraine*

The aim of the study was to examine the level of sex and pituitary hormones in men of older age groups suffering from type 2 diabetes with visceral-abdominal obesity and without it.

The study involved 89 men aged 46-76 years with type-2 diabetes. We analyzed the levels of sex hormones (total and free testosterone, estradiol) and lutenizing hormone levels in the blood of men in the survey, depending on the presence/absence of obesity and androgen deficiency.

Average levels total and free testosterone were significantly reduced in patients of all groups surveyed. The lowest level of androgens observed in patients with type 2 diabetes, obesity and androgen. Mid E2 levels only in patients with type 2 diabetes and obesity showed a tendency to increase. Coefficient of T/E2 was significantly reduced in patients with type 2 diabetes and obesity (63,00±8,20) and to a lesser extent in patients with type 2 diabetes without obesity (112,40±8,16) compared the control group (136,40±11,30). The results indicate the presence of not only absolute, but relative androgendeficiency in men with type 2 diabetes.

**Keywords:** testosterone, type 2 diabetes, men, obesity.

**РЕЗЮМЕ**

**СИНДРОМ ТЕСТИКУЛЯРНОГО ДЕФИЦИТА У МУЖЧИН С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ОЖИРЕНИЕМ**

**Лучицкий В.Е.**

*ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев, Украина*

Целью исследования явилось изучение уровня половых и гипофизарных гормонов у мужчин старших возрастных групп, страдающих сахарным диабетом 2 типа с висцерально-абдоминальным ожирением и без него.

Обследовано 89 мужчин в возрасте 46-76 лет с СД-2 типа. Проанализированы уровни половых гормонов (общего и свободного тестостерона, эстрадиола) и концентрация лютропина в крови у обследованных мужчин в зависимости от наличия/отсутствия ожирения и андрогенодефицита.

Средние уровни общего и свободного тестостерона были достоверно снижены у пациентов всех обследованных групп. Наиболее низкий уровень андрогенов отмечался у пациентов с СД 2 типа, ожирением и андрогенодефицитом. Средний уровень эстрадиола в крови только у пациентов с СД-2 и ожирением показывал тенденцию к повышению. Коэффициент $T/E_2$, был достоверно снижен у пациентов с СД 2 типа и ожирением (63,00±8,20) и в меньшей степени у пациентов с СД 2 типа без ожирения (112,40±8,16) по сравнению с контрольной группой (136,40±11,30). Полученные результаты свидетельствуют о наличии не только абсолютного, но и относительного андрогенодефицита у мужчин с СД 2 типа.

**რეზიუმე**

**ტესტიკულური დეფიციტი სიმსუქნისა და შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ის მქონე მამაკაცებში**

**ვ. ლუჩიცკი**

*ვ.პ. კომისარენკოს სახ. უკრაინის ენდოკრინოლოგიის და ნივთიერებათა ცვლის ინსტიტუტი, კიევი, უკრაინა*

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ჰიპოფიზური და სასქესო ჰორმონების მაჩვენებლების შეფასება შაქრიანი დიაბეტის მქონე მამაკაცებში ჭარბი წონით და მის გარეშე.

კვლევაში ჩართული იყო შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ის მქონე 89 პაციენტი, ასაკით 46-76 წ. კვლევის ფარგლებში გაანალიზდა ანდროგენდეფიციტი სიმსუქნის მქონე და არმქონე პაციენტების სისხლში სასქესო ჰორმონების (საერთო და თავისუფალი ტესტოსტერონის, ესტრადიოლის) და LH დონის მიხედვით.

საერთო და თავისუფალი ტესტოსტერონი სარწმუნოდ იყო შემცირებული ყველა შესწავლილ ჯგუფში. ანდროგენების ყველაზე დაბალი დონე აღინიშნებოდა პაციენტებში შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ით, სიმსუქნით და ანდროგენდეფიციტით, ხოლო საშუალო დონე დაფიქსირდა პაციენტებში შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ით და სიმსუქნით. კოეფიციენტი T/E2 მნიშვნელოვნად შემცირებული იყო პაციენტებში შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ით და სიმსუქნით (63,00±8,20) და ნაკლებად - პაციენტებში შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ით სიმსუქნის გარეშე (112,40±8,16), შედარებით საკონტროლო ჯგუფთან (136,40±11,30). კვლევის შედეგები მიუთითებს, რომ შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ის მქონე მამაკაცებში სიმსუქნით აღინიშნებოდა აბსოლუტური ან შეფარდებითი ანდროგენდეფიციტი.

# ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА TREC (T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES) У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

**[1]Искакова С.С., [1]Уразаев О.Н., [1]Бекмухамбетов Е.Ж., [2]Дворацки Г., [1]Дворацка М.**

*[1]Западно-Казахстанский государственный медицинский университет им. Марата Оспанова, Актобе, Казахстан; [2]Медицинский университет им. Кароля Марцинковского, Познань, Польша*

Сахарный диабет 2 типа (СД2) – болезнь с хроническим развитием, характеризуется гипергликемией, инсулинорезистентностью и сопровождается повреждением, дисфункцией и недостаточностью различных органов и тканей [1], в том числе и тимуса. Тимус является основным лимфоидным органом, обеспечивающим генерацию Т-клеток, играющих значимую роль в иммунном ответе на чужеродные антигены [14].

Установлено, что сахарный диабет ведет к постепенной инволюции тимуса и потере большей части популяции тимоцитов, за счет того, что избыточное количество глюкозы вызывает апоптоз тимоцитов [10]. Кроме того, повышенный риск развития инфекций и рака у больных СД2 [22,26] также предполагает нарушение функциональной активности тимуса. Описаны механизмы, участвующие в сложных взаимосвязях между инфекцией, иммунным ответом, повреждением сосудистой стенки и развитием атеросклероза [21]. Показано, что ожирение, тесно связанное с метаболическими расстройствами, как СД2 и дислипидемия, может повлиять на иммунные ответы [3,20]. Это связано с тем, что ожирение ускоряет возрастную инволюцию тимуса на нескольких уровнях, включающих повышенный апоптоз развивающихся тимоцитов, снижение пула предшественников Т-клеток и сокращение числа ранних эмигрантов тимуса (recent thymic emigrants – RTE) [18,34].

По уровню RTE можно оценить выброс Т-клеток тимусом [11]. RTE – самое молодое подмножество наивных Т-клеток, эмигрирующих из вилочковой железы на периферию, подвергавшихся только нескольким клеточным делениям после выхода из тимуса [13]. На сегодняшний день хорошим показателем уровня RTE является величина содержания Т-рецепторных эксцизионных колец (T-cell Receptor Excision Circles - TREC) в периферической крови [24,28,35]. Определение концентрации TREC является наиболее доступным и малоинвазивным методом в диагностике, мониторинге и прогнозировании таких заболеваний, как ВИЧ-инфекция, иммунодефициты и злокачественные заболевания кроветворной системы [27]. TREC – это структуры, являющиеся побочными продуктами реаранжирации вариабельных генов альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора, когда часть участка ДНК вырезается, замыкается в кольцо и служат маркером RTE. Суть перестройки генов заключается в сближении случайных сегментов генетического материала с последующим двойным разрывом ДНК и сшивке этих сегментов с образованием зрелого V-гена. Вырезанный между этими сегментами генетический материал замыкается в кольцо и остается в эписомах клетки, это и есть TREC. Поскольку ДНК в составе TREC не дуплицируется при дальнейшем делении клеток, их количественная оценка является ценным инструментом для оценки функции тимуса [4].

В настоящее время широко признано, что значимую роль в развитии, выживании и процессе дифференцировки Т-клеток играет цитокин – интерлейкин – 7 (IL-7), лимфопоэтический фактор роста [8,30]. Установлено, что уровень циркулирующего IL-7 повышается в лимфопенических условиях, включающих хроническую ВИЧ-1 инфекцию, и обратно коррелирует с числом общих и наивных $CD4^+$ Т-клеток [19,25]. На животных моделях показано, что IL-7 приводит к иммунному восстановлению, увеличивая как выброс Т-клеток из тимуса [16], так и экстратимическую пролиферацию [9]. Отсутствие IL-7 и экспрессии его рецепторов проявляется тяжелым иммунодефицитом и лимфопенией [31].

Вышеуказанные данные свидетельствуют о том, что СД2 сопровождается не только метаболическими нарушениями, но и нарушениями в клеточном иммунитете. Однако в настоящее время нет ясного представления о механизме возникновения патологических изменений в тимусе при диабете.

Целью исследования явилось определение количества Т-рецепторных эксцизионных колец у больных сахарным диабетом 2 типа и анализ потенциальных факторов, влияющих на тимический выброс.

**Материал и методы.** Исследование проводили у 82 лиц: I группа (n=68) – больные сахарным диабетом 2 типа, получавшие монотерапию метформином (Glucophage®, Siofor®, от 500 до 3000 мг в день) или комбинацию метформина с инсулином (Mixtard®, Gensulin®, Humulin®, Humalog®, NovoMix®); II группа (n=14) – здоровые лица без сахарного диабета (контроль). Обе группы были репрезентативны по возрасту и антропометрическим параметрам.

У каждого пациента определялись гликемия натощак, гликированный гемоглобин HbA1c, 1,5-ангидро-Д-глюцитол (1,5-anhydro-D-glucitol - 1,5-AG), общий

холестерин, ЛПВП-холестерин и ЛПНП-холестерин, триглицериды и С-пептид.

Концентрацию глюкозы измеряли с образцов венозной крови по методу глюкозооксидазы. Липидный профиль анализировали с использованием стандартных ферментативных методов (общий холестерин, ЛПВП-холестерин, ЛПНП-холестерин - методом холестеролэстеразы, а концентрацию триглицеридов - методом глицерофосфатоксидазы). HbA1c (уровень в норме - 4,1-6,0%) анализировали иммунотурбидиметрическим методом (Cobas Integra 400/700/800), стандартизированным в соответствии с IFCC [33].

Концентрация 1,5-AG – маркера постпрандиальной гипергликемии [5], выявлялась с использованием модифицированного ферментного метода [6]. На сегодняшний день уровень 1,5-AG не является стандартным маркером для контроля диабета, однако это единственный параметр, который ретроспективно определяет эпизоды краткосрочной постпрандиальной гипергликемии у пациентов с близкими или целевыми уровнями HbA1c [6]. Поэтому снижение уровня 1,5-AG ретроспективно указывает на гипергликемические эпизоды (уровень 1,5-AG в норме - 13,8-30,2 мг/л) [6].

Концентрацию С-пептида измеряли иммуноэнзиматическим методом с использованием DIAsource Immuno Assay (C-peptide), произведенный R&D Systems, Inc.

Количественный анализ ПЦР осуществлялся на LightCycler® 480 System (Roche, Mannheim, Germany), были использованы для определения сигнала соединения (signal-joint sj) TREC и Т-клеточный рецептор альфа константы (T Cell Receptor Alpha Constant – TRAC) в соответствии с ранее известными методами [17,29]. Геномную ДНК экстрагировали из мононуклеарных клеток периферической крови (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC). Усиление TRAC использовано в качестве внутреннего контроля и нормализации входов ДНК. ПЦР проводили в 10 мкл содержащих растворов ~ 50 нг ДНК, 1x LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Mannheim, Germany), 0,5 мкм каждого прямого и обратного праймеров и 0,2 мкм FAM-BHQ1 зонд (Institute of Biochemistry and Biophysics, Warsaw, Poland). Праймеры прямого sjTREC (5'- TGCCACATCCCTTTCAACC -3') и обратного (5'- TGAGAACGGTGAATGAAGAG-3'), зонды sjTREC (5'-Fam-ACCCCGTGCCTAAACCCTGC-BHQ-1-3') так же как праймеры прямого TRAC (5'- TAACCCTGATCCTCTTGTCC-3') и обратного (5'- ATCGGTGAATAGGCAGACAG-3') и зонд TRAC (5'-Fam-TCACTGGATTTAGAGTCTCTCAGC-BHQ-1-3') проведены с использованием Oligo Primer Analysis Software version 5.0 (Cascade, CO, USA). Уникальность праймеров и зондов подтверждена поиском BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Количество копий sjTREC и TRAC получены путем экстраполяции соответствующих пробных партий из стандартных кривых, которые были получены путем серийного разведения линеаризованных плазмид, содержащих вставки ДНК sjTREC и TRAC. В этих целях фрагменты sjTRECs и TRACS были клонированы в pGEM-T Easy vectors (Promega, Madison, WI, USA) [**15**]. Вставки плазмид были идентифицированы посредством ПЦР и подтверждены прямой последовательностью. Концентрация sjTREC/ $10^6$ PBMC рассчитана по формуле:

$$\frac{\text{количество sjTREC}}{\text{количество TRAC/2}} \times 10^6$$

Концентрацию интерлейкина-7 в сыворотке измеряли иммуноэнзиматическим методом с использованием Quantikine® HS ELISA Human IL-7 Immunoassay, производства R&D Systems, Inc.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «STATISTICA 8.0» фирмы StatSoft, Inc. США. Все результаты выражались в среднем значении ± стандартное отклонение и медиана. Тест Шапиро-Уилко был использован для оценки распределения исследованных переменных. Статистические гипотезы проверены посредством критерия Крускала-Уоллиса ANOVA или Манна-Уитни (в случае ненормального распределения), теста Стьюдента (в случае нормального распределения). Использован анализ ковариации ANCOVA (analysis of covariance). Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

**Результаты и их обсуждение.** Характеристики обеих исследуемых групп отражены в таблице 1.

Установлено отсутствие достоверных различий между возрастом пациентов, уровнями С-пептида и липидного профиля в обеих группах. Антропометрические показатели индекс массы тела (ИМТ) и окружность живота были статистически выше в группе с диабетом. При сравнении параметров углеводного обмена обнаружено, что показатели гликемии натощак, HbA1c были достоверно выше в группе больных СД2 по сравнению с контрольной группой. Тогда как концентрация 1,5-AG в группе с диабетом по сравнению с контролем оказалась ниже.

Анализ концентраций sjTREC в расчете на $10^5$ PBMC показал достоверное снижение у больных СД2 по сравнению со здоровыми лицами (рис. 1), в то же время различий уровня IL-7 между исследуемыми группами не выявлено (рис. 2).

*Таблица 1. Характеристика групп*

| Параметры | Группа с СД2 n=68 | Контрольная группа n=14 |
|---|---|---|
| | mean±SD, median | |
| Возраст (лет) | 67,5±8,7<br>67 | 63,9±11,5<br>69,5 |
| Индекс массы тела (кг/м$^2$) | 32,9±5,2*<br>32,4 | 30,6±3,3<br>30,8 |
| Окружность живота (см) | 106,7±11,8*<br>106,5 | 101,1±10,7<br>99 |
| Длительность диабета (лет) | 7,4±2,8<br>8,0 | |
| Гликемия натощак (ммоль/л) | 7,9±2,8*<br>7,2 | 5,0±0,2<br>5,1 |
| 1,5-AG (мг/л) | 15,5±5,8*<br>8,0 | 23,0±3,0<br>24,6 |
| HbA1c (%) | 7,2±1,0*<br>6,9 | 5,3±0,3<br>5,2 |
| Общий холестерин, (мг/дл) | 169,8±36,3<br>167,0 | 179,5±18,0<br>179,5 |
| ЛПВП (мг/дл) | 55,6±16,4<br>52,0 | 56,0±11,9<br>55,5 |
| ЛПНП (мг/дл) | 83,2±32,2<br>78,5 | 92,2±12,2<br>91,0 |

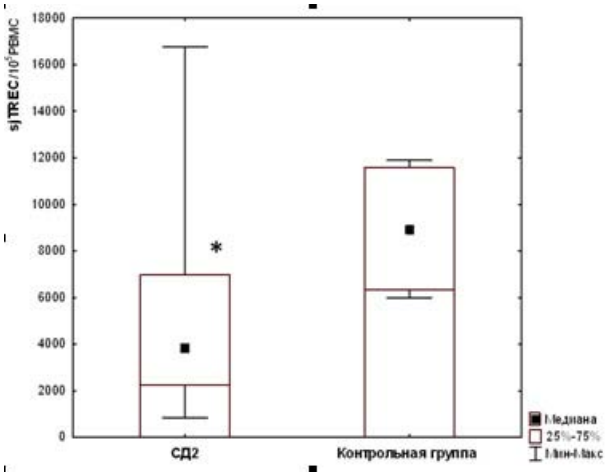



*Рис. 1. Сравнение sjTREC между группами*

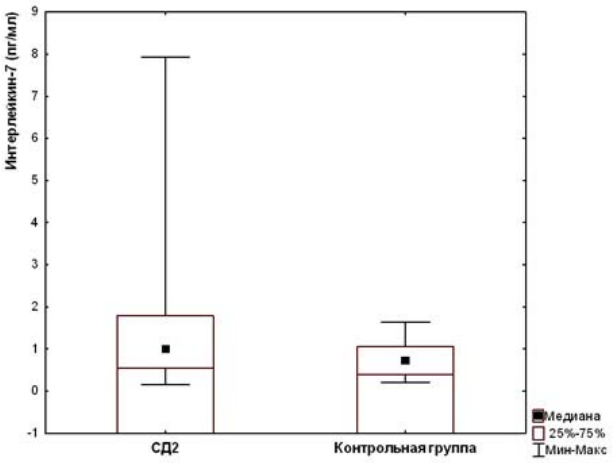



*Рис. 2. Сравнение Il-7 между группами*

**- статистически значимо p≤0,05*

Учитывая данные литературы, свидетельствующие, что ожирение, метаболические ухудшения и продолжительность диабета могут повлиять на выброс Т-клеток из тимуса [10,21,22,34], нами проведен статистический анализ для подтверждения, что эти факторы модифицируют концентрацию sjTREC в периферической крови пациентов с СД2, получавших метформин. Больные СД2 были разделены на три подгруппы: с низким, средним и высоким показателями возраста, ИМТ, окружности живота, длительности диабета, гликемии натощак, HbA1c и 1,5-AG. Для статистической обработки включены низкие и высокие показатели исследуемых факторов. Результаты концентрации sjTREC представлены в таблице 2.

Анализ результатов показал, что возраст больных СД2 не влияет на концентрацию sjTREC. При сравнении параметров ожирения выявлено, что по уровням ИМТ между двумя группами в количестве sjTREC разницы не выявлено, однако уровень sjTREC достоверно ниже у больных с более выраженной окружностью живота (115,0-132,0 см). Как мы и предполагали, концентрация sjTREC достоверно выше у пациентов с короткой длительностью диабета, с лучшим гликемическим контролем (с низкими уровнями гликемии натощак, HbA1c и более высоким значением 1,5-AG).

*Таблица 2. Сравнение уровня sjTREC ($10^5$ PBMC) у пациентов с СД2, леченых метформином, с учетом возраста, ИМТ, окружности живота, длительности диабета, гликемии натощак, HbA1c и 1,5-AG*

| **Возраст (лет)** | **42-60** | **75-89** |
|---|---|---|
| sjTREC | 5310,2±2914,7<br>5013,0 | 4482,3±4495,4<br>2625,0 |
| ИМТ (кг/м$^2$) | 22,5-29,4 | 36,0-43,1 |
| sjTREC | 4243,8±3374,7<br>2688,0 | 4231,6±2862,1<br>3674,5 |
| Окружность живота (см) | 79,0-100,0 | 115,0-132,0 |
| sjTREC | 5045,5±4265,3*<br>3285,0 | 4362,9±2795,6<br>4176,5 |
| Длительность диабета (лет) | 2,0-5,0 | 10,0-15,0 |
| sjTREC | 6299,1±4160,6*<br>4810,5 | 3078,5±2020,9<br>2625,0 |
| Гликемия натощак (ммоль/л) | 4,6-6,6 | 9,4-17,0 |
| sjTREC | 5552,2±3551,9*<br>5034,0 | 3765,8±2940,2<br>2785,0 |
| $HbA_1c$ (%) | 5,5-6,5 | 7,7-9,9 |
| sjTREC | 5897,3±4383,9*<br>4824,0 | 3438,9±2154,8<br>3035,0 |
| 1,5-AG (мг/л) | 19,0-29,7 | 4,2-7,2 |
| sjTREC | 6632,3±4413,9*<br>5294,0 | 3839,8±2453,5<br>3285,0 |

** -статистически значимо для p≤0,05*

*Таблица 3. Сравнение sjTREC ($10^5$ PBMC) между пациентами с СД2 и контрольной группой согласно результатам ANCOVA*

| | **F** | **p** |
|---|---|---|
| Модель 1 | | |
| ИМТ | 0,05 | 0,82 |
| Окружность живота | 0,02 | 0,88 |
| Глюкоза натощак | 5,02 | 0,03* |
| Метаболический статус | 6,61 | 0,01* |
| Модель 2 | | |
| ИМТ | 0,01 | 0,55 |
| Окружность живота | 0,05 | 0,82 |
| 1,5-AG | 6,78 | 0,01* |
| Метаболический статус | 4,87 | 0,03* |
| Модель 3 | | |
| ИМТ | 0,10 | 0,75 |
| Окружность живота | 0,08 | 0,77 |
| HbA1c | 4,18 | 0,05* |
| Метаболический статус | 3,35 | 0,07 |

** -статистически значимо для p≤0,05*

Для определения причины (общий метаболический статус или ухудшение углеводного обмена), влияющей на концентрацию sjTREC у больных СД2 и лиц без диабета, проведен анализ ковариации с использованием трех моделей, при которых разница концентраций sjTREC считалась, как зависимая переменная, а ИМТ, окружность живота и параметры углеводного обмена: гликемия натощак, 1,5-AG или HbA1c с общим метаболическим статусом (СД2 или без диабета) - как независимые переменные (таблица 3).

Результаты, полученные в моделях с гликемией натощак и 1,5-AG, как независимых переменных (модели 1 и 2), подтвердили, что общий метаболический статус,

связанный с СД2, влияет на различия в концентрациях sjTREC между исследуемыми группами независимо от других показателей. Данные третьей модели продемонстрировали, что HbA1c - показатель хронической гипергликемии, является фактором, определяющим различия sjTREC между группами независимо от других факторов.

Полученные нами результаты в целом подтверждают данные о негативном влиянии СД на функцию тимуса, как источника иммунокомпетентных Т-клеток, участвующих в распознавании и элиминации чужеродных антигенов. Атрофия тимуса отмечалась у крыс с диабетом, вызванным стрептозотоцином [2]. В работе Gruia AT и соавт. [10] показано, что избыток глюкозы может привести к постепенной инволюции тимуса путем повышенного апоптоза лимфоцитов. При этом в стромальных макрофагах тимуса накапливаются свободные жирные кислоты, в том числе и арахидоновая кислота, являющаяся субстратом для эйкозаноидов, которые, в свою очередь, модулируют активность макрофагов с целью фагоцитирования апоптических лимфоцитов.

Как известно, ожирение является фактором, тесно связанным с сахарным диабетом. Исследования последних лет показывают, что при ожирении наблюдаются иммунологические нарушения [3]. В эксперименте, а затем и в клинике установлено, что у лиц с ожирением, в том числе при СД2, тимопоэз обратнопропорционален ИМТ, а концентрация TREC в периферических лимфоцитах снижена, как и концентрация наивных Т-клеток при одновременном увеличении количества Т-клеток памяти, что указывает на преждевременную инволюцию тимуса при ожирении [34].

Van der Weerd и соавт. [32] обнаружили селективное увеличение $CD4^+$Т-клеток в периферической крови, тогда как количество $CD8^+$Т-клеток было нормальным, при сниженном содержании sjTREC, а также выявили положительную корреляцию количества $CD4^+$ Т-клеток с уровнем инсулина натощак. Это связано с повышенной пролиферацией гомеостатических Т-клеток, которой могут способствовать повышенные плазменные уровни цитокинов IL-7 и CCL5.

В недавнем исследовании у лиц с ожирением, переживших атомную бомбардировку в Японии, выявлены значительные обратные корреляции между количеством sjTREC и некоторыми показателями ожирения (ИМТ, HbA1c), сывороточным уровнем С-реактивного белка, а развитие СД2 также было связано с меньшим количеством sjTREC [36].

Исследованиями установлено, что СД2 повышает риск развития и смертность от некоторых злокачественных новообразований [7], восприимчивость к инфекциям [21], что вызвано ослаблением Т-клеточного иммунитета.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что у больных сахарным диабетом 2 типа снижено количество sjTREC в периферической крови по сравнению со здоровыми лицами без диабета. Кроме того, на уровень концентрации sjTREC влияют длительность СД2, степень гликемического контроля. При этом причиной снижения эмиграции Т-клеток из тимуса у больных сахарным диабетом 2 типа является хроническая гипергликемия.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2014. Diabetes Care 2014; 37 Suppl 1:14-80.
2. Chatamra K, Daniel PM, Kendall MD, Lam DK. Atrophy of the thymus in rats rendered diabetic by streptozotocin. Horm Metab Res. 1985; 12:630-2.
3. de Jong AJ, Kloppenburg M, Toes RE, Ioan-Facsinay A. Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function. Front Immunol 2014;13(5):483.
4. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. Nature 1998; 17;396(6712):690-5.
5. Dungan KM, Buse JB, Largay J, Kelly MM, Button EA, Kato S, Wittlin S. 1,5 -anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as measured by continuous glucose monitoring system in moderately controlled patients with diabetes. Diabetes Care 2006; 29: 1214-1219.
6. Dworacka M. and Szczawi´nska K., The application of enzymatic method for 1,5-anhydro-D-glucitol estimation in plasma, Diagnostyka Laboratoryjna 33 1997; 269–276.
7. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, et al. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. JAMA 2007; 298(17):2028–2037.
8. Freitas AA., Rocha B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. Ann. Rev. Immunol. 2000; 18: 83–111.
9. Fry TI, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. Blood 2001; 97: 1525-33.
10. Gruia AT, Barbu-Tudoran L, Mic AA, Ordodi VL, Paunescu V, Mic FA . Arachidonic acid accumulates in the stromal macrophages during thymus involution in diabetes. Histochem Cell Biol. 2011;136:79–92.
11. Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. Nature Medicine 2000; 6: 1036–1042.
12. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature 2006; 444: 860-7.
13. Houston EG Jr, Higdon LE, Fink PJ. Recent thymic emigrants are preferentially incorporated only into the depleted T-cell pool. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(13):5366-71.

14. Jin R, Zhang J, Chen W. Thymic output: influence factors and molecular mechanism. Cell Mol. Immunol. 2006; 3(5):341-50.
15. Krenger W, Schmidlin H, Cavadini G, Holländer GA. On the relevance of TCR rearrangement circles as molecular markers for thymic output during experimental graft-versus-host disease. J Immunol. 2004; 172(12):7359-67.
16. Mackall CL, Fry Tj, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. Blood 2001; 97:1491-7.
17. Motta M, Chiarini M, Ghidini C, Zanotti C, Lamorgese C, Caimi L, et al. Quantification of newly produced B and T lymphocytes in untreated chronic lymphocytic leukemia patients. J Transl Med 2010; 8: 111.
18. Moulin CM, Marguti I, Peron JP, Rizzo LV, Halpern A. Impact of adiposity on immunological parameters. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53:183–189.
19. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. Nat Med 2001;7(1):73-9.
20. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ,Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. 2011;11:85–97.
21. Pedicino D, Giglio AF, Galiffa VA, Cialdella P, Trotta F, Graziani F, Liuzzo G. Infections, immunity and atherosclerosis: pathogenic mechanisms and unsolved questions. Int J Cardiol 2013; 166(3):572-83.
22. Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: Pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. Diabetes Metab Res Rev 2007; 23: 3–13.
23. Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. Leukemia 1998; 12(12):2006-14.
24. Saitoh A, Singh KK, Sandall S, et al. Association of CD4þ T-lymphocyte counts and new thymic emigrants in HIV-infected children during successful highly active antiretroviral therapy. J Allergy Clin Immunol. 2006; 117(4):909-15.
25. Sasson SC, Zaunders JJ, Zanetti G, King EM, Merlin KM, Smith DE, et al. Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. J Infect Dis 2006; 193(4): 505-14.
26. Shikata K, Ninomiya T, Kiyohara Y. Diabetes mellitus and cancer risk: review of the epidemiological evidence. Cancer Sci 2013;104(1):9-14.
27. Somech R, Lev A, Simon AJ, Korn D, Garty BZ, et al. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. Isr Med Assoc J 2013;15(8):404-9.
28. Somech R. T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011;11(6):517-24.
29. Sottini A, Ghidini C, Zanotti C, Chiarini M, Caimi L, Lanfranchi A, et al. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. Clin Immunol. 2010; 136(2): 217-27.
30. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. Nature immunology 2011;12:478–484.
31. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. Immunity 2008;29:848-862.
32. van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. Diabetes 2012; 61(2):401-8.
33. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO, et al. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: A 6-Year Progress Report. Clin Chem 2008; 54(2): 240-248.
34. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, et al. Obesity accelerates thymic aging. Blood 2009; 114: 3803–3812.
35. Yin L, Rodriguez CA, Hou W, Potter O, Caplan MJ, Goodenow MM, et al. Antiretroviral therapy corrects HIV-1- induced expansion of CD8þ CD45RAþ CD2-) CD11a(bright) activated T cells. J Allergy Clin Immunol. 2008; 122(1):166-72.
36. Yoshida K, Nakashima E, Kubo Y, Yamaoka M, Kajimura J, Kyoizumi S, et al. Inverse associations between obesity indicators and thymic T-cell production levels in aging atomic-bomb survivors. PLoS One 2014;9(3):91985.

## SUMMARY

## THE DIFFERENCES OF TREC (T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES) CONCENTRATION IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

**[1]Iskakova S., [1]Urazayev O., [1]Bekmukhambetov Y., [2]Dworacki G., [2]Dworacka M.**

*[1]West Kazakhstan State Medical University, Aktobe, Kazakhstan; [2]Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland*

Aim - to determine the number of sjTREC in type 2 diabetic patients and to analyze the potential factors affecting thymic output.

The subjects of this study were 82 people: group I (n=68) – type 2 diabetic patients; group II (n=14) – healthy people. Measurements were taken: fasting glycemia, HbA1c, 1,5-AG (1,5-anhydro-D-glucitol), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, C-peptide and interleukin-7.

Quantification of sjTREC concentration in peripheral blood mononuclear cells was made by real time PCR.

The concentration of sjTREC/$10^5$ PBMC was significantly lower in the group of diabetes as compared to control, while the level of IL-7 did not change between both groups. sjTREC levels are similar in obese group, but higher in patients with a short duration of diabetes, with better glycemic control (with low levels of fasting glycemia, HbA1c and higher 1,5-AG). Analysis of HbA1c covariance, indicator of chronic hyperglycemia, is a factor which primarily determines sjTREC differences between the groups, regardless of other factors.

DM2 modifies sjTREC number in the peripheral blood. The level of sjTREC concentration is affected by DM2 duration, the degree of glycemic control. Thereby, chronic hyperglycemia leads primarily to metabolism deteriorations in the thymus, which results in decrease in its functional activity.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, thymus, thymic output, TREC.

**РЕЗЮМЕ**

**ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА TREC (T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES) У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА**

**[1]Искакова С.С., [1]Уразаев О.Н., [1]Бекмухамбетов Е.Ж., [2]Дворацки Г., [1]Дворацка М.**

*[1]Западно-Казахстанский государственный медицинский университет им. Марата Оспанова, Актобе, Казахстан; [2]Медицинский университет им. Кароля Марцинковского, Познань, Польша*

Целью исследования явилось определение количества Т-рецепторных эксцизионных колец у больных сахарным диабетом 2 типа и анализ потенциальных факторов, влияющих на тимический выброс.

Исследованы 68 больных сахарным диабетом 2 типа - I группа, II (контрольную) группу составили 14 здоровых лиц без диабета. Определялись гликемия натощак, HbA1c, 1,5-AG, общий холестерин, ЛПВП-холестерин и ЛПНП-холестерин, триглицериды, С-пептид и интерлейкин-7. Количественная оценка концентрации sjTREC в мононуклеарных клетках периферической крови была выполнена методом ПЦР в режиме реального времени.

Установлено, что концентрация sjTREC/$10^5$ PBMC достоверно ниже в группе диабета по сравнению с контролем, в то время как уровень IL-7 не изменился. Уровни sjTREC схожи в группе с ожирением, однако выше у пациентов с короткой длительностью диабета, с лучшим гликемическим контролем (с низкими уровнями гликемии натощак, HbA1c и более высоким значением 1,5-AG). Анализ ковариации HbA1c, показатель хронической гипергликемии, является фактором, который в первую очередь определяет различия sjTREC между группами независимо от других факторов.

СД2 модифицирует количество sjTREC в периферической крови. На уровень концентраций sjTREC влияют длительность СД2, степень гликемического контроля. При этом хроническая гипергликемия приводит к нарушению метаболизма в самом тимусе, в результате которого происходит снижение его функциональной активности.

რეზიუმე

TREC (T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES) რაოდენობის ცვლილება შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ით დაავადებულებში

[1]ს. ისკაკოვა, [1]ო. ურაზაევი, [1]ე. ბეკმუხამბეტოვი, [2]გ. დვორაცკი [2]მ. დვორაცკა

[1]დასავლეთყაზახეთის მ. ოსპანოვის სახ. სამედიცინო უნივერსიტეტი, აქტობე, ყაზახეთი; [2]კ. მარცინკოვსკის სახ. სამედიცინო უნივერსიტეტი, პოზნანი, პოლონეთი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა T-რეცეპტორის ექსციზიური რგოლების რაოდენობის განსაზღვრა ავადმყოფებში შაქრიანი დიაბეტით ტიპი 2-ით და იმ პოტენციური ფაქტორების ანალიზი,რომლებიც ზეგავლენას ახდენს თიმიტურ ამოგდებაზე.

გამოკვლეულია 68 ავადმყოფი (I ჯგუფი) შაქრიანი დიაბეტით ტიპი 2-ით და საკონტროლო (II ჯგუფი) – 14 ჯანმრთელი პირი,დიაბეტის გარეშე. განისაზღვრა გლიკემია უზმოზე, HbA1c, 1,5-AG, საერთო ქოლესტერინი, მაღალი სიმკრივის ლიპოპროტეიდების და დაბალი სიმკრივის ლიპოპროტეიდების ქოლესტერინი, ტრიგლიცირიდები, C-პეპტიდი და ინტერლეიკინ-7. პერიფერიული სისხლის მონონუკლური უჯრედების sjTREC-ის კონცენტრაციის რაოდენობრივი შეფასება განხორციელდა რეალური დროის რეჟიმში პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდით.

დადგენილია, რომ sjTREC/$10^5$ PBMC სარწმუნოდ უფრო დაბალია დიაბეტის ჯგუფში, შედარებით კონტროლთან, ხოლო ინტერლეიკინ-7-ის მაჩვენებელი ორივე ჯგუფში ერთნაირია. sjTREC-ის დონე იგივეა მომატებული სიმსუქნის ჯგუფში და უფრო მაღალია დაიბეტით მცირეხნიანი ავადობის შემთხვევაში გლიკემიის საუკეთესო კონტროლის პირობებში.

დადგინდა, რომ sjTREC კონცენტრაციაზე ზემოქმედებას ახდენს შაქრიანი დიაბეტი ტიპი 2-ის ხან-

გრძლივობა, გლიკემიური კონტროლის ხარისხი. ქრონიკული ჰიპერგლიკემია იწვევს,პირველ რიგში, მეტაბოლიზმის დარღვევას თიმუსში,რის შედეგად მისი ფუნქციური აქტივობა ქვეითდება.

---

# РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО C825T ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА β3-СУБЪЕДИНИЦЫ G-ПРОТЕИНА У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ОЖИРЕНИЯ

**Моисеенко И.О., Приступа Л.Н., Гарбузова В.Ю., Погорелова О.С., Ополонская Н.А.**

*Сумский государственный университет, медицинский институт, Украина*

Артериальная гипертензия (АГ) в структуре заболеваний системы кровообращения составляет 46,5% и диагностируется у 30% взрослого населения [2]. Известно, что 50-75% пациентов с АГ страдает ожирением. Данные нозологии являются взаимоотягощающими [1]. АГ и ожирение − весомые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений, приводящих к высокой заболеваемости и смертности. Эти болезни в значительной степени связаны между собой, так как имеют общие этиологические факторы, патофизиологические механизмы, а также − генетическую детерминированность.

Развитие АГ и ожирения обусловлено активностью одних и тех же генов. Генетические исследования доказывают ассоциацию ожирения и АГ с полиморфизмом генов ангиотензинпревращающего фермента, рецептора активации пролиферации пероксисом-γ, глюкокортикоидного рецептора, β3-субъединицы G-протеина (GNB3) [3,5,6].

Известно, что G-протеин состоит из 3-х субъединиц (α, ß, γ), каждая из которых, при взаимодействии медиатора и G-протеин-связанных рецепторов, активирует множество эффекторов. Более активной является β3-субъединица, C825T полиморфизм, которой способствует развитию ожирения.

Продемонстрирована ассоциация C825T полиморфизма гена β3-субъединицы G-протеина со склонностью к ожирению и избыточной массе тела у лиц различных национальностей. Установлено, что T аллель ассоциирован с накоплением жировой ткани в организме. Известно, что удельный вес жировой ткани у носителей T/T генотипа значительно выше, чем у носителей C/C и C/T генотипов [13,14].

Исследования, проведенные японскими учеными, показали, что C825T полиморфизм влияет на липидный обмен и не ассоциирован с АГ, ожирением, резистентностью к инсулину, сахарным диабетом [18]. Не выявлено достоверной разницы между показателями массы тела у беременных женщин носителей T аллеля (C/T и T/T генотипы) и гомозигот по C аллелю [9].

Учитывая противоречивые результаты исследователей и отсутствие данных о частоте генотипов по C825T полиморфизму гена GNB3 у больных артериальной гипертензией с разной степенью ожирения, целью данного исследования явилось изучение распределения генотипов по C825T полиморфизму гена β3-субъединицы G-протеина у пациентов с артериальной гипертензией в зависимости от степени ожирения, а также оценка риска развития ожирения при данном полиморфизме.

**Материал и методы.** В исследовании принимали участие 82 пациента с верифицированным диагнозом АГ, сочетанной с ожирением. Индекс массы тела рассчитывался по формуле: масса тела (кг)/рост ($м^2$). Пациенты были распределены на 3 группы в зависимости от степени ожирения: I группу составили 55 пациентов с ожирением I степени, II группу − 21 пациент с ожирением II степени, III группу − 6 пациентов с ожирением III степени.

Определение C825T полиморфизма гена GNB3 (rs5443) проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом рестрикционных фрагментов [18].

Статистическую обработку данных проводили посредством программы SPSS Statistics v 21. Достоверность различий частоты аллелей и генотипов определяли с помощью критерия $\chi^2$. Использовали непараметрический метод сравнения независимых групп (дисперсионный анализ ANOVA Краскела-Уоллиса). Попарное сравнение групп проводили посредством непараметрического теста Манна-Уитни. Разницу считали статистически достоверной при $p<0,05$. Для определения риска раз-

вития ожирения использовали метод логистической регрессии.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ распределения генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 среди больных АГ и ожирением показал, что 22 (26,8%) из них были гомозиготы по С аллелю (С/С генотип), 49 (59,8%) − гетерозиготы (С/Т), 11 (13,4%) − гомозиготы по Т аллелю (Т/Т генотип) ($\chi^2$=27,976, p<0,001), а частота аллеля С составила 26,8%, Т - 73,2% ($\chi^2$=17,610, p<0,001). Распределение генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 среди больных АГ и ожирением выявило высокую частоту носителей Т аллеля и С/Т генотипа.

Поскольку получены достоверные различия в распределении генотипов и аллелей среди данных пациентов, целесообразно провести анализ распределения генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 у больных АГ в зависимости от степени ожирения (таблица 1).

Анализ распределения генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 у больных АГ в зависимости от степени ожирения статистически достоверной разницы не выявил. При сравнении распределения генотипов и аллелей в группах статистически достоверной разницы не обнаружено (p=0,426 и p=0,652 соответственно). Далее при сравнении групп попарно статистически значимой разницы между I и II, I и III, II и III группами также не получено (p=0,191, p=0,721, p=0,737 соответственно).

Результаты анализа риска возникновения ожирения у больных АГ в зависимости от C825T полиморфизма гена GNB3 представлены в таблице 2.

Риск развития ожирения у пациентов с АГ носителей Т аллеля в 2,2 раза выше, чем у носителей С аллеля, тогда как риск возникновения ожирения в зависимости от пола оказался статистически недостоверным (p=0,89).

Полученные результаты продемонстрировали ассоциацию Т аллеля с ожирением у больных АГ, что подтверждает результаты других исследований [14,15,17]. Так, исследования арабских [7,8] и немецких ученых [13] доказали, что Т аллель является весомым фактором в возникновении ожирения. Результаты Yamamoto M. et al. [19] доказали риск возникновения ожирения у носителей Т аллеля больных АГ, что согласуется с полученными нами результатами.

Однако, ученые из Дании [7] и Японии [11] не выявили ассоциации Т аллеля по C825T полиморфизму гена GNB3 с ожирением, а ученые из Китая [12] доказывают ассоциацию С аллеля с ожирением.

У пациентов с разной степенью ожирения статистически достоверной разницы в частоте генотипов по

*Таблица 1. Распределение генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 у больных артериальной гипертензией в зависимости от степени ожирения*

| Показатель | I группа (n=55) | | II группа (n=21) | | III группа (n=6) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % |
| С/С генотип | 13 | 59,1 | 7 | 31,8 | 2 | 9,1 |
| С/Т генотип | 33 | 67,3 | 13 | 26,5 | 3 | 6,1 |
| Т/Т генотип | 9 | 81,8 | 1 | 9,1 | 1 | 9,1 |
| С аллель | 13 | 59,1 | 7 | 31,8 | 2 | 9,1 |
| Т аллель | 42 | 70,0 | 14 | 23,3 | 4 | 6,7 |
| $\chi^2$ | 2,323 | | | | | |
| p | 0,677 | | | | | |

*примечания: n − количество пациентов; $\chi^2$ − критерий согласия Пирсона; p − показатель достоверности различий*

*Таблица 2. Риск развития ожирения у больных с артериальной гипертензией в зависимости от C825T полиморфизма гена GNB3*

| Аллель | CR | SE | WS | p | OR | 95% CI для OR | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | нижняя граница | верхняя граница |
| С | 0,074 | 0,660 | 0,012 | 0,911 | 0,92 | 0,662 | 1,017 |
| Т | 0,798 | 0,396 | 4,053 | 0,044 | 2,2 | 1,021 | 4,826 |

*примечания: CR − коэффициент регрессии; SE − стандартная ошибка; WS − статистика Вальда; p − статистическая значимость; OR − отношение шансов; CI − доверительный интервал*

C825T полиморфизму гена GNB3 нами не обнаружено, тогда как, исследования последних лет показывают ассоциацию генотипов со степенью ожирения. Результаты арабских ученых [14,15] доказали ассоциацию ожирения I и II степени с C/T генотипом, а ожирения III степени - с T/T генотипом. Однако, лишь единичные исследования показывают связь степени ожирения с определенным генотипом данного полиморфизма. Другие ученые вообще не обнаружили генетической предрасположенности в развитии степени ожирения изучая полиморфизмы генов, в том числе и C825T полиморфизм гена GNB3 [4].

Проведенное исследование не продемонстрировало генетической детерминированности степеней ожирения, что подтверждает мультифакториальность заболевания, а именно влияние генетических факторов, дисфункции эндокринной системы, изменения образа жизни и пищевого рациона человека. Исследования ученых из Греции и Австралии доказали ассоциацию степени ожирения с такими факторами, как недосыпание, возраст, пол, низкая физическая активность, недостаточная образованность, малоподвижный образ жизни и употребление алкоголя [8,10].

Проведенное нами исследование у пациентов с АГ доказывает ассоциацию C825T полиморфизма гена GNB3 с ожирением, однако не доказывает ассоциацию со степенью ожирения.

**Выводы**

1. У больных АГ в сочетании с ожирением достоверно чаще встречаются носители доминантного T аллеля (C/T и T/T генотипы). Риск развития ожирения у гомозигот и гетерозигот по T аллелю в 2,2 раза выше, чем у гомозигот и гетерозигот по C аллелю.
2. Ассоциация генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 у больных АГ со степенью ожирения не выявлена.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Амбросова Т.Н., Ковальова О.М., Ащеулова Т.В. Терапевтичний потенціал лосартана у хворих на артеріальну гіпертензію. Світ медицини та біології. 2011; 2: 92-96.
2. Коваленко В.М., Корнацький В.І. та ін. Регіональні медико-соціальні проблеми хвороб системи кровообігу. Аналітично-статистичний посібник. Київ: 2013; 239.
3. Кравчук П.Г., Ольховський Д.В., Кадикова В.І. Сучасне уявлення про значення поліморфізму генів у патогенезі артеріальної гіпертензії у хворих на хронічну серцеву недостатність: контент-аналіз. Клін. та експерим. патологія. 2012; 1(39): 186−190.
4. Кудрявцева Е.А., Воронина Е.Н., Лифшиц Г.И. и др. Отсутствие влияния полиморфных локусов генов INSIG2, FTO, GNB3 на степень выраженности ожирения у больных метаболическим синдромом. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина 2010; 8 (3): 32-39.
5. Приступа Л.Н., Кмита В.В., Савченко О.В. Bcl поліморфізм гена глюкокортикоідного рецептора: асоціації з антропометричними та метаболічними показниками. Журн. клін. та експерим. дослідж. 2013; 1(2): 121−130.
6. Соколенко А.А., Сидорчук Л.П., Соколенко М.О. Алельний стан генів PPAR-GAMMA2, ACE у хворих на артеріальну гіпертензію та абдомінальне ожиріння. J. Clin. Exp. Med. Res. 2014; 2: 1−12.
7. Andersen G, Overgaard J, Albrechtsen A, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Studies of the association of the GNB3 825C>T polymorphism with components of the metabolic syndrome in white Danes. Diabetologia. 2006;49(1):75-82.
8. Di Milia L, Vandelanotte C, Duncan MJ. The association between short sleep and obesity after controlling for demographic, lifestyle, work and health related factors. Sleep Med 2013;14:319-23.
9. Groth S. W., Morrison-Beedy D. GNB3 and FTO polymorphisms and pregnancy weight gain in black women. Biol Res Nurs 2014; 7: 405-12.
10. Hassapidou M.I., Papadopoulou S.K., Vlahavas G., Kapantais .E, Kaklamanou D., Pagkalos .I, Kaklamanou M., Tzotzas T. Association of physical activity and sedentary lifestyle patterns with obesity and cardiometabolic comorbidities in Greek adults*:* data from the National Epidemiological Survey. 2013;12(2):265-74.
11. Hayakawa T., Takamura T., Abe Sh. Association of the C825T polymorphism of the G-protein β3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. Metabol clin and exper 2007; 56(1): 44−48.
12. Hsiao T., Hwang Y., Liu C. Association of the C825T polymorphism in the GNB3 gene with obesity and metabolic phenotypes in a Taiwanese population. Genes Nutr 2013; 8(1): 137−144.
13. Klenke S., Kussmann M., Siffert W. The GNB3 C825T polymorphism as a pharmacogenetic marker in the treatment of hypertension, obesity and depression. Pharmacogenetics and Genomics 2011; 21: 594−606.
14. Lyer A., Yagmoor S., Hagras M. Association of GNB3 C825T polymorphism with obesity in Saudy population. Life Science J 2014; 11(6): 680−684.
15. NejatizadehI A., Kumar R., Stobdanand T. Association of GNB3 C825T polymorphism with plasma electrolyte balance and susceptibility to hypertension Genet. Mol. Biol 2011; 34(4): 553−556.
16. Siffert W. G protein B3 subunit 825T allele and hypertension Cur. Hypertens. Rep. 2003;1(5):47−53
17. Stefan N., Stumvoll M., Machicao F., Koch M., Häring H. U., Fritsche A. C825T polymorphism of the G protein beta3 subunit is associated with obesity but not with insulin sensitivity. Obes Res 2004; 12:679–683.

18. Suwazono, Y., Okubo, Y., Kobayashi, E. et al, Lack of association between human G-protein beta3 subunit variant and overweight in Japanese workers. Obes Res. 2004;12:4–8.
19. Yamamoto M., Abe M., Jin J.J Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. Biochem Biophys Res Commun 2004; 316(3): 744−748.

## SUMMARY

### DISTRIBUTION OF GENOTYPES OF C825T POLYMORPHISM β3-SUBUNIT G-PROTEIN GENE IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION ACCORDING THE DEGREE OF OBESITY

**Moiseyenko I., Prystupa L., Garbuzova V., Pogorielova O., Opolonskaya N.**

*Sumy State University, Medical Institute, Ukraine*

Arterial hypertension (AH) and obesity - risk factors for cardiovascular diseases and their complications, leading to high morbidity and mortality. These nosologies notedly linked, because have common etiological factors, pathophysiological mechanisms and genetic determination.

The aim this research was to analyze the distribution of genotypes of the C825T polymorphism of β3-subunit G-protein gene (GNB3) according the degree of obesity and to assess the risk of obesity in patients with AH.

Patients were divided into three groups according the degree of obesity. We used clinical, anthropometric, instrumental, molecular-genetic and statistical methods. The significance of differences of alleles and genotypes frequency was determined by test $\chi^2$. For comparing the groups used nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. A value of $p<0.05$ was considered significant.

Our research showed high frequency of T allele carriers and C/T genotype among patients with hypertension and obesity ($\chi^2 = 27{,}976$, $p <0.001$). In our study we observed the absence of statistically significantly difference ($p = 0.677$) of distribution of genotypes and alleles in patients with AH according the degree of obesity. The risk of obesity in T allele carriers was in 2.2 times higher than in C allele carriers in patients with AH.

In summary, our study showed association of C825T polymorphism of the GNB3 with obesity, but did not prove the association this with the degree of obesity i patients with AH.

**Keywords:** hypertension, obesity, C825T polymorphism β3-subunit of G-protein gene.

## РЕЗЮМЕ

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО C825T ПОЛИМОРФИЗМУ ГЕНА β3-СУБЪЕДИНИЦЫ G-ПРОТЕИНА У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ОЖИРЕНИЯ

**Моисеенко И.О., Приступа Л.Н., Гарбузова В.Ю., Погорелова О.С., Ополонская Н.А.**

*Сумский государственный университет, медицинский институт, Украина*

Артериальная гипертензия (АГ) и ожирение − весомые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений, приводящих к высокой заболеваемости и смертности. Данные нозологии в значительной степени связаны между собой, так как имеют общие этиологические факторы, патофизиологические механизмы, а также генетическую детерминированность.

Целью исследования явился анализ распределения генотипов по C825T полиморфизму гена β3-субъединицы G-протеина (GNB3) у пациентов с артериальной гипертензией в зависимости от степени ожирения и оценка риска развития ожирения при даном полиморфизме.

Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от степени ожирения. В работе использовали общеклинические, антропометрические, инструментальные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования. Достоверность различий частоты аллелей и генотипов определена посредством критерия $\chi^2$. Сравнение групп проведено с помощью непараметрических тестов Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Разницу считали статистически значимой при $p<0{,}05$.

Исследование распределения генотипов и аллелей по C825T полиморфизму гена GNB3 среди больных АГ и ожирением выявило высокую частоту носителей T аллеля и C/T генотипа ($\chi^2=27{,}976$, $p<0{,}001$). При анализе распределения генотипов и аллелей в зависимости от степени ожирения статистически достоверной разницы не выявлено ($p=0{,}677$). Риск развития ожирения у больных АГ носителей T аллеля в 2,2 раза выше, чем у носителей C аллеля.

Итак, проведенное исследование среди пациентов с АГ доказало ассоциацию C825T полиморфизма гена GNB3 с ожирением, однако со степенью ожирения ассоциация не выявлена.

რეზიუმე

G-პროტეინის β3-სუბერთეულის C825T გენის პოლიმორფიზმის გენოტიპების განაწილება არტერიული ჰიპერტენზიით ავადმყოფებში სიმსუქნის ხარისხთან კავშირში

ი. მოისეენკო, ლ. პრისტუპა, ვ. გარბუზოვა,
ო. პოგორელოვა, ნ. ოპოლონსკაია

სუმის სახელმწიფო სამედიცინო ინსტიტუტი, უკრაინა

არტერიული ჰიპერტენზია (აჰ) და ჭარბი წონა გულ-სისხლძარღვთა დაავადების და მათი გართულების ძირითადი ფაქტორებია, რომლებიც ხშირად სიკვდილის მიზეზს წარმოადგენენ. აღნიშნული ნოზოლოგიები მჭიდროდ არის დაკავშირებული ერთმანეთთან, ვინაიდან გააჩნიათ საერთო პატოფიზიოლოგიური მექანიზმები, ეტიოლოგიური და გენეტიკური ფაქტორები.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა G-პროტეინის (GNB3) β3-სუბერთეულის C825T გენის პოლიმორფიზმის გენოტიპების განაწილების ანალიზი აჰ-ით პაციენტებში ჭარბი წონის ხარისხთან კავშირში და ჭარბი წონის განვითარების რისკის შეფასება მოცემული პოლიმორფიზმის დროს.

პაციენტები ჭარბი წონის ხარისხის გათვალისწინებით გაყოფილი იყო 3 ჯგუფად. კვლევაში გამოყენებული იყო ზოგადკლინიკური, ანტროპომეტრული, ინსტრუმენტული, მოლეკულურ-გენეტიკური და სტატისტიკური კვლევის მეთოდები. ალელების და გენოტიპების სიხშირეთა განსხვავება განისაზღვრა $\chi^2$ კრიტერიუმის მეშვეობით. ჯგუფების შედარება განხორციელდა მანი-უიტნის და კრასკელ-უოლისის არაპარამეტრული ტესტების გამოყენებით. სხვაობა ითვლებოდა სარწმუნოდ $p<0,05$ შემთხვევაში.

გენი GNB3 C825T პოლიმორფიზმის მიხედვით გენოტიპების და ალელების განაწილების გამოკვლევამ აჰ-ით და ჭარბი წონით ავადმყოფებში გამოავლინა T ალელის და C/T გენოტიპის ($\chi^2$=27,976, $p<0,001$) მატარებლობის მაღალი სიხშირე. გენოტიპების და ალელების განაწილების ანალიზმა ჭარბი წონის ხარისხის გათვალისწინებით სარწმუნო სხვაობა არ გამოავლინა ($p$=0,677). T ალელის მატარებელ აჰ-ით ავადმყოფებში ჭარბი წონის განვითარების რისკი 2,2-ჯერ უფრო მაღალია, ვიდრე C ალელის მატარებელ ავადმყოფებში. ამგვარად, არტერიული ჰიპერტენზიით დაავადებულთა გამოკვლევის შედეგებმა ცხადჰყო GNB3 გენის C825T პოლიმორფიზმის ასოციაცია ჭარბ წონასთან, მაგრამ არ გამოავლინა სიმსუქნის ხარისხთან კავშირი.

---

# ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ Х-СЦЕПЛЕННОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ С КОНТРАКТУРАМИ

**[1,2]Квирквелия Н.Б., [1,2]Шакаришвили Р.Р., [1,2]Гугуцидзе Д.А., [1]Хизанишвили Н.А.**

*[1]Институт неврологии им. П.М. Сараджишвили;*
*[2]Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, Грузия*

Наследственно-дегенеративные заболевания с преимущественным поражением нервно-мышечной системы составляют наиболее многочисленную группу в спектре геридитарной патологии человека. Нозологическая диагностика миодистрофий связана со значительными трудностями ввиду широкого клинического полиморфизма и распространенности спорадических случаев. В настоящее время известны многие гены и хромосомы, мутации которых вызывают гетерогенные формы миодистрофий. Основная исследовательская задача терапевтической стратегии генетически обусловленных миодистрофий сводится к молекулярной коррекции дефектного гена, заместительной продукции дефицитарного белка, снижению реактивности мышечных клеток, трансплантации стволовых клеток для регенерации пораженной мышцы [1,7-9,12,13]. Однако не для всех форм имеются сведения о геногеографии, локусе патологического гена, маркерах гена, биохимическом дефекте, о выделении носителей. Кроме того, образующиеся нозологические варианты легко разрушаются, возникают новые, нередко из одной формы дифференцируются несколько подвидов.

В настоящее время известно несколько вариантов редко встречающихся наследственных мышечных дистрофий, передающихся через Х-хромосому с отно-

сительно доброкачественным течением в сравнении с миодистрофией Дюшена, при которых патологический процесс сопровождается формированием контрактур и ретракциями сухожилий с последующим развитием мышечной слабости и атрофии мышц конечностей [2,5,8]. К таким формам относятся миодистрофия Дрейфуса-Хогана, Роттауфа-Мортье-Бейера, Робера, Хека-Лаудана и форма Мебри. В связи с редкостью данного синдрома и вариабельностью клиники считаем целесообразным представить собственное наблюдение редкого варианта Х-сцепленной мышечной дистрофии с контрактурами и кардиомиопатией менее доброкачественного течения, чем типичная форма Роттауфа-Мортье-Бейера.

**Материал и методы.** Пациент Д.З., 28 лет, наблюдается в клинике по поводу прогрессирующего заболевания мышечной системы с развитием грубо выраженной равномерно-диффузной амиотрофии и суставных контрактур, приведших к полной обездвиженности; рожден от второй, нормально протекавшей беременности. Перинатальный анамнез не отягощен. Раннее физическое развитие протекало без особенностей. Первые симптомы заболевания – слабость в ногах и быстрая утомляемость при ходьбе, появились в возрасте 5 лет, часто падал, ходил с тенденцией опоры на носки. Постепенно стали замечать двигательную пассивность по сравнению со сверстниками. В возрасте 10 лет хуже поднимался по лестнице, развиваются ретракция пяточных сухожилий, мышечные атрофии в тазовом и плечевом поясах, проксимальных сегментах конечностей и спины, постепенно формируются сгибательные контрактуры в локтевых суставах и кистях. В возрасте 14 лет ходил с трудом, однако постепенно ограничилась подвижность позвоночника. Возможность стоять сохранилась 18 лет. Значительное ухудшение состояния отмечается с 20-летнего возраста, когда на фоне общего похудания выделяются атрофии мышц туловища и конечностей, резко усиливается деформация позвоночника и крупных суставов, формируются диффузные артрогенные контрактуры, что постепенно приводит к полной обездвиженности.

Родители пациента, представители кавказской расы, практически здоровые. В восходящей родословной пациента упоминаний о признаках поражения нервно-мышечной системы не имеется.

Среди близких родственников мужского пола у двоюродного брата по материнской линии мышечная дистрофия с контрактурами диагностирована в возрасте 16 лет на основании гипотрофии мышц плечевого и тазового поясов, контрактур в локтевых и голеностопных суставах, отсутствия сухожильных рефлексов, данных электромиографии (ЭМГ) и повышения уровня креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке. Умер в результате внезапной остановки сердца в возрасте 34 лет. Post-mortem диагностирована кардиомиопатия.

*Рис. 1. Х-сцепленная миодистрофия Роттауфа-Мортье-Бейра у больного Д.З. Грубые контрактуры в локтевых суставах, атрофия мышц*

Объективно: артериальное давление 100/60, пульс замедлен - 52’, нерегулярный; тоны сердца приглушены; воронкообразная деформация грудной клетки, тахипное с резким снижением экскурсии грудной клетки, чрезкожная оксиметрия 83-87%, выраженный сколиоз шейно-грудного отдела позвоночника с выпуклостью вправо. Генерализованные контрактуры практически всех групп суставов конечностей, шеи и туловища, пальпируются только мышцы таза и нижних конечностей, в остальных сегментах тела мышечный контур не определяется, подкожно разбросаны многочисленные узлы кальциноза. Активные движения отсутствуют за исключением поворотов головы в минимальном объеме. Речь приглушена до шепота, прерывается по причине затруднения дыхания. В психоэмоциональной сфере когнитивные нарушения не выявляются. В лабораторных исследованиях креатинфосфокиназа и воспалительные маркеры крови в пределах нормы.

Данные дополнительных обследований: цветное зрение нормальное, кардиомиопатия с нарушением проводящей системы сердца; при стимуляционной электронейрографии скорость проведения по моторным и сенсорным волокнам периферических нервов в пределах нормы. При игольчатой электромиографии выявляются изменения, характерные для первичной мышечной дистрофии.

Биопсия мышц – разнокалиберность мышечных волокон, умеренное разрастание эндоперимизиальной соединительной ткани.

*Рис. 2. Х-сцепленная миодистрофия Роттауфа-Мортье-Бейра у больного Д.З. Грубые контрактуры в голеностопных суставах, атрофия мышц*

**Результаты и их обсуждение.** Вопрос о нозологической самостоятельности Х-сцепленных миодистрофий остается дискутабельным, поскольку классическую инвариантную форму патологии редко удается определить. Многие авторы [7,12] считают Х-сцепленные миодистрофии фенотипическими разновидностями течения единого заболевания и различия в клинической картине объясняют аллельностью генов. Другие [9,13] настаивают на нозологической самостоятельности, подтверждая эти представления не только своеобразием клинических симптомов и характером течения миодистрофического процесса, но и особенностями биохимии мышц.

В 1961 г. Dreifuss и Hogan [3], а затем Emery и Dreifuss в 1966 г. [4] описали новый тип Х-сцепленной мышечной дистрофии с поражением изначально проксимальных мышц тазового пояса, другими характерными признаками которого были сгибательные контрактуры в локтевых суставах и укорочение ахилловых сухожилий, воронкообразная деформация грудной клетки и отсутствие псевдогипертрофий. Авторами особенно подчеркивается своеобразность этого синдрома - сохранность дистальных мышц, хотя в оригинальной статье Dreifuss и Hogan у одного пациента наблюдалась дистальная слабость ног. Одновременно отмечалась легкая слабость мышц лица, а кардиальные осложнения наблюдались только у лиц зрелого возраста.

Подобный тип мышечной дистрофии Rotthauwe H.W. и соавт. [10] наблюдали в трех поколениях одной семьи у 17 лиц мужского пола. Среди ранних симптомов заболевания, которое дебютировало до 10 лет, было укорочение сухожилий m.m. gastrocnemius, biceps brachii, hamstrings, также как и нарастающий фиброз шеи и паравертебральной мускулатуры. По мере прогрессирования заболевания формировались сгибательные контрактуры в локтях, бедре и стопе и ограничение вентральной флексии туловища. Другими характерными признаками были медленное прогрессирование, слабость и атрофия мышц плече-лопаточно-дистального распределения (с вовлечением, в основном, мышц разгибателей) при отсутствии псевдогипертрофий. Пациенты сохраняли способность ходить до сорока лет; у них отмечалась нормальная фертильность. Смерть чаще наступала в возрасте от 37 до 59 лет, вероятно, по причине остановки сердца, поскольку у 5 пациентов наблюдалась частичная или полная атрио-вентрикулярная блокада. ЭМГ, гистологическое исследование, ферментно-гистохимичекие анализы указывали на миопатический процесс. Проводимость моторных и сенсорных нервов оставалась нормальной. У молодых пациентов была повышена активность креатинкиназы в сыворотке, а в старших возрастных группах - в норме. При клиническом обследовании установленных и возможных носительниц гена не обнаружено ни клинических признаков миопатии, ни повышения уровня КФК в сыворотке. Клиническая картина в комбинации с изменениями на ЭКГ и креатин-киназной активности в сыворотке отличали этот тип миопатии от рецессивных Х-сцепленных типов мышечных дистрофий Дюшена и Бекера-Кейнера.

Rowland L.P. et al [11], Dickey R.P. et al [2], Hopkins L.C. et al [5] в популяцию с синдромом Эмери-Дрейфуса включили пациентов со слабостью дистальных мышц и подчеркнули диагностическую значимость ранних контрактур при отсутствии мышечной слабости. Различие между формами Эмери-Дрейфуса, плече-лопаточной и другими схожими вариантами мышечных дистрофий базировалось, в основном, на степени вовлечения дистальных мышц ног в противовес проксимальным, и на более поврежденные двух- и трехглавые мышцы по сравнению с лопаточными мышцами. Помимо этого отмечались укорочение ахиллова сухожилия и более выраженная, чем при синдроме Эмери-Дрейфуса, лицевая слабость.

Jonston A.W., McKay E. [6] опубликовали наиболее детальный анализ Х-сцепленной миодистрофии с контрактурами на примере собственного наблюдения трех пациентов и обзора литературы. Признаками, общими для всех представленных случаев были дебют в детском возрасте, раннее развитие контрактур, медленное прогрессирование и отсутствие псевдогипертрофий, позднее развитие кардиальных осложнений. Различие касалось только поврежденных мышечных групп. Характерно было вовлечение проксимальных мышц, прикрепленных к плечу и голени, что прослеживалось и у большинства описанных семейств. На основании этого аргумента авторы предложили термин плече-тибиальная форма как наиболее соответствующий и описательный, заключив, что, по сей день не установлено, имеем ли мы дело с двумя определенными формами заболевания или не до конца сформированным полным диапазоном одного синдрома. Как наиболее вероятное объяснение аналогии с другими расстройствами авторы предположили феномен гетерогенетичности.

Представленное нами наблюдение демонстрирует типичную картину прогрессирующей мышечной дистрофии с контрактурами, о чем свидетельствуют прогредиентный характер течения, семейный анамнез и Х-сцепленный тип наследования, данные электромиографии, кардиомиопатия и нарушение проводящей системы сердца, прежде всего характерные для формы Роттауфа-Мортье-Бейера, при которой деформация и ригидность позвоночника, как правило, выражены весьма грубо [4,10,11]. Однако указанные нарушения развиваются спустя многие годы после развития сухожильных ретракций и контрактур в крупных суставах и течение заболевания относительно доброкачественное. Общими для всех наблюдений, потенциально значимыми и ранними признаками являются контрактура, особенно в локтевых суставах, и отсутствие псевдогипертрофий. Кроме того, при этой форме наблюдается рецессивный, сцепленный с Х-хромосомой тип наследственной передачи.

Главное, что отличает наше наблюдение от формы Роттауфа-Мортье-Бейера - это приводящие к полной обездвиженности выраженные мышечные атрофии и контрактуры, относительно ранние кардиальные осложнения и более злокачественное течение. Известные нам клинические описания формы Роттауфа-Мортье-Бейера характеризовались относительно благоприятным течением - появляющиеся в детском возрасте признаки мышечной патологии были относительно незначительны и прогрессировали медленно. Считаем, что описанное нами наблюдение является одним из вариантов неполного дифференцированного синдрома, выделение которого в самостоятельный тип обеспечит усовершенствование нозологической диагностики редких форм Х-сцепленных мышечных дистрофий с контрактурами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cowling B.S., Thierry Chevremont T., Prokic I.,Kretz Ch., Ferry A., Coirault V., Koutsopoulos O., Laugel V., Romero N.B., Laporte J. Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. J Clin Invest. 2014; 124(3):1350-1363.
2. Dickey RP., Ziter FA., Smith RA. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. J Pediatr. 1984; 104(4); 555-559.
3. Dreifuss FH, Hogan GR. Survival in X-chromosomal muscular dystrophy. Neurology 1961: 11: 734-7.
4. Emery AEH, Dreifuss FE. Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. J.Neurology. Neurosurgery. Psychatry 1966: 29:338-42.
5. Hopkins LC., Jackson JA., Elsas LJ. Emery-Dreifuss humero-peroneal muscular dystrophy: an X linked myopathy with unusual contractures and bradycardia. Ann Neurol. 1981; 10(3); 230-237.
6. Johnson AW., McKay E.X linked muscular dystrophy with contractures. J Med Genet.1986; 23(6); 591-595.
7. Kniffin C.L. Myopathy, Centronuclear, X-Linked; CNMX. 2014 http://www.omim.org/entry/310400
8. Maggi L., Scoto M., Cirak S., Robb S.A., Klein A., Lillis S., Cullup T., Feng L., Manzur A.Y., Sewry C.A., Abbs S., Jungbluth H., Muntoni F. Congenital myopathies – clinical features and frequency of individual subtypes diagnosed over a 5-year period in the United Kingdom. Neuromuscular Disorders. 2013; 23(I3): 195-205.
9. Rocha J, Taipa R, Melo Pires M, Oliveira J, Santos R, Santos M. Ryanodine myopathies without central cores - clinical, histopathologic, and genetic description of three cases. Pediatr Neurol. 2014; 51(2):275-8.
10. Rotthauwe HW, Mortier W, Beyer H. Neuer Typ einer recessiv X-chromosomal vererbten Muskeldystrophie: Scapulo-humero-distale Muskeldystrophie mit frühzeitigen Kontrakturen und Herzrhythmusstörungen. Humangenetik 1972;16, 181-200.
11. Rowland LP., Fetall M., Olarte M., Hays A., Singh N., Wanat FE. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Ann Neorol. 1979; 5(2):111-117.
12. Sharma A., Ferraro M.B., Francesco Maiorano F., Blanco F.D.V., Mario Rosario Guarracino M. R. Rigidity and flexibility in protein-protein interaction networks: a case study on neuromuscular disorders. Cornell University Library 2014. http://arxiv.org/abs/1402.2304v2.
13. Sharma V., Borah P., Basumatary L.J., Das M., Goswami M., Kayal A.K. Myopathies of endocrine disorders: A prospective clinical and biochemical study Annals of Indian Academy of Neurology. Official Journal of Indian Academy of Neurology 2014; 17(I3): 298-302.

## SUMMARY

## DIAGNOSTIC VARIATIONS OF X-LINKED MUSCULAR DYSTROPHY WITH CONTRACTURES

**[1,2]Kvirkvelia N., [1,2]Shakarishvili R., [1,2]Gugutsidze D., [1]Khizanishvili N.**

*[1]P. Sarajishvili Institute of Neurology; [2]Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia*

Case report with review describes X-linked muscular dystrophy with contractures in 28 years old man and his cousin. The disease revealed itself in an early stage (age 5-10), the process was progressing with apparent tendons retraction and contraction, limited movement in the areas of the neck and back of spine, atrophy of shoulder and pelvic yard and back muscles. Intellect was intact. Cardyomyopathy was exhibited. CK was normal. EMG showed classic myopathic features. Muscle biopsy showed different caliber groups of muscle fibers, growth of endo-perimesial connective tissue. Clinical manifestations together with electrophysiological and histological data suggest consistency with Rotthauwe-Mortier-Bayer X-linked muscular dystrophy.

**Keywords:** X-linked muscular dystrophy, contractures, amyotrophy, EMG findings, muscle biopsy, cardyomyopathy.

## РЕЗЮМЕ

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ Х-СЦЕПЛЕННОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ С КОНТРАКТУРАМИ

**[1,2]Квирквелия Н.Б., [1,2]Шакаришвили Р.Р., [1,2]Гугуцидзе Д.А., [1]Хизанишвили Н.А.**

*[1]Институт неврологии им. П.М. Сараджишвили;*
*[2]Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, Грузия*

В статье представлен случай Х-сцепленной мышечной дистрофии с контрактурами у пациента 28 лет и его двоюродного брата по материнской линии. Заболевание дебютировало в раннем возрасте (5-10 лет), характеризовалось прогредиентным течением, выраженными сухожильными ретракциями и контрактурами, ограничением движений в позвоночнике, атрофией мышц плечевого и тазового поясов, мышц спины, груди и живота. В психоэмоциональной сфере когнитивные нарушения не отмечались. Наблюдалась кардиомиопатия с нарушением проводниковой функции. Уровень креатинфосфокиназы был нормальный. Электромиографически регистрировались изменения характерные для первичной мышечной патологии. Биопсия мышц показала сочетание первично-мышечных и нейрогенных изменений. Представленный случай диагностирован как мышечная дистрофия Роттауфа-Мортье-Бейера.

## რეზიუმე

## კონტრაქტურებით თანხვედრილი Х-შებოჭილი კუნთოვანი დისტროფიის დიაგნოსტიკური ვარიაციები

[1,2]ნ. კვირკველია, [1,2]რ. შაქარიშვილი, [1,2]დ. გუგუციძე, [1]ნ. ხიზანიშვილი

[1]პ. სარაჯიშვილის სახ. ნევროლოგიის ინსტიტუტი;
[2]ი. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, საქართველო

ნაშრომში აღწერილია ერთი ოჯახის წევრებს შორის კონტრაქტურებით თანხვდენილი Х-შებოჭილი კუნთოვანი დისტროფიის შემთხვევა. დაავადება გამოვლინდა ადრეულ (5-10 წელი) ასაკში, მიმდინარეობა იყო პროგრედიენტული, მკვეთრად გამოხატული მყესებით რეტრაქციებით და კონტრაქტურებით, მოძრაობის შეზღუდვით ხერხემლის, კისრისა და წელის მიდამოში, უხეში ატროფიებით მხრის, მენჯის სარტყელის და ზურგის კუნთებში. ინტელექტი იყო შენახული. პაციენტებს აღენიშნებოდათ კარდიომიოპათია გულის გამტარებ-ლობითი ფუნქციის დაზიანებით. ერთი პაციენტის სისხლის შრატში კრეატინფოსფოკინაზის დონე იყო ნორმის ფარგლებში, ხოლო მეორეში - მომატებული. ორივე პაციენტში ელექტრომიოგრაფიულად დარეგისტრირდა პირველადი კუნთოვანი პათოლოგიისთვის დამახასიათებელი ცვლილებები. კუნთის ბიოფსიით გამოვლინდა სხვადასხვა კალიბრის კუნთოვანი ბოჭკოების დაჯგუფება, ენდოპერიმეზიალური შემაერთებელი ქსოვილის ზომიერი ზრდა. აღწერილი შემთხვევები განიხილება კონტრაქტურებით თანხვდენილი Х-შებოჭილი კუნთოვანი დისტროფიის როტაუფ-მორტიე-ბაიერის ფორმის ჭრილში.

GEORGIAN MEDICAL NEWS
No 7-8 (244-245) 2015

# RELIGIOUS EXCLUSIVITY AND PSYCHOSOCIAL FUNCTIONING

[1]Gegelashvili M., [2]Meca A., [2] Schwartz S.J.

[1]Ilia State University, Tbilisi, Georgia; [2]University of Miami, USA

**Religion Exclusivity and Psychosocial Functioning**

Beginning in the early part of the 20th century, the scientific study of religion began to sketch a portrait of religion as a prosocial cultural force. Religion was seen as highly beneficial power for community development which can mitigate aggressive and destructive impulses , and provide specific reinforcements for adherence to moral norms). Groups in general, and religious groups in particular, provide their members (to varying degrees) with shared norms, values, traditions, and metaphysics, which in turn helps to mobilize, coordinate and justify collective action Religion is an important mode of social identification [13,26]. It provides individuals with a comprehensive social identity, including cosmic and terrestrial worldviews that can anchor the individual in a self-affirming and existential anxiety-reducing social consensus [19]. Steger and colleagues [34] suggest that religious individuals might feel greater psychological well-being because they derive meaning in life from their religious feelings and activities There are a number of ways that religiosity might play a role in drawing IG/OG boundaries that have important implications for tolerance and prosociality [17]. Indeed it may lead individuals to dehumanizing and delegitimizing the outgroup [18], and thereby paving the way for intolerance, prejudice and aggression [12,26].

The study of religious exclusivity dates back to the pioneering work of [2] who suggested that favoring one's religious group over others is often associated with prejudice, discrimination, and poor treatment of people from other groups. Since then, evidence for the connection between religiosity and intolerance accumulate during the mid-20th century [1,2,14,28]. Seek to expand on these studies, the current study sought to clarify the role of exclusivity with respect to psychosocial functioning.

**Conceptualizing Religious Exclusivity**

Religious exclusivity is the doctrine or belief that only one particular religion belief system is true [40]. A perusal of current world events suggests that many highly religious people indeed hold the belief that their faith is the only true faith, that only those who believe as they do are admitted into heaven, and that it is acceptable to discriminate against or otherwise bring psychological or physical harm to individuals who do not share their belief system. Indeed, many religions, especially those that offer clear prescriptions and proscriptions regarding how one should and should not believe and behave, lend themselves easily to group-outgroup distinctions.

As such when discussing religious exclusivism as a manifestation of in group favoritism it is essential to draw upon Social Identity Theory [36], which explains why intergroup favoritism appears and suggests motives for intergroup discrimination. Social Identity Theory proposes that we derive value from our group memberships to the extent that we can compare our own group positively with others, and that we are therefore motivated to gain and maintain a sense of positive group distinctiveness from the other group(s) to which we do not belong, and against which we compare our own group [36,38]. Social identity theory holds that nearly all groups hold the implicit or explicit belief that they are somehow unique or superior to others. The theory also reflects the beliefs and feelings about those groups that one perceives as standing in opposition to the groups with which one is affiliated, that is, groups that are "not us.". However, such a belief and "us-versus-them" worldview can entail prejudice and intergroup discrimination and sometimes violence against those who belongs to other group - with religion among these reasons [24].

**Motives for Intergroup Discrimination**

On the basis of Social Identity Theory and similar perspectives, identity motives for self-esteem, meaning, distinctiveness, and belonging have been suggested [38,39]. Among the motives most germane to religious exclusivity are self-esteem, meaning, distinctiveness, and belongingness. We review each of these here.

**Self-esteem.** Social identity theory assumes that individuals strive to maintain and enhance their self-esteem. To the extent that a particular group membership forms an important part of a particular individual' 's self-concept, the individual is similarly expected to strive maintain and enhance a positive social identity associated with this group membership. Abrams and Hogg [5] proposed that social identity theory therefore includes an implicit self-esteem hypothesis (SEH) with two unstated corollaries: (1) that successful intergroup discrimination will enhance social identity and hence self-esteem and (2) that low or threatened self-esteem will promote intergroup discrimination because of the need for positive self-esteem. Religious exclusivity would therefore be expected to be positively linked with self-esteem.

**Meaning**. Another line of thinking, also developed from social identity theory, is that group identifications and intergroup discrimination are motivated by an underlying search for meaning Seeing oneself as a meaningful part

of a meaningful world may be especially important when people are faced with traumatic or unpredictable events, or when people are coping with the inherent uncertainty regarding what happens after death. Search for meaning appears to play a crucial role in coping with traumatic and unpredictable events and any under condition of subjective uncertainty. - where meanings of the self-concept and the social context are unclear [16,38].

**Distinctiveness.** Drawing on principles from downward comparison theory Wills T., Vignoles et al. [38,41] one way to achieving a positive social identity is to establish positive distinctiveness of the in-group from comparable out groups by engaging in intergroup discrimination. Moreover, distinctiveness can help to create meaning by separating one's ingroup from relevant outgroups (i.e., the motives are interrelated). Exclusivity can therefore help to create distinctiveness for one's religious group [3].

**Belongingness.** The belonging motive refers to the need to maintain or enhance feelings of closeness to others, or social acceptance, both in interpersonal relationships and within groups. Studies have shown greater discrimination both between and within groups when group distinctiveness is threatened and when belonging in the in-group is insecure [38]. Exclusivity, inasmuch as it allows the person to assert a sense of belongingness to one group and not others, may be associated with positive outcomes (e.g., self-esteem, meaning in life) and protective against negative outcomes (e.g., depressive symptoms). However, the ingroup-outgroup distinctions that are drawn as a way of satisfying identity motives may, in some cases, increase risk for antisocial behavior toward outgroup members. Religious exclusivity is a form of ingroup favoritism – that it, a scenario where only those in the ingroup (i.e., those who share one's belief system) are considered worthy and Godly, whereas those in the outgroup are not [3].

It is worth noting that Ingroup/outgroup effects may be exacerbated when groups are perceived to be in conflict with one another over, when resources are perceived as being scarce, or when groups must compete for access to the market place of ideas [32].

All of these scenarios clearly apply to religious groups: most scriptures claim that only they offer the unaltered path to the divine; entry into the afterlife is often assumed to be contingent on endorsing the "correct" belief system; and various faiths often demonize one another as a way of attracting and keeping members [10,26].

Exclusivity represents a way of favoring the in-group by declaring that only "we" have access to the truth (and – either implicitly or otherwise – that "they" do not).

Although previous authors have not necessarily grounded study of religious exclusivity within social identity perspectives. Altemeyer and Hunsberger [3] have focused on what they term religious fundamentalism and right-wing authoritarianism both fundamentalism and right-wing authoritarianism are associated with prejudice against various groups, including women, African Americans, Jews, and LGBQT groups.

Another important theory which explains defencive function of religion is *Terror Management Theory* proposed by Greenberg, Pyszczynski, and Solomon [13] and inspired by the writing of cultural anthropologist Becker E. [7]. TMT argues that basic psychological conflicts result from humans' desire to live and from their awareness that death is inevitable. Religion is among the most prominent ways that humans have devised to explain the mystery of death and to quell their fears about it. Indeed, among the most prominent samples/expressions of culture is religion and belief in an afterlife (e.g., reincarnation) All cultures provide precise information regarding death that affords opportunities for individuals to live forever- either symbolically, by producing great works or amassing great fortunes that extend beyond the individual's lifetime and therefore serve as a physical testament to a person's existence, or through religious beliefs that promise immortality in a variety of ways, from the Eastern conceptions of reincarnation to beliefs of symbolic immortality: procreation, national identity, a common cause (such as the fight for the rights), cultural influences on sexual relationships (marriage, family and respect for the memory), the desire to be great, and so on. Eligibility for immortality is, however, limited to those who do the right things. The resulting perception that one is a valuable member of a meaningful universe constitutes self-esteem; and self-esteem is the primary psychological mechanism by which culture serves its death-denying function.

In the present study we hypothesize a positive association between religious exclusivity and high self-esteem and also positive psychosocial functioning (e.g., high well-being and low levels of depressive symptoms), supporting what would be expected from both TMT and social identity perspectives. TMT suggests that religious beliefs may provide a cultural worldview and self-esteem – but these assets would not necessarily be expected to be conferred by an individualistic set of beliefs that are not part of a religious group. I. Yalom admits that fear of death has the most important impact on person's life and religious beliefs provide security and protection against "nonbeing" (i.e., the fear that nothing at all exists after death). But though he recognizes that religion helps people for living in peace, the payment for such tranquility is too high because it entails dulness,- "narrowing our inner life, blurring our vision, blunting our rationality." And as a result "Ultimately self-deception catches up with us." And if confrontation with death will always be related with fear. "it is the price we pay for self-awareness". These considerations must be taken into account when arguing regarding as religious as well as nonreligious exclusives.

**Religion Exclusivity Measure**

Before studies can be developed to adequately assess the positive and/or negative effects of religious exclusivity, it is necessary to develop and validate a measure that best captures religious exclusivity within a social identity perspective.

The primary difference between the measure that we present here and the measures developed by Altemeyer and Hunsberger is that our measure uses items from a first-person perspective (which is important in capturing in-group-outgroup dynamics). The measures developed by Altemeyer and Hunsberger [4] use items worded in third or neutral person perspectives (e.g., "To live the best and most meaningful life, one must belong to the one true religion"). Because social identity perspectives frame the primary distinction as being between "us" and "them," first-person items are essential to use in measuring religious exclusivity.

Specifically, and building on Altemeyer and Hunsberger's [3] Religious Fundamentalism Scale, the present study used a large sample of college students from around the United States and from various religious backgrounds to validate a new measure of religious exclusivity developed with half of its items written from a first-person perspective. In addition, the present study sought to evaluate the relationship between religious exclusivity and measures of well-being, internalizing symptoms, and antisocial behavior.

**Research Questions and Hypotheses**

We advanced the following research questions and hypotheses for our study:

1. For people from religious groups, exclusivity should be related to participation in religious activities.
2. Exclusivity should be related positive psychosocial functioning (e.g., high well-being and low levels of depressive symptoms).
3. Exclusivity should be related to antisocial behavior.

**Material and methods.**

**Participants**

The present study's sample was derived from the Multi-Site University Study of Identity and Culture (MUSIC; see Castillo & Schwartz, 2013). The sample for the present analyses was comprised of 8,585 students (72.6% female; Mage = 20.33 years, SD = 3.42, range = 18 to 63; 62% White, 14% Hispanic, 13% Asian, 8% Black, and 3% other races/ethnicities) from 30 colleges and universities around the United States. Over and above the ethnic and cultural diversity, the sample was fairly diverse across religious identifications. Specifically, the sample included college students who identified as "no religion" (12%), Agnostic (7%), Atheist (3%), Protestant (34%), Assemblies of God (2%), Roman Catholic (27%), Orthodox Christian (1%), Jewish (3%), Mormon (3%), Muslim (2%), Buddhist (2%), and "Other" (4%)

*Procedures*

Data were collected between September 2008 and October 2009 from sites selected to provide a diverse representation of regions in the United States. Participants were recruited through printed or emailed announcements sent to students attending classes in the disciplines of psychology, sociology, business, family studies, education, and human nutrition. Interested students were directed to a website and asked to read a consent document and confirm their participation. Participants received research/course credits or were entered into a raffle for a prize drawing. The full survey was divided into six separate web pages to allow participants to save their work and resume later. Eighty-five percent of participants submitted all six pages.

*Measures*

Unless otherwise specified, 5-point Likert scales were used for all study measures, with response options ranging from 1 (Strongly Disagree) to 5 (Strongly Agree). Alpha coefficients presented are from the current sample.

*Religious Exclusivity.*

The current study utilized the 10-item Religious Exclusivity Measure (REM), a modified version of the Altemeyer & Hunsberger religious exclusivity measure.

*Religious Behaviors.* The current study utilized three single-items seeking to capture the frequency of engagement in religious behaviors within the last month: religious service attendance ("In the last month, how often have you attended a religious service at your church/mosque/synagogue?), outside religious service ("How many times in the last month have you attended a religious service somewhere outside of a church/mosque/synagogue?"), and prayer ("How often do you pray?"). All three items were measured on a 5-point scale ranging from 1 (Not at all) to 5 (More than 3 times per week).

*Convergent Variables.*

In order to establish convergent validity, consistent with Social Identity Theory, the current study implemented indicators of meaning in life, religious identification, and self-esteem. Meaning in life was assessed using the Presence of Meaning (Cronbach's alpha = .87 in the present sample) subscale from the 10-item Meaning in Life Questionnaire [31] on a 6-point Likert scale ranging from 1 (strongly disagree) to 6 (strongly agree). Religious identity was measured using the 7-item ($\alpha$ = .95; Sample Item: "I participate in activities from my religion, such as special food, music, or customs.") Religious Identity Measure2. Self-esteem was assessed using the 10-item ($\alpha$ = .89, sample item: "I take a positive attitude toward myself") [30].

*Positive Psychosocial Functioning.*

Positive psychosocial functioning was assessed in terms

of psychological well-being and satisfaction with life. Psychological well-being was measured using the 18-item Scales of Psychological Well-Being [32], which uses a 6-point Likert scale (α = .83, sample item: "I like most aspects of my personality"). Life satisfaction was assessed using the 5-item Satisfaction with Life Scale [25], answered on a 6-point Likert scale (α = .87, sample item: "The conditions of my life are excellent").

*Negative Psychosocial Functioning.*
Negative psychosocial functioning was assessed in terms of externalizing (rule-breaking and physical aggression) and internalizing (depressive symptoms and general anxiety) symptoms. Externalizing symptoms were assessed using the Subtypes of Antisocial Behavior Questionnaire [9], a 32-item instrument that assesses three subtypes of antisocial behavior. Participants were asked to rate their engagement in rule breaking (11 items, α = .86; sample item: "Stole things from a store") and physical aggression (10 items, α = .86; sample item: "Got into physical fights"). Depressive symptoms were assessed using the 20-item Center for Epidemiological Studies Depression Scale [27]. The items are responded to using 4-point scales ranging from 1 = seldom to 4 = most of the time (α = .86, sample item: "I felt like crying this week"). General anxiety symptoms during the previous week were assessed using an 18-item version of the Beck Anxiety Inventory [5] adapted for use with non-clinical populations (α = .95, sample item: "I have been worrying a lot this week").

*Analytic Procedure*
The analytic procedure was conducted in four steps. The first step of the analysis was to develop a general factor model for the measure the Religious Exclusivity Measure (REM). To do this, sample was randomly divided in half. On the first half, we conducted an Exploratory Factor Analysis (EFA) using Maximum Likelihood and promax rotation to determine the factor solution that might work best. Using the second half of the sample, we conducted a Confirmatory Factor Analysis (CFA) in Mplus to confirm the results of the EFA. The second step was to compare the derived factor structure across religious and non-religious identifications using the full sample. As outlined by Little [22], using a multigroup model in Mplus, we evaluated the three required forms of invariance necessary for establishing group equivalence: Configural (equal form), Metric (equal loadings), and Scalar (equal intercepts) invariance. The third step of the analytic procedure was to establish concurrent validity with measures of religious behaviors (i.e., prayer, service attendance, and outside service attendance) and theoretically related constructs as described by Social Identity Theory and Identity Motives Theory (i.e., purpose, self-esteem, religious identification). Finally, we sought to evaluate the predictive validity of the REM by determining whether significant differences emerged across a variety of psychosocial functioning indicators.

**Step 1: General Factor Identification**
**Exploratory Factory Analysis.** The EFA indicated that a two-factor solution was most viable (62.93% of variance explained). However, closer examination of the factor loadings revealed this structure was driven by the direction of the item wording. Specifically, positively worded items loaded together while the two negatively worded items (i.e., items 8 and 9) loaded on to the second factor. In order to maintain parsimony, the two negatively worded items were dropped and EFA was conducted with the remaining eight, positively worded items. The subsequent analysis indicated a one-factor solution was most viable (60.96% of variance explained). Factor loadings are presented in Table 1.

**Confirmatory Factor Analysis.** Building on the eight-item one-factor solution, we proceeded to conduct a CFA with the second half of the sample to confirm the derived factor structure. The CFA analyses was conducted Mplus 7.2 using a sandwich covariance estimator [20] to adjust the standard errors to account for nesting of participants within schools. As outlined by Bollen and Long [8], indices of absolute fit, indices of relative fit, and indices of fit with a penalty function for lack of parsimony were used to examine goodness of model fit. These include the $\chi2$ test of model fit (which should optimally be statistically non-significant, $p>.05$), the Comparative Fit Index (CFI), the Root Mean Square Error of Approximation (RMSEA), and the standardized root mean square residual (SRMR). According to values suggested by Little [20], good model fit is represented as CFI ≥ .95, RMSEA ≤ .05, and SRMR ≤ .05; acceptable fit is represented as CFI = .90 - .95, and RMSEA = .08 - .05, and SRMR = .08 - .05. Given that the $\chi2$ value tests the null hypothesis of perfect fit to the data, which is rarely plausible in large samples or complex models [9], it is reported but not used to evaluate model fit. The one-factor model was indicative of good to acceptable model fit [$\chi2(20) = 466.63$, $p<.001$; CFI = .965; RMSEA = .068; SRMR = .033]. Factor loadings are displayed in Table 1.

*Table 1. Factor Loadings for Exploratory Factor and Confirmatory Factor Analysis*

| | EFA | CFA |
|---|---|---|
| Item 1 | .647 | .807 |
| Item 2 | .653 | .823 |
| Item 3 | .559 | .745 |
| Item 4 | .668 | .826 |
| Item 5 | .499 | .712 |
| Item 6 | .575 | .762 |
| Item 7 | .728 | .844 |
| Item 10 | .546 | .732 |

**Step 2: Invariance across Religious and Non-Religious Identifications**
Building on the eight-item one-factor solution, using a multigroup model in Mplus, we sought to establish whether or

not the REM was equivalent across religious identifications. Once again, analysis were conducted using a sandwich covariance estimator [20] to adjust the standard errors to account for nesting of participants within schools. Given the diversity of identifications participants adhered two, measurement equivalence was evaluated broadly (i.e., religious versus non-religious identifications) and then more specifically within all religious identifications with a sufficient sample size (i.e., Protestants, Assemblies of God, Roman Catholic, Jewish, Mormon, Muslim, and Buddhist). Analysis began with the least restricted solution and progress towards increasingly restrictive constraints. Differences in the CFI ($\Delta$CFI > .010) and RMSEA ($\Delta$RMSEA > .010) were used to test for significant differences in fit among the one-factor, two-factor, and three-factor models [22]. While we did not use the chi-square difference test because a number of studies e.g., Meade, Johnson, & Braddy [23] have suggested that it is overpowered and produces significant results even when the actual differences in fit between models are trivial, we do report it in our results.

**Religious versus Non-Religious Identification.** As previously specified, invariance analyses began with a configural model. As shown in Table 2, the configural model was associated with good to acceptable fit [$\chi2(40) = 669.67$, $p < .001$; CFI = .954; RMSEA = .063; SRMR = .032]. Building on the configural model, we evaluated metric invariance by constrained factor loadings to be equivalent between both groups; there was no significant decline in model fit [$\Delta\chi2(7) = 62.83$, $p<.001$; $\Delta$CFI = .002; $\Delta$RMSEA = .005). Next, in order to evaluate scalar invariance, factor intercepts were constrained to be equal. This additional constraint however was associated with a significant decline in model fit [$\Delta\chi2(7) = 830.65$, $p<.001$; $\Delta$CFI = .060; $\Delta$RMSEA = .023] resulting in the rejection of the assumption of scalar invariance. In order to identify which intercepts violated the assumption of scalar invariance, we constrained one intercept at a time and examined the subsequent change in model fit. Analysis revealed item 5 resulted in a significant decline in model fit [$\Delta\chi2(1) = 632.55$, $p<.001$; $\Delta$CFI = .049; $\Delta$RMSEA= .021]. Configural, metric, and scalar invariance was retested after eliminating item 5. As shown on Table 3, the revised 7-item scale was associated with configural and metric invariance. Once again, the scalar model was associated with a significant decline in mode fit [$\Delta\chi2(6) = 130.44$, $p<.001$; $\Delta$CFI = .013; $\Delta$RMSEA = .003], however, closer examination of factor intercept indicated no one specific item violated the assumption of scalar invariance.

*Table 2. Measurement Invariance Between Religious and Non-Religious Identifications*

| Model | $\chi^2$(df) | $\Delta\chi^2$(df) | CFI | \|$\Delta$CFI\| | RMSEA | | SRMR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8-Item Measure | | | | | | | |
| Configural | 669.67(40)* | | .954 | | .063 | | .032 |
| Metric | 732.50(47)* | 62.83(7)* | .949 | .005 | .061 | .002 | .052 |
| Scalar | 1563.15(54)* | 830.65(7)* | .889 | .060 | .084 | .023 | .100 |
| Item 2 | 745.34(48)* | 12.84(1)* | .949 | <.001 | .061 | <.001 | .052 |
| Item 3 | 759.97(49)* | 14.63(1)* | .948 | .001 | .061 | <.001 | .051 |
| Item 4 | 775.04(50)* | 15.07(1)* | .947 | .001 | .061 | <.001 | .051 |
| Item 5 | 1407.59(51)* | 632.55(1)* | .900 | .047 | .082 | .021 | .098 |
| Item 6[1] | 801.64(51)* | 26.60(1)* | .945 | .002 | .061 | <.001 | .052 |
| Item 7 | 810.82(52)* | 9.18(1)* | .944 | .001 | .061 | <.001 | .052 |
| Item 10 | 862.75(53)* | 51.93(1)* | .940 | .004 | .062 | .001 | .055 |
| 7-Item Measure | | | | | | | |
| Configural | 425.94(28)* | | .960 | | .060 | | .030 |
| Metric | 473.80(34)* | 47.86(6)* | .956 | | .057 | .003 | .047 |
| Scalar | 604.24(40)* | 130.44(6)* | .943 | .013 | .060 | .003 | .053 |
| Item 2 | 488.21(35)* | 14.41(1)* | .955 | .001 | .057 | <.001 | .047 |
| Item 3 | 502.57(36)* | 14.35(1)* | .953 | .002 | .057 | .003 | .046 |
| Item 4 | 519.37(37)* | 16.81(1)* | .952 | .001 | .058 | .001 | .047 |
| Item 6 | 545.66(38)* | 26.29(1)* | .949 | .003 | .058 | <.001 | .048 |
| Item 7 | 555.00(39)* | 9.34(1)* | .948 | .001 | .058 | <.001 | .048 |
| Item 10 | 604.24(40)* | 49.24(1)* | .943 | .005 | .060 | .002 | .053 |

*Table 3. Measurement Invariance Between All Religious and Non-Religious Identifications*

| Model | $\chi^2$(df) | $\Delta\chi^2$(df) | CFI | ΔCFI\| | RMSEA | \|ΔRMSEA\| | SRMR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Configural | 1033.80(98)* | | .939 | | .106 | | .041 |
| Metric | 1153.93(128)* | 120.13(30)* | .933 | .006 | .097 | -.009 | .054 |
| Scalar | 2239.85(164)* | 1085.92(36)* | .865 | .068 | .122 | .025 | .110 |
| Item 2[1] | 1501.05(134)* | 347.12(6)* | .911 | .022 | .110 | .013 | .071 |
| Item 3[1] | 1517.33(134)* | 363.39(6)* | .910 | .045 | .110 | .013 | .085 |
| Item 4[1] | 1366.03(134)* | 212.09(6)* | .920 | .013 | .104 | .007 | .070 |
| Item 6[1] | 1422.51(134)* | 268.58(6)* | .916 | .017 | .106 | .009 | .068 |
| Item 7 | 1273.54(134)* | 119.61(6)* | .926 | .007 | .100 | .003 | .063 |
| Item 10 | 1373.10(140)* | 99.56(6)* | .920 | .006 | .102 | -.020 | .067 |

We therefore concluded that the assumption of partial scalar invariance could be retained (cf. Knight et al., [21]; Vandenberg & Lance, [37]). Means for religious exclusivity by groups are presented in Table 4.

**All Religious Identification.** Next, we proceeded to evaluate whether the REM was invariant across specific religious identifications.

As shown in Table 3, the configural model across all religious identifications was also associated with mediocre to acceptable fit [$\chi2(98) = 103.80$, $p < .001$; CFI = .939; RMSEA = .106; SRMR = .041]. Building on this model, fit indices did not indicate a significant decline upon adding the factor loading constraints [$\Delta\chi2(30) = 120.13$, $p<.001$; ΔCFI = .006; ΔRMSEA = .009]. The scalar invariance constraints however were imposed and resulted in a significant decline in model fit [$\Delta\chi2(36) = 1085.92$, $p<.001$; ΔCFI = .068; ΔRMSEA = .025]. Subsequent analysis revealed items 2, 3, 4, and 6 violated the assumption of scalar invariance. We therefore were unable to retain the assumption of full or partial scalar invariance. Given the level of complexity behind the current model, no additional items were dropped from the REM (Table 4 for means and SD by specific religious groups).

*Table 4. Mean Comparison across Religious Subgroups*

| | Means | S.D. |
|---|---|---|
| Religious vs. Non-Religious | | |
| Non-Religious | 1.331 | .292 |
| Religious | 2.190 | .696 |
| All Groups | | |
| Protestant | 2.352 | .704 |
| Assemblies | 2.909 | .619 |
| Roman | 1.902 | .485 |
| Jewish | 1.727 | .502 |
| Mormon | 3.449 | .372 |
| Muslim | 2.785 | .864 |
| Buddhist | 1.613 | .437 |

**Step 3A - Convergent Validation with Behavioral Indicators**

*General Model.* Having established the general factor structure of the REM, as a means of establishing concurrent validity, we proceeded to evaluate the relationship between religious exclusivity and engagement in religious behaviors (i.e., prayer, service attendance, and outside service attendance). Analysis was conducted within a measurement model in MPlus to account for measurement error when evaluating the relationship between religious exclusivity and account for the non-normal distribution of engagement in religious behaviors. The model was associated with good to acceptable fit [$\chi2(32) = 1117.66$, $p < .001$; CFI = .967; RMSEA=.064; SRMR = .033]. Religious exclusivity was strongly related with religious service attendance [$r=.410$, $p<.001$], prayer [$r = .193$, $p<.001$], and outside religious service attendance [$r = .596$, $p<.001$].

*Moderated Model.* Because religious identification may moderate the relationship between religious exclusivity and engagement in these various behaviors, a multigroup analysis was conducted first broadly (i.e., religious versus non-religious identifications) and then more specifically across all religious identifications (i.e., Roman Catholic, Protestants, Buddhist, Muslims, etc.). In determine if religious affiliation moderated these relationships, in both sets of analysis, we compared an unconstrained model (with all paths free to vary across) to a constrained model (with each path constrained to be equal across groups). Should a significant difference emerge, analysis would proceed by constraining one path at a time and examining the change in model fit following each constraint.

Regarding the broad comparison between religious and non-religious identifications. As shown in Table 5, the unconstrained model was associated with good to acceptable fit [$\chi2(76) = 1123.07$, $p<.001$; CFI = .939; RMSEA = .059; SRMR = .049]. The addition of parameter constraints resulted in a significant decline in model fit [$\Delta\chi2(3) = 514.20$, $p<.001$; ΔCFI = .030; ΔRMSEA = .012] suggesting differences among the relationships between religious exclusivity and religious behaviors. Further analysis revealed significant differences in the relationship between

religious exclusivity and religious service attendance and outside religious service attendance. Specifically, for those with a religious identification, the relationship between religious exclusivity and religious service attendance [r = .377, p<.001] and outside religious service attendance [r = .274, p<.001] was much higher than for those with a non-religious identification [r = .157, p = .005 and r = .145, p=.003].

Next we proceeded to evaluate whether differences emerged across all religious identifications. The fact that analysis were conducted with in a measurement model was even more beneficial given the lack of scalar invariance across all religious identifications. Specifically, within MPlus it is possible to impose metric invariance constraints while allowing scalar constraints (with the exception of item 7 and 10 that did not vary across groups) to be freely estimated. In doing so, we were able to compare the level convergent validity across all groups. As was done before, analysis began with a comparison of a constrained and unconstrained model (see Table 6/5) which indicated no significant difference between models = [$\Delta\chi2(18) = 116.54$, p<.001; $\Delta$CFI = .005; $\Delta$RMSEA = .001] suggesting that the relationship between exclusivity and religious behavioral indicators do not vary across groups.

**Step 3B - Concurrent Validation with Theoretical Indicators**

*General Model.* Building on the previous analysis, as an additional step in establishing concurrent validity and consistent with social identity theory, we proceeded to evaluate the relationship between religious exclusivity and meaning in life, religious identity, and self-esteem. Analysis was conducted within a measurement model in MPlus to account for measurement error when evaluating the relationship between religious exclusivity and account for the non-normal distribution of engagement in religious behaviors. The model was associated with good fit [$\chi2(53) = 1255.12$, p<.001; CFI = .958; RMSEA = .053; SRMR = .029]. Religious exclusivity, while controlling for age, sex, and income, was positively related with meaning in life [$\beta$ = .206, p<.001] and religious identity [$\beta$ = .567, p<.001] while negatively related with self-esteem [$\beta$ = -.059, p<.001].

*Moderated Model.* Once again we sought to evaluate the moderating role of religious identification (Table 6).

Regarding the broad comparison between religious and non-religious identifications, the unconstrained model was associated with good to acceptable fit [$\chi2(118) = 1585.54$, p<.001; CFI = .934; RMSEA = .057; SRMR = .047]. In addition, the added parameter constraints resulted in no significant decline in model fit [$\Delta\chi2(3) = 63.19$, p<.001; $\Delta$CFI = .003; $\Delta$RMSEA < .001]. Similarly, subsequent invariance tests revealed no significant differences across all religious [$\Delta\chi2(18) = 54.16$, p<.001; $\Delta$CFI = .001; $\Delta$RMSEA = .002].

*Table 5. Comparison of Convergent Model*

| Model | $\chi^2$(df) | $\Delta\chi^2$(df) | CFI | \|ΔCFI\| | RMSEA | \|ΔRMSEA\| | SRMR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Religious vs. Non-Religious | | | | | | | |
| Constrained | 1637.27(79)* | | .909 | | .071 | | .150 |
| Unconstrained | 1123.07(76)* | 514.20(3)* | .939 | .030 | .059 | .012 | .049 |
| REM w/ Attendance[1] | 1583.29(77)* | 460.22(1)* | .912 | .027 | .070 | .011 | .119 |
| REM w/ Outside[1] | 1359.83(77)* | 236.76(1)* | .925 | .014 | .065 | .006 | .080 |
| REM w/ Prayer | 1249.60(77)* | 126.53(1)* | .932 | .007 | .062 | .003 | .081 |
| All Religious Identifications | | | | | | | |
| Constrained | 2460.74(290)* | | .901 | | .094 | | .093 |
| Unconstrained | 2577.27(308)* | 116.54(18)* | .896 | .005 | .093 | .001 | .116 |

*notes.* [1] *Given significant decline, items were left unconstrained in subsequent models*

*Table 6. Predictive Validity by Religious Identification*

| **Model** | **$\chi^2$(df)** | **$\Delta\chi^2$(df)** | **CFI** | **\|ΔCFI\|** | **RMSEA** | **\|ΔRMSEA\|** | **SRMR** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rel. vs. Non-Rel | | | | | | | |
| Unconstrained | 1585.54(118)* | | .934 | | .057 | | .047 |
| Constrained | 1648.72(121)* | 63.19(3)* | .931 | .003 | .057 | <.001 | .054 |
| All Groups | | | | | | | |
| Unconstrained | 3054.44(425)* | | .899 | | .087 | | .066 |
| Constrained | 3108.61(443)* | 54.16(18)* | .898 | .001 | .085 | .002 | .074 |

**Step 4 - Predictive Validation**

*General Model.* Next we proceeded to establish predictive validity by evaluating the relationship between religious exclusivity and various indicators of positive and negative psychosocial functioning. As was done with convergent validity, all analysis were conducted in MPlus utilizing a measurement model in order to account for measurement error and run subsequent moderated models. Age, Sex, and self-reported income were also included as covariates. The model was associated with good fit [$\chi2(83) = 1283.58$, $p < .001$; CFI = .972; RMSEA = .042; SRMR = .026]. As displayed in Table 7, religious exclusivity was positively and significantly associated with rule breaking [$\beta = .157$, $p<.001$], aggression [$\beta = .124$, $p = .001$], anxiety [$\beta = .103$, $p<.001$], and depressive symptoms [$\beta = .093$, $p<.001$]. In addition, religious exclusivity was negatively and significantly associated with psychological well-being [$\beta = -.132$, $p<.001$].

*Moderated Model.* As part of the final step of the analytic procedures, we used a multigroup analysis in order to evaluate whether religious identification moderated the relationship between religious exclusivity and indicators of psychosocial functioning. As before, analysis began broadly (i.e., religious versus non-religious identifications) and then more specifically across all religious identifications. As shown in Table 8, there were no significant differences between the constrained models and unconstrained models broadly [$\Delta\chi2(7) = 184.03$, $p<.001$; $\Delta$CFI = .004; $\Delta$RMSEA = .002] or specifically across all religious groups [$\Delta\chi2(42) = 154.24$, $p<.001$; $\Delta$CFI = .002; $\Delta$RMSEA < .001].

**Results and their discussion.** Our goal in the present study was to develop and validate a measure of religious exclusivity, based on the work of Altemeyer and Hunsberger [3] and grounded in social identity perspectives. Half of the items were written in the first person (including "I" or "my"), and half were written from a third-person or ambiguous perspective. We used a large sample of individuals from a diverse array of religious backgrounds, including people identifying as atheist, agnostic, and spiritual/nonreligious.

We examined factorial, convergent, and predictive validity in the present study. Exploratory and confirmatory factor analyses indicated that seven of the 10 items we developed (with negatively worded items among those that were excluded) loaded strongly onto the latent subscale factor. These factor-analytic results were consistent across a number of religious (and nonreligious) backgrounds, suggesting that the construct of religious exclusivity applies both (a) across denominations and (b) to both those from organized-religious backgrounds and those who do not identify with a specific religious faith.

*Convergent Validity*

We assessed convergent validity by examining associations between religious exclusivity and religious participation (prayer, attendance at a house of worship, and informal religious activities). suggest that religious exclusivity was strongly related with religious service attendance, prayer , and outside religious service attendance. These results indicate that exclusivity may represent "part" of being re-

*Table 7. Path Estimates between Religious Exclusivity and Psychosocial Functioning*

| Outcome | Estimate | *p*-value |
|---|---|---|
| Rule Breaking | .157 | <.001 |
| Social Aggression | .060 | .089 |
| Aggression | .124 | .001 |
| Satisfaction with Life | .035 | .067 |
| Psychological Well-Being | -.132 | <.001 |
| Anxious Symptoms | .103 | <.001 |
| Depressive Symptoms | .093 | <.001 |
| | | |

*Table 8. Predictive Validity by Religious Identification*

| Model | $\chi^2$(df) | $\Delta\chi^2$(df) | CFI | \|ΔCFI\| | RMSEA | \|ΔRMSEA\| | SRMR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rel. vs. Non-Rel | | | | | | | |
| Unconstrained | 194.33(166)* | | 0.969 | | 0.047 | | 0.039 |
| Constrained | 1778.36(173)* | 184.03(7)* | 0.965 | .004 | 0.049 | .002 | 0.061 |
| All Groups | | | | | | | |
| Unconstrained | 2954.46(593)* | | .949 | | .069 | | .055 |
| Constrained | 3108.71(635)* | 154.24(42)* | .947 | .002 | .069 | <.001 | .067 |

ligious. Further, the relationship between religious exclusivity and religious service attendance significantly higher among individuals identifying with a religious group than for agnostics, atheists, or spiritual/nonreligious people. These findings suggest that exclusivity may be primarily associated with belonging to an organized religious group, and may be less applicable within informal or individualized belief systems.

These findings support our first hypothesis that exclusivity is related with religious participation. Involvement in religious activities may link the person with a religious group that operates according to social identity principles. The in-group is viewed as having access to the divine and to eternal truth, whereas other groups are viewed as being outside this access and truth. Religious participation may strive to satisfy identity motives such as self-esteem, belongingness, and distinctiveness – while also protecting the person against uncertainty related to what happens after death.

The results also suggest that exclusvity appears as predictor for impaired psychosocial functioning low self-esteem and low psychosocial well-being in for individuals from organized faiths , as well as for those identifying as agnostic, atheist, or spiritual/nonreligious.

So our second hypothesis according with in the religious group where their self-esteem and well-being might be enhanced by identity motives satisfaction, stabile death terror management, exclusivity must be linked with positive self-esteem and good psychosocial functioning is not true. Study suggests positive correlations between exclusivity, agression and rule breaking, depression and anxiety. So our third hypothesis is supported.

In agnostic, atheist and nonreligious exclusive group this result can be explained by absence of religiosity as protective factor from the fear of death and fear of "nonbeing" as TMTH and Yalom suggest. Our findings indicate that in the case of exclusivity religion beliefs don't provide security and protection against "nonbeing" (e.g., Yalom, [42]), (i.e., the fear that nothing at all exists after death).

It might be concluded that religion exclusivity appears as non adaptive condition in the agnostic, atheist and nonreligious exclusive group.

So religion exclusivity appears as nonadaptive condition in the both religion and non religion groups. These founding indicate that participation in religious groups and outside services don't provide them with enough protection for good psychosocial functioning.

Meanwhile in the religious group where their well-being might be enhanced by identity motives satisfaction, stabile death terror management, exclusivities connection with negative outcomes indicates that exclusivity is less adaptive condition in religious group in comparison of nonreligious group who show the same problems as the religious group but without the equal defensive factors.

*Limitations and Future Directions*

It might be assumed that negative correlations between exclusivity, psychological well-being and self -esteem, also positive correlations between aggression and rule breaking, depression and anxiety provides us good reason to seek some additional variables that can help us to explain origin of religion exclusivity as form of prejudice and in group favoritism.

Study of religion exclusivity is the topic of high importance in Georgia, where nowadays religion is one of the influential power which has great impact on the social and cultural life of our society. The first step of this study will be create national sensitive religion identity measure for Georgian population.

Future studies of exclusivity from the standpoint of personal and cultural identity gives opportunity for understanding which intra-psychical structures and processes are responsible for appearance of exclusivism as well as better understanding the essence of exclusivism.

**REFERENCES**

1. Adorno T., Frenkel-Brunswik E., Levinson D.J., Sanford R.N. The authoritarian personality Harper. New York: 1950.
2. Allport G.W., Kramer B.M. Some roots of prejudice. Journal of Psychology 1946; 22: 9-39.
3. Altemeyer & Hunsberger. A revised Religious Fundamentalism Scale: The short and sweet of it. International Journal for the Psychology of Religion 2004; 14: 47-54.
4. Altemeyer R.A., Hunsberger B. Fundamentalism and Authoritarianism. Paloutzian, R.F. and C.L. Park (eds.). Handbook of the Psychology of Religion and Spirituality. New York: Guilford Press: 2005; 378-393.
5. Abrams D., Hogg M.A. Comments on the motivational status of self-esteem in social identity and intergroup discrimination. European Journal of Social Psychology 1988.
6. Beck, Epstein, Brown & Steer. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. J Consult Clin Psychol. 1988; 56(6):893-7.
7. Becker E. The Denial of Death Published April 1st 2011 by Souvenir Press: 1973.
8. Bollen and Long. Testing Structural Equation Models SAGE Focus Editions: 1993
9. Burt S.A., Donnelan M.B. Age-of-onset or Behavioral Sub-types? A Prospective Comparison of Two Approaches to Characterizing the Heterogeneity within Antisocial Behavior. J Abnorm Child Psychol. 2011; 7; 633-644.
10. Clarke S., Powell R., Savulescu -Religion J. Intolerance,

and Conflict A Scientific and Conceptual Investigation. Oxford University Press: 2013.
11. Davey & Savla J. Statistical power analysis with missing data: A structural equation modeling approach. Routledge/Taylor & Francis Group; New York: 2010.
12. Demoulin S., Saroglou V., Van Pachterbeke M. Infrahumanizing others, supra- humanizing gods: The emotional hierarchy. Social Cognition 2008; 26(2): 235-247.
13. Erikson E., Erikson J.M. The Life Cycle Completed New York: Norton 1982.
14. Fislinger. Tolerance of non-believers: A cross-tabular and log-linear analysis of some religious correlates. Review of Religious Research 1976; 17(3): 232–40.
15. Greenberg, Pyszczynski, and Solomon terror management theory (TMT) in RF Baumeister (Ed) Public Self and private Self; 1986; 188-214.
16. Grieve P.G., Hogg M.A. Subjective uncer- tainty and intergroup discrimination in the minimal group situation. Personality and Social Psychology Bulletin 1999; 25: 926–940.
17. Hansen I.G., Norenzayan A. Between yang and yin and heaven and hell: Untangling the complex relationship between religion and intolerance. In: P. McNamara, Ed. Where God and Science Meet: How Brain and Evolutionary Studies Alter Our Understanding of Religion. Vol. 3; Wesport, CT: Greenwood Press--Praeger Publishers: 2006; 187-211.
18. Haslam N. Dehumanization: an integrative review.Personality and Social Psychology Review 2006; 10: 252-264.
19. Hogg M.A., Adfelman J.R., Blagg R.D. Religion in the face of uncertaintly: An uncertaintly-identify theory account of religiousness. Personality and Social Psychology Review. 2009.
20. Kauermann & Carroll. A note on the efficiency of sandwich covariance matrix estimation Journal of the American Statistical Association 2001; 96 (456): 1387.
21. Knight G. et al. Measurement and measurement equivalence issues. Studying ethnic minority and economically disadvantaged populations: Methodological challenges and best practices. Washington, DC: American Psychological Association: 2009; 97–134.
22. Little Todd. Longitudinal Structural Equation Modeling. Guilford Press: 2013.
23. Meade, Johnson, Braddy, in Principles and Practice of Structural Equation Modeling. Ed. By Rex B. Kline Guilford Press: 2008.
24. Moshman. Identity, Genocide, and Group Violence in Handbook of Identity Theory and Research. Ed.: Seth J. Schwartz, Koen Luyckx, Vivian L. Vignoles. 2011.
25. Pavot & Diener. Review of the SatisfactionWith Life Scale http://internal.psychology.illinois.edu/~ediener/Documents/Pavot-Diener_1993.pdf
26. Powell R., Clark S. Religion, Tolerance and Intolerance: Views from Across the Disciplines Oxford University: 2014 http://www.philosophy.ox.ac.uk
27. Radloff L.S. The CES-D Scale: A self-report depression scale for research in the general population. Applied Psychological Measurement 1977; 1(3): 385-401.
28. Rokeach M. The open and closed mind: investigations into the nature of belief systems and personality systems. New York: Basic Books, 1960.
29. Rosenblith J.F. A replication of some roots of prejudice. Journal of Abnormal Social Psychology 1949; 44: 470-489.
30. Rosenberg. Self-Esteem Scale. 1965. http://www.yorku.ca/rokada/psyctest/rosenbrg.pdf
31. Ryff & Keyes. The Structure of Psychological Well-Being Revisited Journal of Personality and Social Psychology 1995; 69(4):719-727.
32. Sherif, Jackson & Esses. Religion, Intolerance, and Conflict: A Scientific and Conceptual Investigation. Ed. by Clarke S., Powell R., Savulescu J. 2013.
33. Spears et al. Distinctiveness and the definition of collective self: a tripartite model. In A. Tesser, D.A. Stapel, J.V. Wood (Eds.). Self and motivation: Emerging psy- chological perspectives. Washington, DC: APA: 2002; 147–171.
34. Steger M.F., Oishi S., Kashdan T.B. Meaning in life across the life span: Levels and correlates of meaning in life from adolescence to older adult- hood.. Journal of Positive Psychology 2009; 4: 43-52.
35. Stouffer S.A. Communism, conformity, and civil liberties. Garden City, NY: Doubleday and Co., Inc.: 1955.
36. Tajfel H., Turner J.C. The social identity theory of intergroup behavior. In Psychology of intergroup relations. Ed. by S. Worchel and W.G. Austin. Chicago: Nelson-Hall: 1986; 7-24.
37. Vandenberg & Lance. A Review and Synthesis of the Measurement Invariance Literature: Suggestions, Practices, and Recommendations for Organizational Research. J Organizational Research Methods January 2000 3: 4-70.
38. Vignoles V.L. Identity Motives Handbook of Identity Theory and Research. Ed.: Seth J. Schwartz, Koen Luyckx. 2011.
39. Vignoles V.L., Moncaste N.J. Identity motives and in-group favouritism: A new approach to individual differences in intergroup discrimination British Journal of Social Psychology 2007; 46(1): 91-113.
40. Wainwright W.J. The Oxford handbook of philosophy of religion. Oxford University Press: 2005; 345.
41. Wills T.A. Downward comparison principles in social psychology. Psychological Bulletin 1981; 90(2): 245-271.
42. Yalom I. Starring at the Sun, Overcoming the Terror of Death. Pub. by Josey Baas: 2009.

## SUMMARY

## RELIGIOUS EXCLUSIVITY AND PSYCHOSOCIAL FUNCTIONING

**[1]Gegelashvili M., [2]Meca A., [2] Schwartz S.J.**

*[1]Ilia State University, Tbilisi, Georgia; [2]University of Miami, USA*

In the present study we sought to clarify links between religious exclusivity, as form of intergroup favoritism, and indices of psychosocial functioning. The study of in

group favoritism has generally been invoked within Social Identity Theory and related perspectives. However, there is a lack of literature regarding religious exclusivity from the standpoint of social identity. In particular, the ways in which religious exclusivity is linked with other dimensions of religious belief and practice, and with psychosocial functioning, among individuals from different religious backgrounds are not well understood. A sample of 8545 emerging-adult students from 30 U.S. universities completed special measures. Measure of religious exclusivity was developed and validated for this group. The results suggest that exclusivity appears as predictor for impaired psychosocial functioning, low self-esteem and low psychosocial well-being for individuals from organized faiths, as well as for those identifying as agnostic, atheist, or spiritual/nonreligious. These findings are discussed in terms of Social Identity Theory and Terror Management Theory (TMT).

**Keywords:** psychosocial functioning, religious exclusivity, social identity theory, terror management theory.

**РЕЗЮМЕ**

**РЕЛИГИОЗНЫЙ ЭКСКЛЮЗИВИЗМ И ПСИХОСОЦИАЛЬНОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ**

**[1]Гегелашвили М.К., [2]Мека А., [2]Шварц С.**

*[1]Государственный унивеерситет Ильи, Грузия; [2]Университет Майями, США*

Целью данного исследования явилось установление связи между религиозным эксклюзивизмом, как проявлением внутригруппового фаворитизма и некоторыми показателями психосоциального функционирования. 8545 студентов США заполнили специальные опросники. Опросник религиозной эксклюзивности был разработан и валидизирован для этой группы. Результаты выявили, что религиозная эксклюзивность является предиктором нарушенного психосоциального функционирования, низкой самооценки и низкого уровня психологического благополучия среди студентов различных вероисповеданий, а также у агностиков, атеистов и нерелигиозных. Результаты рассмотрены с точки зрения теории Социальной Идентичности и Теории Управления Ужасом.

რეზიუმე

რელიგიური ექსკლუზივობა და ფსიქოსოციალური ფუნქციონირება

[1]მ. გეგელაშვილი, [2]ა. მეკა, [2]ს. შვარცი

[1]ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი, თბილისი, საქართველო; [2]მაიამის უნივერსიტეტი, აშშ

კვლევა შეისწავლის რელიგიური ექსკლუზივობის, როგორც შიდაჯგუფური ფავორიტიზმის გამოვლინების, კავშირს ფსიქოსოციალურ ფუნქციონირების მაჩვენებლებთან. გამოკვლეულია 8545 სტუდენტი აშშ-ის 30 სასწავლებლიდან. გამოყენებულია სპეციალური კითხვარები. შეიქმნა და ვალიდიზირებული იქნა რელიგიური ექსკლუზივობის საზომი ინსტრუმენტი მოცემული ჯგუფისათვის. შედეგებმა აჩვენა, რომ ექსკლუზივობა წარმოადგენს პრედიქტორს ნეგატიური ფსიქოსოციალური ფუნქციონირების, დაბალი თვითშეფასების და დაბალი კეთილდღეობის განცდისა, როგორც რელიგიური ექსკლუზივების ჯგუფში, ასევე აგნოსტიკოსების, ათეისტების და არარელიგიური ექსკლუზივების ჯგუფში. შედეგები განხილულია სოციალური იდენტობის და ტერორის მენეჯმენტის თეორიის თვალსაწიერიდან.

# ЮВЕНИЛЬНЫЙ ДЕРМАТОМИОЗИТ И КАЛЬЦИНОЗ

**Жвания М.А.**

*Тбилисский государственный медицинский университет;*
*Педиатрическая академическая клиника им. Г. Жвания, Тбилиси, Грузия*

Несмотря на достижения клинической ревматологии в плане ранней диагностики, разработки и выбора тактики лечения и, тем самым, влияния на течение и исход болезни и в целом улучшения прогноза, отдельные нозологические единицы этой группы заболеваний, по существу, остаются тяжёлыми и сохраняют потенциальную опасность неблагоприятного исхода. Ювенильный дерматомиозит (ЮД) - аутоиммунное, иммунокомплексное заболевание, с генетической, мультифакториальной предрасположенностью, с преимущественным поражением мышц и кожных покровов – кардинальное проявление болезни, а также патологией отдельных органов и систем. Мы располагаем опытом клинического наблюдения над 134 больными (90 девочек и 44 мальчика; 2,04:1) в России и Грузии в возрасте от 1 года 3 месяцев до 17 лет.

В мировой литературе бóльшее количество наблюдений ЮД (143 и 151 больной) встречается в отдельных сообщениях [8,16]. В 2003 г. представлены суммарные данные NIAMS (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and skin Diseases) 395 регистрированных больных ЮД за 1995-1998 гг. [9]. Судя по этим данным, частота ЮД в год на миллион населения колеблется от 2,7 до 4,1. Причём, наибольшая частота заболевания (257 из 395) приходится на белую расу не испанского происхождения, наименьшая – на американских индейцев и жителей Аляски, а так же на жителей восточных стран и Исландцев (2 и 5 наблюдений, соответственно). В целом, так же выявляется преобладание заболевания у девочек по сравнению с мальчиками (181/76-2,4:1). В 1996 г. нами проведено эпидемиологическое исследование диффузных болезней соединительной ткани, в том числе и ЮД среди детского населения Грузии [1]. В результате выявлено, что частота ЮД колеблется от 0,001 до 0,004 наблюдений на 1,000 с тенденцией роста частоты и преобладанием в два раза среди городского детского населения в сравнении с сельским.

С точки зрения генетического маркирования ЮД, представляет интерес ассоциирование заболевания с антигенами класса II системы HLA (Human Leukocyte Antigen), являющегося частью Т-клеточного иммунного ответа и специфического для разной этнической группы. Так, аллель DRB1* 0301 и DQA1* 0501 представляет высокий риск для развития дерматомиозита и полимиозита у Кавказской как детской, так и взрослой этнических групп [5,6,17,22]. Другие авторы также выявили идентичные результаты, однако, по их данным, для американских африканцев был характерен HLA-DQA1* 0601 [13]; для японцев риск-фактором ЮД является HLA- DRB1* 15021 [20].

Аутоантитела при ЮД делятся на две категории: миозит-специфические антитела, направленные против цитоплазмы и ядра и миозит-ассоциированные антитела, которые обычно выявляются при других аутоиммунных процессах и так называемых overlape sindroms. Миозит - специфические антитела (Anti-Mi-2 Anti-SRP) ассоциируются с классическим кожным синдромом ЮД и его тяжёлым, упорным к лечению вариантом; Anti-Pi 40 (My) – ассоциируются с кальцинозом и контрактурами [22], ровно так же как и фактор некроза опухоли (ФНО)-α-308 А представляет риск хронизации ЮД трофическими нарушениями кожи и язвенным процессом желудочно-кишечного тракта [7,14,17]. Известно что, ФНО-α относится к цитокинам; его продукция обусловлена бактериальным эндотоксином, возрастает в зависимости от степени инфицирования и бывает причиной шокового состояния [3]. Ген ФНО определяет выявление ФНО-α и обнаруживается в HLA-B и HLA DR 3 пространстве и способствует нарушению равновесия [5]. Другие авторы отмечают, что ФНО-α-308 особенно высок при ЮД у детей Кавказского происхождения, является риск-фактором формирования воспалительной миопатии, включая ЮД, с продукцией мононуклеарных клеток и дальнейшей хронизацией процесса [14].

В литературе широко обсуждается вопрос о возможной роли химеризма при аутоиммунных и других заболеваниях (системная красная волчанка, системный склероз, первичный билиарный цирроз, аутоиммунный тиреоидит и ЮД) как явления с присутствием в одном организме разного генетического материала, совместимого по лейкоцитарным антигенам человека. Говоря о микрохимеризме, имеется в виду наличие во время беременности низкого уровня нестволовых клеток с передачей их плоду; которые в течение многих лет пресистируя в организме ребенка, в соответствии с генетической основой, сохраняют потенциальную возможность формирования болезни [11]. Другие авторы выявили ассоциацию химеризма при ЮД с HLA –DQA1*0501 (риск-фактор этого заболевания), что повышает риск развития болезни, особенно у однояйцевых близнецов, идентичных по генотипу [15]. Наблюдения ЮД у однояйцевых близнецов неоднократно описывались в литературе [18,23]. С этой точки зрения так же интересно выявление не только идентичного

пробанду заболевания, но и других ревматических болезней (чаще ревматоидный артрит), что мы отметили в каждой седьмой семье у родственников больных I и II колена.

Риск развития ЮД на фоне генетической предрасположенности повышается под действием средовых факторов (инсоляция, вакцинация, стресс, охлаждение, вирусная инфекция), формированием молекулярной мимикрии, продукцией цитокинов, органоспецифических антител, комплемент-связывающих структур, а так же электронно-плотных депозитов, активированных Т-лимфоцитов и макрофагов, значительными изменениями мышечной ткани с диффузным миолизом, васкулитом, массивной лимфоидно-макрофагальной инфильтрацией с последующим преобладанием процессов атрофии, склероза и кальциноза. Некоторые авторы отмечают, что васкулопатия и некроз являются предикторами хронизации процесса при ЮД [10]. Другие ЮД классифицируют как системную васкулопатию [12], тем самым отличая его от такового у взрослых [16,24]. Ещё в 1978 г. мы выделили особенности течения ЮД, отметив в целом у детей, по сравнению с взрослыми, бóльшую активность патологического процесса, с поражением кожных покровов, эритемой, отёком, капилляритами, трофическими нарушениями, лёгочным васкулитом, кардитом, абдоминалгиями и язвенным процессом желудочно-кишечного тракта, гепатоспленомегалией, поражением центральной нервной системы [2].

Мышечный синдром клинически проявляется симметричной, прогрессирующей мышечной слабостью, миалгиями с преимущественной локализацией в проксимальных группах мышц, дисфагией, дисфонией, дизартрией, снижением экскурсии грудной клетки. При хронизации развивается гипотрофия мышц, кальциноз, целлюлит, сухожильно-мышечные контрактуры. Из 134 больных ЮД у 50 (37,3%) мы отметили кальциноз, что в 5 раз превышает его частоту у взрослых и отражает особую тяжесть мышечного синдрома при этом заболевании у детей. По данным мировой литературы [4,16,19], частота кальциноза при ЮД колеблется от 25,9 до 35,3% . По нашим данным, кальциноз мышц, подкожной клетчатки, фасций может быть ограниченным и диффузным, развивается в течение 1-5 лет, в среднем, спустя 2 ½ года от начала ЮД, чаще при его непрерывно–рецидивирующем течении. Так, из 30 больных (из 134 наблюдаемых нами) с непрерывно-рецидивирующим течением заболевания у 23 (76,6%) отмечен кальциноз, в том числе у 8 – диффузный.

Кальционз, наряду с гипотрофией мышц, является причиной формирования сгибательных контрактур и функциональных нарушений опорно-двигательного аппарата, вплоть до глубокой инвалидности. В предошкольном и дошкольном возрасте с бóльшей генерализацией ЮД в два раза чаще, чем у детей более старшего возраста, развивается кальциноз с преобладанием его диффузного варианта. Иногда в местах кальцинатов образуются инфильтраты или свищи с отторжением обызвестленной массы. Следует отметить, что раннее начало и бóльшую выраженность кальциноза мы отметили преимущественно в мышцах плечевого пояса, особенно с m.biceps brachi. При гистохимическом исследовании биоптатов m.biceps brachi и m.quadriceps femoris у 55 больных идентичной клинической картиной ЮД, с давностью заболевания до 12 месяцев, в среднем, 3 месяца, более тяжёлые воспалительные и дегенеративные изменения обнаружены в биоптатах m.biceps brachi [21]. Приводим наблюдение ЮД с диффузным кальцинозом и осложнениями.

*Случай из практики:* больной Ф., 13 лет, повторно поступил 27/XI/2013 г. в Педиатрическую академическую клинику им. Г. Жвания Тбилисского государственного медицинского университета в тяжёлом состоянии с диагнозом ЮД, диффузный кальциноз; параорбитальный целлюлит; гайморит; этмоидит.

Больной - житель районного центра Грузии, от здоровых родителей. С годовалого возраста отмечались проявления экскудативного диатеза, реакция на ряд пищевых продуктов (яйца, шоколад). Настоящее заболевание началось подостро в 3-летнем возрасте, когда после очередной респираторной инфекции, протекавшей на фоне высокой температуры и лечения антибиотиками, ребёнок стал раздражительным, плаксивым, адинамичным, часто падал. На лице появились лиловая эритема и отёк с преимущественной локализацией в параорбитальную область, расцененные как аллергия. Болезнь прогрессировала и лишь спустя 1 ½ года от начала заболевания был поставлен диагноз ЮД кальцинатами с активностью процесса II-III степени. У больного выражены общедиастрофические процессы, капилляриты на ладонях, диффузная эритема кожи, сухость и шелушение, плотность и гипотрофия мышц, распространенные сухожильно-мышечные контрактуры. На рентгенограммах фиксировались единичные кальцинаты с преимущественной локализацией в мышцах плечевого пояса.

Данные лабораторных исследований (ферментативная активность крови – креатинфосфокиназа, лактатдегидрогенеза, альдолаза; гиперкреатинурия) коррелировали с тяжестью и активностью основного заболевания, отражая воспалительную и иммунологическую активность ЮД, глубину и распространённость некробиотических процессов в мыщцах. На электромиограмме фиксировались резкое и диффузное снижение амплитуды колебаний, единичные фасцикуляций, свидетельствующие о поражении мышц, сопровождавшиеся процессом денервации и, следовательно, поражением периферического аксона.

О глубоком и прогрессирующем патологическом процессе в системе микроциркуляторного русла свидетельствовали данные капилляроскопии и реовазографии: мутность фона, снижение общей видимости капилляров и смазанность их контуров, скорее всего обусловленные повышенной сосудистой проницаемостью; укорочение, утолщение капилляров с анатомически расширенными петлями и извитыми артериальными и венозными браншами; снижение пульсового кровенаполнения.

В клинике было начато лечение кортикостероидными гормонами (преднизолон из расчёта 1 ½ мгр/кг/сутки) наряду с многосторонней симптоматической терапией. На фоне лечения отмечалась положительная динамика в состоянии ребёнка - поблекла эритема, нарасла мышечная сила, снизились показатели ферментативной активности крови. Однако в дальнейшем, в связи с нерегулярным посещением клиники и следовательно неадеквативным лечением, болезнь прогрессировала, приняла непрерывно-рецидивирующее течение, нарастали миотрофия, контрактуры и кальциноз с периодическим формированием инфильтратов, открытием свищей в местах кальцинатов с отторжением известковой массы и наслоением вторичной инфекции. Больному проводились повторные курсы антибиотикотерапии, а также ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) против прогрессирования кальциноза в дозе 625 мгр 2 раза в день с повторными двухнедельными курсами лечения; принимал поддерживающую дозу кортикостероидных гормонов.

При последнем поступлении больного в клинику общее состояние было тяжелым, температура субфебрильная, жалобы на понижение зрения и боли в области левого глазного яблока, чувство онемения лица, губ и зубов слева. Лицо гиперемировано, отечно и асимметрично, экзофтальм и гнойное выделяемое из левого глаза (рис. 1). Умеренно выражен медикаментозный синдром Иценко-Кушинга. Отмечались общая сухость, шелушение и гиперемия кожи, множественные свищи с отторжением известковой массы (рис. 2) умеренная мышечная слабость, диффузная плотность и гипотрофия мышц, сгибательные сухожильно-мышечные контрактуры. На рентгенограммах верхних и нижних конечностей - множественные тени костной плотности в мягких тканях от отдельных вкраплений до конгломератов (диффузный кальциноз). Резко выраженный остеопороз. Истончение кортикального слоя (рис. 3а, б, в, г).

На основании данных лабораторных исследований выявлен лейкоцитоз (24. $2.10^3$), нейтрофилез (81,6%) со сдвигом влево; СОЭ 56 мм/час; CRP 41; явления гиперкоагуляции (протромбиновый индекс 94,5%; время активированного парциального тромбопластина 27,8; концентрация фибриногена 6,9 г/л); ферментативная активность крови умеренно повышена за счёт креатинфофокиназы (350 U/L). В общем анализе мочи следы белка и единичные неизменённые эритроциты. Бактериологическое исследование выделяемого из глаза дало рост гемолитического стрептококка и золотистого стафилококка.

В клинике больной консультирован невропатологом, отоларингологом, лице-челюстным хирургом, офтальмологом. По заключению невропатолога, в невралгическом статусе изменений не выявлено. Осмотр офтальмолога – OD в норме; OS – движение глазного яблока ограничено, особенно снаружи, халазион века и слизистой, экзофтальм, выделяемое; глазное дно не просматривается. При компьютерной томографии головного мозга поражение не выявлено; отмечен диффузный целлюлит левой орбиты с воспалительно-инфильтративными изменениями, двусторонний гайморит и этмойдит (рис. 4).

*Рис. 1. Больной Ф. 13 лет, ЮД, эритема и отечность лица, особенно слева, в параорбитальной области, птоз и экзортальм, гнойное выделяемое из левого глаза*

*Рис. 2. Тот же больной; множественные, частично возвышающиеся над поверхностью кожи, кальцинаты*

а

б

в

г

*Рис. 3. Рентгенограммы верхних и нижних конечностей (а,б,в,г). Множественные тени костной плотности в мягких тканях от отдельных вкраплений до конгломератов (диффузный кальциноз). Резко выраженный остеопороз. Истончение кортикального слоя*

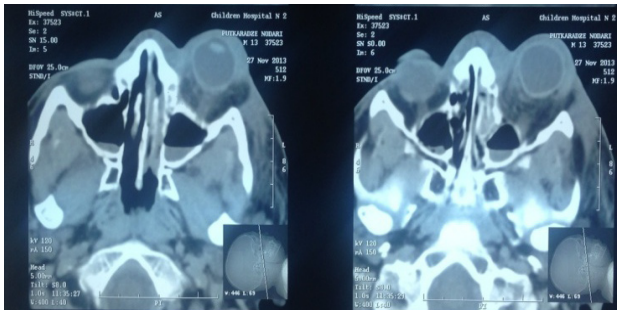


*Рис. 4. КТ. Диффузный целлюлит левой орбиты с воспалительно-инфильтративными изменениями, двусторонний гайморит, этмоидит*

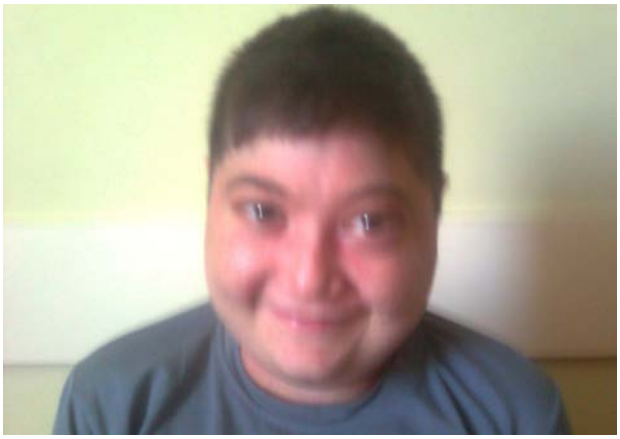


*Рис. 5. Тот же больной, спустя 4 месяца*

В клинике начато лечение антибиотиками (меронем и ванкомицин), гепарино- и местная терапия, а также поддерживающая терапия преднизолоном - 15 мгр/сутки. На фоне проводимого лечения в течение нескольких суток наметилась положительная динамика, уменьшились болевой синдром, выделяемое из глаза, плотность век, чувство онемения, отечность и гиперемия кожи; постепенно нарастала острота зрения; глазное дно просматривалось, хотя оставались плотность век и некоторое ограничение движения глазного яблока. В крови уменьшились показатели воспаления, явления гиперкоагуляции. Спустя две недели с улучшением больной выписался из клиники под нашим систематическим наблюдением. В настоящее время состояние ребёнка стабильное, активен, посещает школу. Проводится медикаментозное лечение (ЭДТА и преднизолон 10 мгр/сутки) и активная лечебная гимнастика (рис. 5).

Таким образом, данное наблюдение является ярким примером непрерывно-рецидивирующего течения ЮД с формированием диффузного кальциноза, гипотрофии мышц и сухожильно-мышечных контрактур, целлюлита и наслоения вторичной инфекции.

Следовательно, ЮД - тяжёлое заболевание, однако и при его осложнениях, при условии адекватной терапии и мониторинга возможно влияние на течение и исход болезни.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. მ. ჟვანია, თ. გვენეტაძე. შემაერთებელი ქსოვილის დიფუზური დაავადებების კლინიკურ-ეპიდემოლოგიური ასპექტები საქართველოში მცხოვრებ ბავშვებში. მეთოდური რეკომენდაცია. თბ.: 1996.
2. Исаева Л.А., Жвания М.А. Дерматомиозит у детей. М.: «Медицина»; 1978: 229.
3. Насонов Е.Л. Фактор некроза опухоли. РМЖ 2009; 17.
4. Brown VE., Pilkington C.A., Feldman BM., et al. Rheumatology. Oxford: 2006.
5. Huber A.M. Juvenile Dermatomyositis, Advances in Pathogenesis, Evaluation and Treatment. Pediatr. Drugs 2009; 11(6): 361-374.
6. Mamyrova G., O'Hanlon T.P., Monroe JB et al. Immunogenetic risk and protective factors for Juvenile dermatomyositis in Caucasians. Arthritis Rheum. 2006; 54:3979-3987.
7. Mamyrova G., O'Hanlon T.P., Sillers L. et al. Cytokine gene polymorphisms as risk and severity factors for juvenile dermatomyositis. Arthritis Rheum. 2008; 58: 3941-50.
8. McCann L.I., Juggins A.D., Maillard S.M. et al The juvenile Dermatomyositis. National Registry and Repository (UK and Ireland) – clinical characteristics of recruited within the first 5yr. Rheumatology 2006; 45: 1255-60.
9. Mendez E.P., Lipton R., Ramsey-Goldman at al. US Incidence of juvenile dermatomyositis, 1995 -1998: Results from the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Registry. Arthritis and Rheumatism 2003; 49(3):300-305.
10. Miles L., Bove K.E., Lovell D. et al Predictability of the Clinical Course of Jouvenile Dermatomyositis Based on Initial Muscle Biopsy: a retrospective steady of 72 Patients. Arthritis Rheum. 2007; 57: 1191.
11. Miller S.K. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. Autoimmune Rev. 2004; 3(6): 454-63.
12. Nelson Textbook of Pediatrics, 18th edition. Philadelphia: 2007.
13. O'Hanlon I., Rider L.G., Mamyrova G. et al. HLA Polymorphisms in African Americans with Idiopathic Inflammatory Myopathy. I. Rheumatol. 2004; 31(9): 1847-50.
14. Pachman L.M., Lipton R. Ramsey-Goldman R et al. history of infection before the onset of juvenile dermatomyositis: results from the National Institute of arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Research Registry. Arthritis Rheum 2005; 53: 166-72,
15. Reed A.M., McNallon K., Wettstein P. et al Does HLA –dependant Chimerism underlies the pathogenesis of juvenile dermatomyositis? G. Immunol. 2004; 172; 5041-6.
16. Rider L.G., Lanchebruch P.A., Monroe I..et al. Damage Extant and Predictors in Adult and Juvenile Dermatomyositis and Polymyositis as Determined with the Myositis Damage Index. Arthritis and Rheumatism 2009; 60(11): 3425-3435.
17. Rider L.G., Lindlsley C.B., Cassidy J.T. Juvenile Dermatomyositis. Textbook of Pediatric rheumatology by Petty C., Lindsley L. Sixth edition. Philadelphia: 2011.
18. Schuermann H., Hornstein O. Dermatomyositis (Polymyositis) In: Dermatologie und Venerologie. Stuttgart: 1958.
19. Shih-Kai Chiu, Yao-Hsu Yang, Li-Chieh Wang et al., Ten-year experience of Juvenile Dermatyositis; a retrospective study. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2007; 40: 68-73.
20. Tomono N., Morio M., Nakajima S. et al. HLA DRB1* 15021 Is the Predominant Allele in Japanese Patients with Juvenile Dermatomyositis. J. Rheumatol. 2004; 31(9): 1847-50.
21. Varsani H., Charman S.C., Li C.K. et al. Validation of a score tool for measurement of Histological severity in juvenile dermatomyositis and association with clinical severity of disease. Ann. Rheum Dis. 2015; 74: 204-210.
22. Wedderburn L.R., Rider L.G. Juvenile dermatomyositis: new developments in pathologenesis, assessment and treatment. Best Practice and Research Clinical Rheumatology 2009; 23: 665-678.
23. Wedgwood R.G., Cook G.D. Cohen J. Dermatomyositis Report of 20 cases in children, with a discussion of endocrine therapy in 13. Pediatrics 1953; 12: 447-466.
24. Woo P., Laxer R. M., Sherry D.D. Pediatric Rheumatology in Clinical Practice. London: 2007.

**SUMMARY**

**JUVENILE DERMATOMYOSITIS AND CALCINOSIS**

**Zhvania M.**

*Tbilisi State Medical University; G. Zhvania Academic Clinic of Pediatry, Tbilisi, Georgia*

Juvenile Dermatomiositis (JD) is autoimmune disease that progresses with time; JD's main differentiated syndromes are rash on the skin, poor function of muscles, and often developing invalidism. If the health practitioners manage to diagnose the JD on an early stage and prescribe the adequate treatment the disease will not progress aggressively. This approach is tangible for practical rheumatology and pediatric. The article aims to present the reasons of the development of the JD and calcinosis. The study based on the description of the patients with JD. There are distinguished the main symptoms of the disease in children: frequent and acute developments of muscles calcinosis, occasionally with diffuse character followed with hypotrophy of the muscles, contractures and invalidism. One of the patient cases that describe the article is the thirteen-year boy with JD indicating repeated sequence of the disease, with diffusive calcinosis, cellulitis followed with secondary infection and impaired vision.

**Key words:** Juvenile Dermatomyositis, calcinosis, contractures.

**РЕЗЮМЕ**

**ЮВЕНИЛЬНЫЙ ДЕРМАТОМИОЗИТ И КАЛЬЦИНОЗ**

**Жвания М.А.**

*Тбилисский государственный медицинский университет; Педиатрическая академическая клиника им. Г. Жвания, Тбилиси, Грузия*

Ювенильный дерматомиозит (ЮД) - аутоимунное полисистемное заболевание с прогрессирующим течением, поражением кожных покровов, ограничением функции опорно-двигательного аппарата и нередко развитием инвалидности. Ранняя диагностика заболевания , адекватная терапия и наблюдение в динамике с коррекцией лечения по существу меняет прогноз заболевания. В связи с отмеченным проблема весьма актуальна и значима для практической ревматологии и педиатрии.

В статье представлены современные взгляды на патогенетические механизмы ЮД, выделены особенности течения заболевания у детей, генез, частота и тяжесть развития кальциноза мышц, иногда диффрузного характера, являющегося, наряду с гипотрофией мышц причиной сухожильно-мышечных контрактур и инвалидности.

В работе дано описание редкого наблюдения ЮД у 13-летнего мальчика (с соответствующей иллюстрацией) с непрерывно-рецидивирующим течением заболевания, диффузным кальцинозом, целлюлитом, наслоением вторичной инфекции и поражением органа зрения.

რეზიუმე

იუვენილური დერმატომიოზიტი და კალცინოზი

მ. ჟვანია

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი; გ. ჟვანიას სახ. პედიატრიის აკადემიური კლინიკა, თბილისი, საქართველო

იუვენილური დერმატომიოზიტი (იდ) აუტოიმუნური, პოლისისტემური დაავადებაა ცვლილებებით კანზე, საყრდენ-მომაძრავებელი აპარატის დაზიანებით და ზოგჯერ მძიმე ინვალიდობით. დაავადების ადრეული დიაგნოსტიკა,ადეკვატური თერაპია მუდმივი კორექციით მნიშვნელოვნად ცვლის მის პროგნოზს. საკითხი მეტად აქტუალური და მნიშვნელოვანია პრაქტიკული რევმატოლოგიისა და პედიატრიისათვის.

ნაშრომში წარმოდგენილია იდ პათოგენეზისადმი თანამედროვე მიდგომა, აღნიშნულია დაავადების მიმდინარეობის თავისებურებანი, კუნთების ჰიპოტროფიის, კალცინოზისა და კონტრაქტურების სიხშირე ბავშვებში. მოყვანილია კლინიკური მაგალითი - 13 წლის ვაჟის იდ-ით, რომელიც წარმოაჩენს დაავადების უწყვეტ მორეციდივე ვარიანტს დიფუზური კალცინოზით,ცელულიტით, ბაქტერიული ინფექციის თანდართვით და მხედველობის ორგანოს დაზიანებით.

# PITUITARY DEFICIENCY FOLLOWING TRAUMATIC BRAIN INJURY IN EARLY CHILDHOOD: A REVIEW OF THE LITERATURE

**[1]Soliman A.T., [2]Adel A., [3]Soliman N.A., [4]Elalaily R., [5]De Sanctis V.**

*[1]Department of Pediatrics, Division of Endocrinology, Alexandria University Children's Hospital, Alexandria, Egypt; [2]Weill Cornell Medical College, Qatar and General Pediatrics, Hamad General Hospital, Doha, Qatar; [3]Ministry of Health, Alexandria, Egypt; [4] Department of Primary Health Care (PHC), Doha, Qatar; [5]Pediatric and Adolescent Outpatient Clinic, Quisisana Hospital, Ferrara, Italy*

The incidence of Traumatic Brain Injury (TBI) ranges between 56 to 546 per 100,000 population in different reports. Data from a New Zealand cohort, followed from birth to early adulthood, demonstrates that the incidence of TBI is actually 10 fold higher than normally assumed. In addition, the epidemiology of TBI varies considerably with age [20]. Approximately, 180 children per 100 000 population sustain closed head injury each year with only 5.6 per 100 000 in the severest category, requiring treatment on an intensive care unit. The estimated incidence of TBI doubles between the ages of 5 and 14 years and peaks in both males and females during adolescence and early adulthood with rates of 250 per 100 000 population. Generally, teenagers aged 15-20 years have greatest risk of TBI (TBI incidence 2.4/100 per year), with more than twice the TBI rate of school-aged children. Males have higher rates of TBI at all ages, but this trend is particularly marked during adolescence. Road-traffic accident, falls, sport injuries, child abuse and shaking injury are the most common etiological factors for pediatric TBI, although the causes are different among age groups [1,3-5,20,22].

Most of the incidence studies on TBI are cross-sectional and based on a description of hospital admissions during a specific period of time. These provide highly conservative estimates as the majority of TBI cases are mild and do not present to hospital.

*The pathophysiology of head injuries related to hypothalamic pituitary insult*

Several mechanisms have been proposed to explain pituitary dysfunction, such as hypoxic insult or direct mechanical injury to the hypothalamus, pituitary stalk or pituitary gland, compression from hemorrhage, edema, increased intracranial pressure and changes in cerebral blood flow and metabolism. The injury that is directly caused by the mechanical force of the trauma is called primary injury. This type of injury is due to shear force, direct contact, and/or tissue penetration. Secondary injury is created by the body's response to the primary insult. Both primary and secondary injury can be focal or diffuse. Focal injury tends to be caused by contact forces, whereas diffuse injury is more likely to be caused by non-contact, acceleration-deceleration and rotational forces. In autopsy studies of patients who died due to TBI, there is an up to 50% incidence of hemorrhage in the pituitary capsule and up to 30% incidence of either necrosis of the anterior pituitary or stalk hemorrhage. Autopsy results of those individuals who survived for 12 hours after TBI show that 35% of them had strokes that covered approximately 70% of the anterior pituitary, in the peripheral region, where the blood supply is carried out by the pituitary portal veins. However, the autopsy studies include the most severe cases, those who died from the acute trauma, and may not reflect the pathophysiology of long-term pituitary failure in survivors. Age-dependent parameters may confer an increased excitability to the immature brain and facilitate enhanced plasticity and recovery from injury [2,6-8,18,27].

More recently, the role of elevated inflammatory substances (e.g. some amino acids, nitric oxide, free radicals, interleukin 6) in response to hypoxemia and elevated intracranial pressure have emerged as pathological mechanisms for secondary brain injury [21].

In addition autoimmunity may play a role in affecting the pituitary gland. In a preliminary study, in 2008, Tanriverdi et al. investigated the presence of antipituitary antibodies (APAs) in 29 patients with TBI, and in 60 age- and sex-matched normal controls. The antipituitary antibodies (APAs) were detected in 44.8% of TBI patients 3 years after head trauma but in none of the controls. In this study hypopituitarism ratio was significantly higher in APA positive patients (46.2%) than in APA-negative patients (12.5%) ($p=0.04$) with a significant positive correlation ($r=0.74$) between high APA titre and low peak GH response to provocation [26]. However, these results were not confirmed in another study by the same authors [25].

Moreover, some data suggests that extreme childhood abuse or neglect can lead to growth failure through programming the HPA axis, and this may contribute to an increased lifetime risk of depression [11].

*Literature Search " TBI and endocrine consequences "*

The MEDLINE database was accessed through PubMed in April 2015. Results were restricted to the past 15 years and English language of articles. For the first search we utilized MeSH terms "pituitary dysfunction", "hypopituitrism", "pituitary" in conjunction with "traumatic brain injury" and with "endocrine consequences". Reference lists were reviewed and relevant papers were also consulted to find additional studies and data. In selected studies were

analysed and tabulated with their important comments. Out of 97 research articles 26 articles fitted our search criteria for children and adults with TBI.

**Results and their discussion.** Data of these research papers are summarized in Table 1.

*Table 1. Prevalence of hypopituitarism in adults and children following Traumatic Brain Injury (summary of studies for the past 15 years)*

| Authors | Number Age | Time of testing after trauma | GH Def. | TSH Def. | LH-FSH Def. | ACTH Def. | ADH Def. | Multiple Pituitary Deficiency |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Urban RJ et al. Growth Horm IGF Res. 2006 ;16 Suppl A: S25-9. | 44 Adults | | 15-21% | | | | | From 50% to 30% of patients had anterior pituitary hormone deficiencies at 3 months after TBI |
| Klose M et al. Clin Endocrinol (Oxf). 2007;67:598-606. | 46 Adults | 12 months | 10.9% | 2.2% | 2.2% | 6.5% | 2.2% | Hypopituitary patients had more frequently been exposed to severe TBI |
| Aimaretti G et al. Clin Endocrinol (Oxf).2004; 61:320– 6 | 100 37 y | 3 months | 37% | 5% | 14% | 8% | 4% | 10% had multiple pituitary deficiency. GHD is the most frequent defect |
| Leal-Cerro A et al. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 ;62:525-32. | 170 | variable | 5.8% | 5.8% | 17% | 6.4% | 1.7% | 8.8% multiple pituitary deficiency |
| Bondanelli M et al. Eur J Endocrinol. 2005;152: 679-91 | 357 37.6 y | Variable 12-64 months | 28% | 10% | 14% | --- | 31% | 12% multiple pituitary deficiency |
| Kokshoorn NE et al. Eur J Endocrinol. 2010;162: 11-8. | 931 14 studies (review) Adults | 1 year | 2-39% | 5-15% | 0-29% | 0-60% | --- | Hypopituitarism in 25% of patients with predominantly secondary hypogonadism and GHD |
| Herrmann BL et al. Exp Clin Endocrinol Diabetes.2006; 114:316-21. | 76 Adults | 20 months | 8% | 3% | 17% | 3% | --- | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lieberman SA et al.<br><br>J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:2752-6 | 70<br><br>Adults | 49 months | 14.6% | 21.7% | 1% | 1% | --- | |
| Giordano G et al.<br><br>Pituitary. 2005;8:227-31. | 70<br><br>Adults | 1 year | >20% | | | | | Multiple hypo-pituitarism was present at 12 months retest-ing |
| Popovic V et al.<br><br>Growth Horm IGF Res. 2005 ;15:177-84 | Chil-dren and adoles-cents | variable | 15% severe GHD<br><br>15% with partial GHD | --- | 9% | --- | --- | Some degree of hypopituitarism was found in 35-40% of TBI patients |
| Kelly DF et al. J<br><br>Neurotrauma. 2014 ;31: 1161-71 | 22<br>32 y | 6-9 months | 18% | --- | 22.7% | --- | --- | GHD develo-ped in approxi-mately 18% of patients |
| Agha A et al.<br><br>JCEM 2004;89: 4929-36. | 102<br><br>Adults | | 17.6% | 1% | 12% | 13% | --- | |
| Bavisetty S et al.<br><br>Neurosurgery. 2008 ;62:1080-93. | 70<br>32 years<br><br>Ado-les-cents and adults | 9 mon | 21% | --- | 10% | --- | 1.4% | Hypopituita-rism in approxi-mately 20% of patients |
| Tanriverdi F et al.<br><br>Eur J Endocrinol. 2008; 159: 7–13 | 52<br><br>Adults | 1 day<br><br>12 months | 20.4%<br><br>37.7% | 5.8%<br><br>5.8% | 41.6%<br><br>7.7% | 9.8%<br><br>19.8% | --- | 50.9% of the patients had at least one ante-rior pituitary hormone defi-ciency |
| Heather N.<br><br>Thesis, University of Auckland, 2012 | 1442<br><br>Adults | % average of total | 29% | 13% | 10% | 7% | 6% | |
| Fernandez-Rodriguez E et al.<br><br>Endocrinol Metab Clin North Am. 2015;44: 151-9. | Meta-analy-sis | | | | | | | Prevalence of r hypopituitarism in 27.5%. |

| Summary Adult studies Range | | Variable | | 2.2-22% | 2.2-41% | 1- 60% | 1.4 -31% | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Einaudi S et al. J Pediatr Endocrinol Metab. 2006;19: 691-703. | 48 Children and adolescents | 6-12 months | 6% | 2% | 1 patient had CPP | 2% | 4% | 2% with multiple pituitary deficiency |
| Poomthavorn P et al. Arch Dis Child. 2008;93:133-7. | 29 9.7 y Children | 4.5 y | 7% | 6% | 6% | 11% | --- | 31% had pit dysfunction. 14% multiple pit def |
| Niederland T et al. J Neurotrauma. 2007;24: 119-27. | 26 11.5 years Children | 30.6 months | 42% | 12% | --- | 34% | --- | Confirm the high risk for hypopituitarism in children afterTBI |
| Khadr SN et al. Clin Endocrinol 2010;73: 637-43. | 33 Children | | 21% | | | 24% | | |
| Kaulfers AM et al. J Pediatr. 2010;157: 894-9. | 21 Children | | 5% | 10% | 14% | 0% | | |
| Norwood K W et al Clin Pediatr.2010; 49: 1044-49. | 32 Children | | 16% | 3% | --- | 19% | | |
| Acerini CL et al. Eur J Endocrinol. 2006;155: 663–9 | 20 Case reports children | | 85% | 75% | 80% | 55% | 10% | |
| Heather N et al. J Clin Endocrinol Metab.2012 ;97:599 – 604 | 234 Childhood Review | % of total | 13% | 5% | 16% | 13% | --- | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Schneider H J et al.<br><br>J Neurotrauma. 2011;28: 1693-8 | 1242<br><br>Met-analy-sis<br><br>Chil-dren and adults | Variable 3 months to 7 years | | | | | | Prevalence of anterior pituitary dys-function ranged from 30 -60% |
| Auble BA et al.<br><br>J Neurotrauma. 2014 ;31:321-6 | 14 Chil-dren Longi-tudinal study | | 17% | 33% | --- | --- | --- | 50% had two or more abnor-malities |
| Casano-Sancho P et al.<br><br>Clin Endocrinol (Oxf).2013 ;79:853-8 | 23<br><br>Chil-dren | 3 months<br><br>1year | 48%<br><br>34% | | | 43%<br><br>13% | | |
| Summary Children studies Range | | Variable | 6-48% | 2-33% | 6-16% | 2-43% | | |

*Abbreviation: CPP – Central Precocious Puberty*

Literature search showed that in adults tested at variable time after significant TBI the pituitary hormonal defects included: GHD (2: 37.5%), TSH deficiency (2.2: 22%), gonadotrophin deficiency (2.2: 41%), ACTH deficiency (1: 60%) and ADH deficiency (1.4:31%). Children studies after variable time of TBI showed pituitary hormone deficiency including: GHD (6-48%), TSH deficiency (2-33%), gonadotrophin deficiency (6-16%), ACTH deficiency (2-43%) and ADH deficiency (4-10%).

There is no doubt that TBI can lead to hypopituitarism, however literature review showed a great variability of the reported rates. Our review and others, showed that the commonest post-TBI chronic endocrinopathies include anterior hypopituitarism (AH), hypogonadism, primary hypothyroidism, primary adrenal insufficiency (PAI) and diabetes insipidus (DI).

The few available longitudinal endocrine studies in patients with TBI showed that endocrine defects differ significantly with time after the injury. Over the first 6 months following TBI, there is a trend towards normalisation of pituitary function. Isolated deficiency (especially involving GH or gonadotropins) often resolves, whereas deficiency in multiple hormones is more likely to persist. This suggests two different processes in play: the general response to critical illness (mimicking hypopituitarism) and genuine traumatic pituitary injury. In contrast, the onset of new deficiency after 3 to 6 months is rare, and may either represent evolving disease or false positive results. Up-till now there is paucity of prospective studies on the natural history of post-traumatic endocrine dysfunctions, especially in children. Consequently, patients with posttraumatic hypopituitarism may receive suboptimal rehabilitation unless the underlying hormone deficiency is identified and treated.

Clinical signs of anterior hypopituitarism are often subtle and may be masked by the other sequalae of TBI (Table 2). Therefore, post-traumatic anterior pituitary dysfunction may remain undiagnosed and, possibly, aggravate symptoms of brain injury. Acute DI, occurs after severe closed head injury, frequently with basilar skull fractures; and craniofacial trauma. The usual onset is 5-10 days following trauma. Symptoms include polyuria, low urine osmolality, high serum osmolality, normal serum glucose, and normal to elevated serum sodium. Urine output usually is greater than 90 mL/kg/d, with a specific gravity of less than 1.010 and an osmolality of 50-200 mOsm. Acute DI following a mild to moderate TBI indicates a posterior pituitary lesion with only a temporary antidiuretic hormone (ADH) deficiency. Delayed onset of DI is associated with a poor prognosis due to hypothalamic involvement causing permanent DI. The most common endocrinopathies described during the following weeks and months after TBI include GHD, hypogonadism, hypothyroidism, adrenal insufficiency and DI.

*Table 2. Clinical features of hypopituitrism that should be followed after TBI*

| Hormone Deficiency | Clinical features |
|---|---|
| **ACTH** | Acute: adrenal crisis (drowsiness, dizziness, nausea, vomiting, hypotension)- Chronic: fatigue, pallor, anorexia, weight loss |
| **TSH** | Children: Short stature, delayed puberty, neurodevelopmental delay Adults: decreased libido, oligo/amenorrhea, infertility, osteoporosis. |
| **GH** | Children : Decreased growth rate Adults: Decreased muscle mass and strength, fatigue, impaired attention and memory, premature osteoporosis and atherosclerosis. |
| **LH and FSH** | Children : Delayed /absent puberty Adults: Loss of libido, mood impairment, loss of sexual hair, decreased muscle mass and strength, fatigue, premature osteoporosis and atherosclerosis. |
| **ADH** | Polyuria, polydipsia |

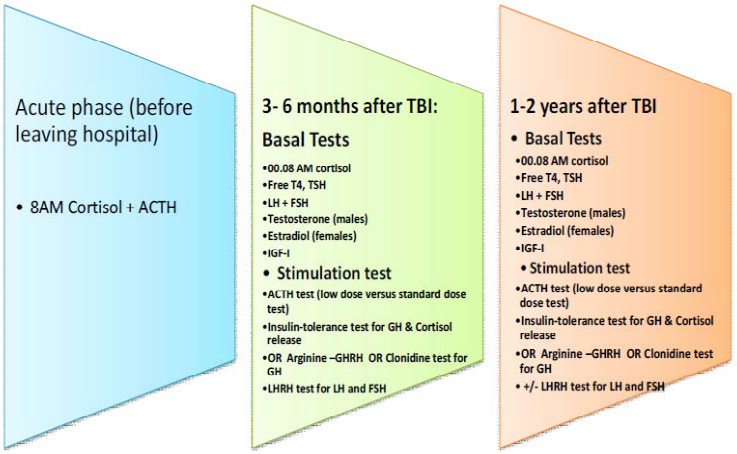



*Fig. 1. Suggested screening tests for pituitary dysfunction following TBI*

Although primary adrenal insufficiency (PAI) is uncommon and can be confused with the psychiatric symptoms of depression, confusion, and apathy. PAI may present acutely or insidiously over a prolonged period. In the acute phase the diagnosis of adrenal insufficiency should not be missed because it can be life threatening. Later presentation of PAI includes nausea, vomiting, hypotension, fatigue, weakness, anorexia, and weight loss [17,23,28,29].

It appears that the prevalence of hypo-pituitarism did not differ between TBI secondary to inflicted as opposed to accidental injuries. However, the only significant hormonal difference between injury groups was that the cortisol response to Synacthen was lower amongst inflicted TBI. Although the decrease in stimulated cortisol was considerable (14%), no subjects required treatment for adrenal insufficiency [9,24].

No prospective study has yet been able to determine the variables associated with the development of hypopituitarism, in either post-TBI acute phase or chronic phase. The severity of hormonal disturbance is generally, but not uniformly, related to the severity of TBI. Mild TBI can contribute to pituitary dysfunction [2]. Bondanelli et al. reported hypopituitarism in 37.5% of patients with mild TBI versus 59.3% of patients with severe TBI.[4] Most post-TBI hypogonadism cases are related to severe traumas, several studies were not able to correlate a lower GCS score to hypogonadism [16]. Studies have reported that anterior pituitary hormone abnormalities may remain stable, may improve or deteriorate in the first 12-36 months following head injur [14,15]. Another study noticed that age, cranial computed tomography findings, GCS, pupil examination and presence of thoracic trauma at patients' admission were independently associated with mortality. It is possible that pituitary hormonal disturbances in the acute and chronic phases may contribute to these findings, indicating the need for further studies [12].

A chief clinical question is whether routine pituitary assessment should be performed following TBI, and, if so, which patients are at sufficient risk to warrant screening tests. The bulk of studies is cross sectional and has been performed at variable time after the occurrence of TBI, using different screening tests and different hormonal assays. These factors make the evaluation of childhood risk poorly defined [10].

A consensus based on the recommendation supported by expert opinion validate that patients with a TBI and/or brain

hemorrhage should undergo endocrine evaluation in order to assess pituitary function and, if deficiency is detected, should receive hormone replacement therapy [13]. Lorenzo et al. [19] suggested the following criteria for selecting the ideal TBI patients to be tested: 1. patients with initial GCS of 13 or less or with GCS between 13 and 15 with abnormalities on brain images; 2. patients who should remain under observation for at least 24 hours; 3. patients with intracranial hemorrhagic lesions; 4. patients who develop acute hypogonadism manifestations immediately after TBI; 5.patients with current hypogonadism signs or symptoms. They recommended that the time for endocrine testing in adult patients with TBI can be done during the peritraumatic period (before patient is discharged from the hospital); three months after the trauma; one year after the trauma and a long time after the trauma (five years or more) [19]. However, there is still a need to develop appropriate guidelines for follow-up of suspected to have these dysfunctions in order to assure appropriate assessment and timely treatment of hormonal deficits.

Presently, there are no prospective studies either on acute or chronic phases that may provide a prognosis for post-TBI patients, considering the pituitary hormone profile. During the acute phase morning cortisol level <7.2 mg/dL (200 nmol/L) may be suggestive of adrenal insufficiency in acutely ill patients with TBI and glucocorticoid replacement should be instituted. However, assessment of the growth hormone, gonadal, and thyroid axes is not necessary in the acute phase because there is currently no evidence that acute-phase therapy with these hormones improves outcome. However, between 3 and 6 months after injury, all patients should undergo careful screening for clinical signs of hypopituitarism. A suggested screening protocol for pituitary dysfunction following TBI is presented in figure 1 that may be tailored to the patient clinical presentation and progress. Any pituitary hormone deficiency detected should be appropriately treated and monitored In patients with documented pituitary hormone defect at 3-6 months postinjury, repeat pituitary assessment at 1-2 year/s may be considered if the clinical or biochemical parameters raise the possibility of delayed recovery.

**Conclusion.** From the available literature it appears that there is a substantial risk of developing pituitary dysfunction after TBI in children and adolescents. Early diagnosis and management of these pituitary deficiencies can positively affect the final outcome of these patients. Therefore, Children and adolescents who sustained a significant TBI should be clinically followed and screened for these abnormalities according to an agreed protocol of investigations. Further multicenter and multidisciplinary prospective studies are required to explore in details the occurrence of permanent pituitary dysfunction after TBI in larger numbers of children with TBI. This requires considerable organisation and communication between many disciplines such as neurosurgery, neurology, endocrinology, rehabilitation and developmental paediatric.

**Competing interests:** The Authors declare no competing interests

## REFERENCES

1. Barlow KM, Minns RA. Annual incidence of shaken impact syndrome in young children. Lancet 2000; 356: 1571–1572.
2. Benvenga S. Brain injury and hypopituitarism: the historical background. Pituitary. 2005;8:193-195.
3. Benoit R, Watts DD, Dwyer K, Kaufmann C ,Fakhry S. Windows 99: a source of suburban pediatric trauma. J Trauma. 2000; 49; 477–481.
4. Bondanelli M, Ambrosio MR, Zatelli MC, De Marinis L, degli Uberti EC. Hypopituitarism after traumatic brain injury. Eur J Endocrinol.2005; 152:679–691.
5. Corrigan JD, Selassie AW, Orman JA. The epidemiology of traumatic brain injury.J Head Trauma Rehabil. 2010; 25: 72-80.
6. Daniel PM, Prichard MM, Treip CS.Traumatic infarction of the anterior lobe of the pituitary gland. Lancet 1959; 2:927–931.
7. De Sanctis V, Sprocati M, Govoni MR, Raiola G.Assessment of traumatic brain injury and anterior pituitary dysfunction in adolescents. Georgian Med News 2008; 156: 18-23.
8. Dusick JR, Wang C, Cohan P, Swerdloff R, Kelly DF. Pathophysiology of hypopituitarism in the setting of brain injury. Pituitary 2012;15:2-9.
9. Heather N. Traumatic Brain Injury in early childhood - Hypopituitarism and grading injury severity.Thesis, University of Auckland: 2012.
10. Heather N, Cutfield W.Traumatic brain injury: is the pituitary out of harm's way? J Pediatr. 2011;159:686-690.
11. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB.The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. Psychoneuroendocrinology 2008; 33: 693-710.
12. Hohl A, Mazzuco TL, Coral MH, Schwarzbold M, Walz R. Hypogonadism after traumatic brain injury. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53:908-14.
13. Leal-Cerro A, Rincón MD, Puig Domingo M. Disfunción neuroendocrina y agresión cerebral. Reunión de consenso. Endocrinol Nutr. 2009;56: 293-302.
14. Iglesias P, Gómez-Pan A, Diez JJ.Spontaneous recovery from post-traumatic hypopituitarism. J Endocrinol Invest.1996; 19:320–323.
15. Kaufman HH, Timberlake G, Voelker J, Pait TG.Medical complications of head injury. Med Clin North Am.1993; 77:43–60.
16. Kelly DF, Gonzalo IT, Cohan P, Berman N, Swerdloff R, Wang C. Hypopituitarism following traumatic brain injury and aneurismal subarachnoid hemorrhage: a preliminary report. J Neurosurg.2000;93:743-52

17. Klingbeil GE, Cline P. Anterior hypopituitarism: a consequence of head injury. Arch Phys Med Rehabil.1985;66:44-46.
18. Kornblum RN, Fisher RS. Pituitary lesions in craniocerebral injuries. Arch Pathol.1969; 88:242–248.
19. Lorenzo M, Peino R, Castro AI, Lage M, Popovic V, Dieguez C, Casanueva FF. Hypopituitarism and growth hormone deficiency in adult subjects after traumatic brain injury: who and when to test. Pituitary 2005;8 :233-237.
20. McKinlay A, Grace RC, Horwood LJ, Fergusson DM, Ridder EM, MacFarlane MR. Prevalence of traumatic brain injury among children, adolescents and young adults: prospective evidence from a birth cohort. Brain Inj. 2008; 22: 175-181.
21. Nemes O, Kovacs N, Czeiter E, Kenyeres P, Tarjanyi Z, Bajnok L, Buki A, Doczi T, Mezosi E.Predictors of post-traumatic pituitary failure during long-term follow-up. Hormones (Athens). 2014 Dec 29. doi: 10.14310/horm.2002.1564
22. Parslow RC, Morris KP, Tasker RC, Forsyth RJ, Hawley CA, UK Paediatric Traumatic Brain Injury Study Steering Group and Pediatric Intensive Care Society Study Group. Epidemiology of traumatic brain injury in children receiving intensive care in the UK. Arch Dis Child.2005; 90: 1182–1187.
23. Peters J, Welt L, Sims E. A salt wasting syndrome associated with cerebral disease. Trans Assoc Am Physiol. 1950;63:57-64.
24. Powner DJ, Boccalandro C. Adrenal insufficiency following traumatic brain injury in adults. Curr Opin Crit Care. Apr 2008;14:163-166.
25. Tanriverdi F, De Bellis A, Battaglia M, Bellastella G, Bizzarro A, Sinisi AA, Bellastella A, Unluhizarci K, Selcuklu A, Casanueva FF, Kelestimur F.Investigation of antihypothalamus and antipituitary antibodies in amateur boxers: is chronic repetitive head trauma-induced pituitary dysfunction associated with autoimmunity? Eur J Endocrinol. 2010; 162:861–867.
26. Tanriverdi F, De Bellis A, Bizzarro A, Sinisi AA, Bellastella G, Pane E, Bellastella A, Unluhizarci K, Selcuklu A, Casanueva FF, Kelestimur F. Antipituitary antibodies after traumatic brain injury: is head trauma-induced pituitary dysfunction associated with autoimmunity? Eur J Endocrinol.2008; 159:7–13.
27. Taylor HG, Alden J. Age-related differences in outcomes following childhood brain insults: an introduction and overview. J Int Neuropsychol Soc. 1997;3:555-567.
28. Yang YH, Lin JJ, Hsia SH, Wu CT, Wang HS, Hung PC, Chou ML, Hsieh MY, Lin KL. Central diabetes insipidus in children with acute brain insult. Pediatr Neurol.2011;45:377-380.
29. Zafonte RD, Mann NR. Cerebral salt wasting syndrome in brain injury patients: a potential cause of hyponatremia. Arch Phys Med Rehabil. 1997;78:540-542.

## SUMMARY

## PITUITARY DEFICIENCY FOLLOWING TRAUMATIC BRAIN INJURY IN EARLY CHILDHOOD: A REVIEW OF THE LITERATURE

**[1]Soliman A.T., [2]Adel A., [3]Soliman N.A., [4]Elalaily R., [5]De Sanctis V.**

*[1]Department of Pediatrics, Division of Endocrinology, Alexandria University Children's Hospital, Alexandria, Egypt; [2]Weill Cornell Medical College, Qatar and General Pediatrics, Hamad General Hospital, Doha, Qatar; [3]Ministry of Health, Alexandria, Egypt; [4] Department of Primary Health Care (PHC), Doha, Qatar; [5]Pediatric and Adolescent Outpatient Clinic, Quisisana Hospital, Ferrara, Italy*

Aims of review - the intent of the current manuscript is to critically review the studies on pituitary gland dysfunction in early childhood following traumatic brain injury (TBI), in comparison with those in adults.

Search of the literature: The MEDLINE database was accessed through PubMed in April 2015. Results were restricted to the past 15 years and English language of articles.

Both transient and permanent hypopituitarisms are not uncommon after TBI. Early after the TBI, pituitary dysfunction/s differ than those occurring after few weeks and months. Growth hormone deficiency (GHD) and alterations in puberty are the most common. After the one to more years of TBI, pituitary dysfunction tends to improve in some patients but may deteriorate in others. GH deficiency as well as Hypogonadism and thyroid dysfunction are the most common permanent lesions. Many of the symptoms of these endocrine defects can pass unnoticed because of the psychomotor defects associated with the TBI like depression and apathy. Unfortunately pituitary dysfunction appear to negatively affect psycho-neuro-motor recovery as well as growth and pubertal development of children and adolescents after TBI. Therefore, the current review highlights the importance of closely following patients, especially children and adolescents for growth and other symptoms and signs suggestive of endocrine dysfunction. In addition, all should be screened serially for possible endocrine disturbances early after the TBI as well as few months to a year after the injury. Risk factors for pituitary dysfunction after TBI include relatively serious TBI (Glasgow Coma Scale score < 10 and MRI showing damage to the hypothalamic pituitary area), diffuse brain swelling and the occurrence of hypotensive and/or hypoxic episodes.

In conclusion: There is a considerable risk of developing pituitary dysfunction after TBI in children and adolescents.

These patients should be clinically followed and screened for these abnormalities according to an agreed protocol of investigations. Further multicenter and multidisciplinary prospective studies are required to explore in details the occurrence of permanent pituitary dysfunction after TBI in larger numbers of children with TBI. This requires considerable organisation and communication between many disciplines such as neurosurgery, neurology, endocrinology, rehabilitation and developmental paediatrics.

**Keywords:** Traumatic brain injury, epidemiology, hypothalamic pituitary insult, endocrine consequences, children, adolescents.

**РЕЗЮМЕ**

**ГИПОФИЗАРНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**[1]Солиман А.Т., [2]Адел А., [3]Солиман Н.А., [4]Елалаилы Р., [5]Де Санктис В.**

*[1]Департамент педиатрии, отдел эндокринологии, Детский госпиталь Александрийского университета, Александрия, Египет; [2]Медицинский колледж Уэйл Корнелл, Катар и Генеральный госпиталь Хамад Общей педиатрии, Генерального госпиталя Хамад, Доха, Катар; [3]Министерство здравоохранения, Александрия, Египет; [4]Отдел первой медицинской помощи, Доха, Катар; [5]Педиатрическая и подростковая поликлиника, Госпиталь Квисисана, Феррара, Италия*

Целью данного аналитического обзора является сравнительная оценка данных по дисфункции гипофиза в раннем детстве и у взрослых после травматического повреждения мозга (ТПМ). Исследовались англоязычные статьи, помещённые в MEDLINE с 2000 года по апрель 2015 года. Установлено, что после ТПМ нередко возникает как временное, так и постоянное снижение активности гипофиза. Сразу после ТПМ дисфункция/ии гипофиза отличается от той, которая возникает спустя несколько недель и месяцев. Наиболее часто встречается недостаток гормона роста (ГР) и изменения в пубертатном возрасте. Спустя год или более после ТПМ дисфункция гипофиза у некоторых пациентов имеет тенденцию к улучшению, однако может ухудшиться у других. Недостаток ГР, а также гипогонадизм и дисфункция щитовидной железы являются наиболее обычными повреждениями. Многие симптомы эндокринных дефектов, такие как депрессия и апатия, могут пройти незамеченными ввиду психомоторных дефектов, связанных с ТПМ. К сожалению, как видно, дисфункция гипофиза негативно влияет на процесс психонейромоторного восстановления, а также на рост и пубертатное развитие детей и подростков после ТПМ. Поэтому, данный обзор подчеркивает значимость тщательного наблюдения за пациентами, особенно детьми и подростками с точки зрения их роста и других симптомов и признаков, предполагающих наличие эндокринных нарушений. Кроме того, необходимо всех скранировать на вероятность эндокринных нарушений сразу после ТПМ и спустя несколько месяцев после травмы. Риск-факторами развития дисфункции гипофиза после ТПМ являются: тяжелое ТПМ по шкале Glasgow Coma Scale score <10 и результаты магнитно-резонансной томографии, отражающие повреждение гипоталамо-гипофизарной области, диффузный отек головного мозга и возникновение гипотензивных и/или гипоксических эпизодов.

В результате проведенного анализа ретроспективной и текущей научной литературы следует заключить, что существует риск развития гипофизарной дисфункции после ТПМ у детей и подростков. Этим пациентам необходимо провести клиническое обследование и скрининг для выявления нарушений в соответствии с согласованным протоколом исследований. Необходимы дальнейшие многопрофильные исследования для детального выявления наличия перманентной дисфункции гипофиза после ТПМ у большего числа детей с ТПМ, что требует хорошей организации и коммуникации между специалистами многих дисциплин: нейрохирургами, нейрологами, эндокринологами, специалистами реабилитационной и возрастной педиатрии.

რეზიუმე

ჰიპოფიზური უკმარისობა ქალა-ტვინის ტრავმის შემდეგ ადრეული ასაკის ბავშვებში

[1]ა. სოლიმანი, [2]ა. ადელი, [3]ნ. სოლიმანი, [4]რ. ელალაილი, [5]ვ. დე სანკტისი

[1]პედიატრიის დეპარტამენტი, ენდოკრინოლოგიის განყოფილება, ალექსანდრიის უნივერსიტეტის ბავშვთა ჰოსპიტალი,ალექსანდრია,ეგვიპტე; [2]უელ კორნელის სამედიცინო კილეჯი და გენერალური ჰოსპიტალი ჰამადი, პედიატრიის განყოფილება, დოჰა,კატარი; [3]ჯანდაცვის სამინისტრო,ალექსანდრია,ეგვიპტე; [4]პირველადი სამედიცინო დახმარების განყოფილება, დოჰა, კატარი; [5]პედიატრიული და მოზარდთა პოლიკლინიკა, კვისისანას ჰოსპიტალი, ფერარა, იტალია

მიმოხილვის მიზანს წარმოადგენს ჰიპოფიზის დისფუნქციის მაჩვენებლების შედარებითი შეფასება ადრეული ბავშვების ასაკში და ზრდასრულ პირებში ტვინის ტრავმული დაზიანების (ტტდ) შემდეგ. გაანალიზებულია ანალოგიური სტატიები 2000 წლიდან 2015 წლის ჩათვლით. დადგენილია, რომ ტტდ-ს შემდეგ არც ისე იშვიათად ვითარდება ჰიპოფიზის აქტივობის როგორც

დროებითი, ასევე მუდმივი დაქვეითება. ტტდ-ს შემთხვევაში მაშინვე განვითარებული ჰიპოფიზის დისფუნქცია მკვეთრად განსხვავდება რამდენიმე კვირის ან თვის შემდგომ განვითარებული დისფუნქციისაგან. ხშირად ადგილი აქვს ზრდის ჰორმონის (ზჰ) უკმარისობას და ცვლილებებს პუბერტატულ ასაკში. ზოგ შემთხვევაში ტტდ-ს შემდგომი ჰიპოფიზის დისფუნქცია ამუდავნებს ტენდენციას გაუმჯობესებისაკენ ერთი წლის შემდეგ, ზოგიერთ შემთხვევაში მოსალოდნელია გაუარესება.

ზჰ-ის უკმარისობა, ასევე ჰიპოგონადიზმი და ფარისებრი ჯირკვალის დისფუნქცია წარმოადგენს ჩვეულებრივ დაზიანებებს. ენდოკრინული დეფექტების სიმპტომების უმრავლესობა – დეპრესია და აპათია, შეიძლება დარჩეს სრულიად შეუმჩნეველი ტტდ-თან დააკავშირებულ ფსიქომოტორული დეფექტების გამო. როგორც ჩანს, ჰიპოფიზის დისფუნქცია უარყოფითად მოქმედებს ფსიქონეირომოტორული პროცესის აღდგენაზე, ასევე,ბავშვების და მოზარდების ზრდასა და პუბერტატულ განვითარებაზე აღნიშნული ტრავმის შემდეგ.

რეტროსპექტული და მიმდინარე ლიტერატურის მიმოხილვის და ანალიზის შემდეგ ავტორები დაასკვნიან, რომ ტტდ-ის შედეგად არსებობს ჰიპოფიზის დისფუნქციის განვითარების რეალური რისკი. აქედან გამომდინარე, აუცილებელია სათანადო კლინიკური გამოკვლევების და სკრინინგის ჩატარება აღნიშნული დარღვევების გამოვლენის მიზნით.

ზემოაღნიშნული გამოკვლევები აუცილებელია ჩატარდეს სხვადასხვა დისციპლინის სპეციალისტების – ნეიროქირურგების, ნევროლოგების, ენდოკრინოლოგების, რეაბილიტაციური და ასაკობრივი პედიატრიის წარმომადგენელთა თანამონაწილეობით.

---

# ПРЕДИКТИВНАЯ МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ РАННИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЁННЫХ ДЕТЕЙ

**Ковалева Е.М., Похилько В.И., Чернявская Ю.И., Цвиренко С.М., Белорус А.И.**

*ВГУЗ «Украинская медицинская стоматологическая академия», кафедра педиатрии №1 с пропедевтикой и неонатологией», Полтава, Украина*

Ранние бактериальные инфекции (РБИ) у преждевременно рожденных детей – это состояния, которые имеют потенциально огромное влияние на возникновение ранних и отдаленных неблагоприятных исходов развития детей. За последние десятилетия усовершенствование акушерской и неонатальной службы способствовало значительному снижению смертности, однако практически не повлияло на частоту развития неонатального сепсиса. Между 1995 и 2005 гг. число случаев тяжелого сепсиса у новорожденных увеличилось в два раза (с 4,5 до 9,7 на 1000 новорожденных) [11], обратнопропорционально гестационному возрасту при рождении и может достигать 60% у наиболее незрелых младенцев [25]. Вероятно, улучшение показателей выживаемости детей с очень низкой массой тела при рождении [16], а также наличие полиморфизма ключевых генов, которые отвечают за формирование ответа организма при бактериальном инфицировании [1], привели к увеличению в популяции новорожденных, восприимчивых к развитию внутриутробных инфекций. Неонатальный сепсис является причиной летального исхода или тяжелой инвалидности 39% детей, даже при своевременном начале антибактериальной терапии [5]. В Украине инфекции перинатального периода, врожденная пневмония, сепсис занимают III-IV место в структуре заболеваемости и смертности новорожденных. Истинная частота данной патологии среди преждевременно рожденных детей неизвестна, так как отсутствуют четкие критерии в определении диагноза в указанной когорте детей, а также современные бактериологические методики определения культуры крови.

По сей день дискутабельным остается установление диагноза сепсиса у преждевременно рожденных детей [32], так как точность ключевых критериев сепсиса, установленных педиатрическим Консенсусом [7] не была определена в данной когорте. Симптомы и признаки сепсиса у преждевременно рожденных детей неоднородны, поэтому врачу трудно правильно и своевременно установить диагноз и оценить степень тяжести. В этих случаях возникает противоречивая дилемма в принятии решений. С одной стороны, стремление к минимизации назначения антибиотиков, а с другой - убедительные доказательства того, что своевременное введение антибиотиков спасает жизни [18].

Преждевременно рожденные дети представляют весьма гетерогенную когорту в силу особенностей течения антенатального, интранатального периодов и периода ранней адаптации. Знания достоверных факторов риска, а также биомаркеров сепсиса могут стать информационной основой для обеспечения процесса принятия решений в этой ситуации.

Изучению биохимических критериев сепсиса посвящено 3370 исследований, в которых изучалась диагностическая ценность 178 биомаркеров сепсиса, однако на сегодняшний день широко используются только два - С-реактивный белок (СРБ) и прокальцитониновый тест (ПКТ) [24]. Однако, недавно проведенный метаанализ [26] ставит под сомнение диагностическую ценность указанных маркеров, а в последующих контролируемых исследованиях ПКТ [4,15] представлены противоречивые результаты. Исходя из вышеизложенного, на сегодняшний день является актуальным поиск маркеров РБИ и, прежде всего, маркеров сепсиса у преждевременно рождённых детей с целью прогнозирования развития у них заболевания и своевременного назначения антибактериальной терапии.

Целью исследования явились анализ и идентификация факторов риска развития ранних бактериальных инфекций у преждевременно рожденных детей и разработка клинической прогностической модели с высокими диагностическими характеристиками.

**Материал и методы.** Проведено ретроспективное когортное исследование, в которое были включены 152 новорожденных с массой тела при рождении от 1000 до 2500 г, находившихся на лечении в отделениях интенсивной терапии новорожденных (ОИТН) лечебных учреждений Полтавской области в течение 2012-2013 гг. Из 152 детей 121 имел клинические и лабораторные симптомы инфицирования, которые были расценены как проявление РБИ, остальные дети (n=31) – без проявлений инфицирования. Клинические симптомы инфицирования включали наличие тахикардии, тахипноэ, десатураций, апноэ, нарушения перфузии, судорог, проявлений шока; лабораторные признаки инфицирования – количество лейкоцитов больше $20x10^9$ или меньше $5x10^9$ и повышенный уровень С-реактивного белка. Подтверждением раннего инфицирования служило наличие положительной культуры крови, однако это не являлось обязательным критерием включения в основную группу.

Рассмотрено 52 кандидата прогностических переменных, связанных с развитием РБИ (таблица 1). Выявленные достоверные факторы, ассоциированные с развитием РБИ, при простом логистическом регрессионном анализе в дальнейшем были подвергнуты множественному логистическому регрессионному анализу для идентификации достоверных факторов риска и включения их в клиническую прогностическую модель.

Уровень значимости 5% был использован, чтобы включить каждую переменную в модель. После того, как конечная модель была создана, проводились вычисления площади над ROC (receiver operating characteristic) кривой.

Постоянные переменные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки, категориальные переменные – в виде абсолютного числа и процентов. Тест Стьюдента использовали для сравнения независимых выборок и критерия $\chi^2$ для сравнения пропорций. Все статистические анализы выполнены с использованием пакета лицензированных приложений STATA v11 для Windows (StataCorp, Texac, США).

**Результаты и их обсуждение.** Информация из карт развития 152 детей, которые были включены в исследование, проанализирована с учетом определенных критериев. Средний гестационный возраст обследованных детей составил 33,14±2,27 недель, средний вес тела при рождении – 2026,9±509,13 г. Из всех исследованных факторов риска, которые могли повлиять на развитие РБИ у детей, достоверно с ними ассоциировались наличие абортов и преждевременный разрыв околоплодных оболочек у матери (таблица 2). Из факторов интранатального периода достоверными оказались продолжительность II периода родов, операция кесарево сечение вследствие дистресса плода, болезнь матери во время родов, визуальные изменения в плаценте. Среди клинико-демографических факторов достоверными оказались вес ребёнка при рождении, гестационный возраст, оценка по шкале Апгар на 1 и 5 минутах.

*Таблица 1. Определение и ранги прогностических переменных, связанных с ранними бактериальными инфекциями, у преждевременно рождённых детей*

| Прогностические переменные | Определение и ранги | Прогностические переменные | Определение и ранги |
|---|---|---|---|
| **Соматический статус матери** | | | |
| Курение | 0 - нет, 1 - да | Заболевания почек | 0 - нет, 1 - да |
| Возраст матери | годы | Сахарный диабет | 0 - нет, 1 - да |
| Патология ССС | 0 - нет, 1 - да | Заболевания щитовидной железы | 0 - нет, 1 - да |
| | | Онкопатология | 0 - нет, 1 - да |
| **Антенатальные и интранатальные факторы** | | | |
| Аборты в анамнезе | 0 - нет, 1 - да | Количество родов у матери | Ед. |
| Невынашивание беременности | 0 - нет, 1 - да | Продолжительность I периода родов | минуты |
| Мертворождения | 0 - нет, 1 - да | Продолжительность II периода родов | минуты |
| Гестоз | 0 - нет, 1 - да | Отслойка плаценты | 0 - нет, 1 - да |
| Угроза прерывания | 0 - нет, 1 - да | Обвитие пуповиной | 0 - нет, 1 - да |
| Анемия | 0 - нет, 1 - да | Кесарево сечение | 0 - нет, 1 - да |
| Фетоплацентарная недостатточность | 0 - нет, 1 - да | Кесарево сечение в связи с гестозом | 0 - нет, 1 - да |
| Многоводие | 0 - нет, 1 - да | Ягодичное или ножное предлежание | 0 - нет, 1 - да |
| Маловодие | 0 - нет, 1 - да | Многоплодная беременность | 0 - нет, 1 - да |
| Кольпит | 0 - нет, 1 - да | Болезнь матери во время родов | 0 - нет, 1 - да |
| Преждевременное излитие околоплодных вод | 0 - нет, 1 - да | Визуальные изменения в плаценте | 0 - нет, 1 - да |
| Длительность безводного промежутка | 0 - нет, 1 - да | | |
| **Медико-демографические и клинические факторы** | | | |
| Вес | граммы | Пол мужской | 0 - нет, 1 - да |
| Гестационный возраст | недели | Физическое развитие <10 перцентилей | 0 - нет, 1 - да |
| **Оценка по шкале Апгар** | | **Первичная реанимация** | |
| Оценка по Апгар на 1 мин. | баллы | Потребность в проведении | 0 - нет, 1 - да |
| | | Оксигенотерапия | 0 - нет, 1 - да |
| Оценка по Апгар на 5 мин. | баллы | Интубация трахеи | 0 - нет, 1 - да |
| | | ИВЛ | 0 - нет, 1 - да |
| **Лабораторно-биохимические показатели** | | | |
| СРБ | мг / л | Палочкоядерные нейтрофилы | % |
| | | Тромбоциты | $10^9$/л |
| Глюкоза крови | ммоль/л | Моноциты | % |
| Лейкоциты | $10^9$/л | Моноциты > 6,5% | 0 –нет, 1- да |
| Нейтрофилы | $10^9$/л | Мочевина, ммоль/л | 0 - нет, 1 - да |
| Отношение незрелых форм нейтрофилов к зрелым | Ед. | | |

*примечания: ИВЛ – искусственная вентиляция легких, ССС – сердечно-сосудистая система, СРБ – С-реактивный белок*

Что касается течения заболевания, то потребность в применении ИВЛ была у 71 (58,68%) младенца, медикаментозной поддержки гемодинамики – у 47 (38,84%). Пищевая интолерантность констатирована у 62 (51,4%) младенцев, эпизоды артериальной гипотензии – у 50 (41,2%), ранняя желтуха – у 29 (23,97%), судороги – у 9 (7,44%), олигоурия – у 8 (6,6% ) и геморрагический синдром – у 4 (3,31%) детей.

Из лабораторных показателей только СРБ и уровень моноцитов достоверно ассоциировались с развитием РБИ у преждевременно рожденных детей.

*Таблица 2. Частота отдельных факторов риска антенатального, интранатального периодов и медико-демографические характеристики детей, включенных в обследование*

| Прогностические переменные | Дети с РБИ | Дети без РБИ | ОШ 95% ДИ | p |
|---|---|---|---|---|
| Аборты, n (%) | 40 (33,06) | 4 (12,9) | 3,3 (1,09-10,17) | 0,035 |
| Продолжительность II периода родов (часов), M±m | 23,9±1,39 | 31,1±1,83 | 0,9 (0,86-0,99) | 0,037 |
| Преждевременный разрыв оболочек, n (%) | 73 (60,33) | 8 (25,81) | 4,4 (1,81-10,57) | 0,001 |
| Кесарево сечение ввиду дистресса плода, n (%) | 40 (33,33) | 5 (16,13) | 2,6 (0,92-7,19) | 0,073 |
| Болезнь матери во время родов, n (%) | 39 (32,23) | 5 (16,13) | 2,47 (0,88-6,92) | 0,085 |
| Визуальные изменения в плаценте, n (%) | 25 (20,66) | 1 (3,23) | 7,8(1,01-60,10) | 0,013 |
| Масса при рождении (граммы), M±m | 1973,9±8,36 | 2232,2±64,2 | 0,9 (0,98-0,99) | 0,014 |
| Гестационный возраст, M ±m | 32,59±0,2 | 35,19±0,19 | 0,4 (0,24-0,53) | <0,001 |
| Шкала Апгар на 1 минуте, M±m | 6,08±0,14 | 7,35±0,09 | 0,1 (0,05-0,31) | <0,001 |
| Шкала Апгар на 5 минуте, M±m | 6,77±0,10 | 7,77±0,13 | 0,3 (0,16-0,49) | <0,001 |
| **Лабораторные показатели** | | | | |
| СРБ, M±m | 7,10±0,84 | 4,28±1,10 | 1,5 (1,07-2,03) | 0,017 |
| Моноциты, M±m | 7,008±0,30 | 5,32±0,57 | 1,2 (1,03-1,35) | 0,018 |
| Моноциты >6,5 %, n (%) | 66 (54,55) | 8 (25,81) | 3,4 (1,43-8,32) | 0,006 |

*примечания: СРБ – С -реактивный белок, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал, M – медиана, m – стандартная ошибка*

*Таблица 3. Распределение переменных в пошаговой множественной логистической регрессионной модели*

| Переменные | β | m | ОШ | 95% ДИ | Площадь над ROC | % увеличения ROC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Гестационный возраст | -0,786 | 0,236 | 0,455 | 0,286-0,724 | 0,8661 | |
| Преждевременный разрыв оболочек | 0,989 | 0,609 | 2,689 | 0,815-8,871 | 0,8777 | 1,3 |
| Визуальные изменения плаценты | 1,699 | 1,410 | 5,470 | 0,345-86,74 | 0,8922 | 1,7 |
| Уровень моноцитов >6,5% | 0,944 | 0,647 | 2,571 | 0,722-9,148 | 0,9036 | 1,3 |
| Оценка по шкале Апгар на 1 мин. | -2,076 | 0,744 | 0,125 | 0,029-0,538 | 0,9370 | 3,7 |
| Аборты в анамнезе | 1,193 | 0,865 | 3,298 | 0,604-17,99 | 0,9377 | 0,1 |

*примечания: β – коэффициент регрессии; m – стандартная ошибка; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал; ROC – receiver operating characteristic*

Как представлено в таблице 2, наибольшее влияние на развитие РБИ у преждевременно рожденных детей имеют гестационный возраст, визуальные изменения плаценты, шкала Апгар на 1 минуте, уровень моноцитов больше 6,5%, аборты в анамнезе и преждевременный разрыв оболочек. Поэтому именно эти переменные включены в окончательную прогностическую модель, выбранную пошаговым множественным логистическим регрессионным анализом (таблица 3).

Полученные результаты показали, что каждая дополнительная неделя гестационного возраста уменьшает риск развития ранних инфекций (β=-0,786), а включение только одного этого фактора имеет существенное прогностическое значение (площадь над ROC кривой – 0,8661). Последующее пошаговое добавление каждой прогностической переменной увеличивает площадь над ROC и соответственно усиливает прогностические характеристики модели. Таким образом, операционные характеристики нашей финальной модели, которые включают гестационный возраст, аборты у матери в анамнезе, преждевременный разрыв оболочек, визуальные изменения плаценты, оценка по шкале Апгар на 1 минуте, уровень моноцитов >6,5% оказались достаточно высокими, а именно: чувствительность составила 82,2%, специфичность – 93,55%, положительное предиктивное значение – 97,98%, отрицательное предиктивное значение – 58%, площадь над ROC кривой – 0,9377 (рис.).

Результаты проведенного исследования показали, что клиническая картина РБИ весьма вариабельна. На неспецифические симптомы сепсиса обращают внимание и другие авторы [3,6,8,17,20]. Большинство симптомов, касающихся сердечно-сосудистой системы (тахикардия/брадикардия, гипотензия, плохая перфузия) [2,12,21,27,29], органов дыхания (апноэ, цианоз, тахипноэ, потребность в респираторной поддержке, и

увеличение кислородной поддержки) [2,10,19,29,32], ЦНС (летаргия, гипотония и судороги), изменение температуры (повышение или снижение) и проблемы с питанием указывают на наличие затруднений при постановке диагноза [2,18].

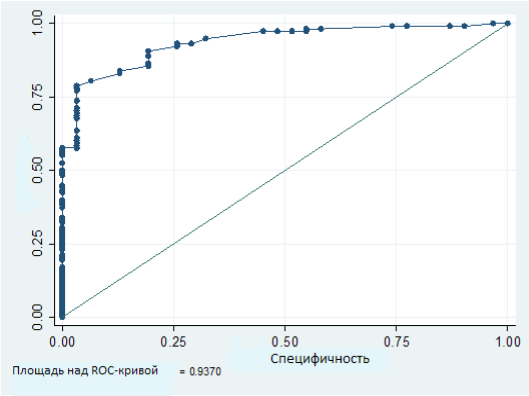



*Рис. ROC-кривая финальной предиктивной модели развития ранних бактериальных инфекций*

С полученными данными о развитии ранних инфекций у преждевременно рожденных детей достоверно ассоциируется комплекс антенатальных (преждевременный разрыв оболочек, аборты в анамнезе), интранатальных (визуальные изменения плаценты), клинико-демографических факторов (гестационный возраст ребенка, низкая оценка по шкале Апгар) и некоторые биомаркеры (уровень СРБ, моноцитов). Следует обратить внимание, что из всех биомаркеров, которые изучались в исследовании, достоверную значимость имели только СРБ и количество моноцитов, а такие широко известные маркеры как количество лейкоцитов, удельный вес незрелых клеток, низкое количество тромбоцитов особой значимости не имели. О подобных тенденциях свидетельствует и Хорник с соавт. [13,14], которые ретроспективно изучив диагностическую ценность общего количества лейкоцитов (5,000/mm$^3$ -19,000/mm$^3$), абсолютного количества нейтрофилов ($\geq$ 1,500/mm$^3$) и соотношение незрелых нейтрофилов к зрелым (<0,2) у более, чем 200 000 недоношенных и доношенных детей пришли к выводу, что указанные показатели не являются приемлемыми для идентификации детей с ранним или поздним неонатальным сепсисом. Что касается количества незрелых форм лейкоцитов, согласно результатам исследования Van der Meer et al. [23], существуют широкие внутри- и межлабораторные вариации толкований для нейтрофилов (15-72%, SD, 11%) и их незрелых форм (4-64%, SD, 11%). Большинство авторов считают целесообразным в клинический статус ребенка включить лабораторные данные, в частности, СРБ, общее количество лейкоцитов, метаболический ацидоз, соотношение незрелых лимфоцитов к их общему количеству, нейтропению, тромбоцитопению, гипергликемию или гипогликемию [2,3,10,17,18,23,24,29].

Положительная культура считается “золотым стандартом” определения инфекции, хотя культуро-позитивный клинический сепсис диагностируется весьма редко во всех возрастных группах [32]. В данном исследовании положительная культура крови обнаружена у минимального количества детей (18,5%). О подобных тенденциях пишут и другие авторы. В исследовании Garges H.P. показано, что у 38% новорожденных (ГВ меньше 34 недели) с культуропозитивним бактериальным менингитом культура крови была отрицательной [9]. Следует учитывать, что ложноотрицательный результат культуры крови может быть обусловлен низким количеством колоний бактериемии у новорожденных или их отсутствием в случае недостаточного объема крови, забранного на исследование. Поэтому, на данный момент считается, что в случае, когда ребенок имеет отрицательные посевы из крови или других локусов, однако у него имеются симптомы, указывающие на наличие инфекции, то ребенку следует ставить диагноз клинического сепсиса [32].

Разработанная нами прогностическая модель, которая показала высокие диагностические характеристики, включает информацию о материнских факторах риска, состоянии новорождённого сразу после рождения и биомаркеры инфицирования (СРБ и количество моноцитов). Поэтому считаем, что при интерпретации биомаркеров решение о назначении антибиотиков должно основываться на наличии материнских факторов риска и клинических симптомов инфекции у преждевременно рожденного ребенка, которые могут быть неспецифичными.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Знаменська Т.К., Ковальова О.М., Похилько В.І., Калюжко О.О. Асоціації між поліморфізмом GSTT1, GSTM1, GSTP1 генів у індивідуумів та схильністю їх до окремих захворювань. Перинатологія та педіатрія 2012; 3:51.
2. Auriti C., Fiscarelli E., Ronchetti M.P. Procalcitonin in detecting neonatal nosocomial sepsis. Arch Dis Child Fetal. Neonatal Ed. 2012; 97:368-70.
3. Been J.V., Rours I.G., Kornelisse R.F. Histologic chorioamnionitis, fetal involvement, and antenatal steroids: Effects on neonatal outcome in preterm infants. 2009; 201:587.
4. Bouadma L., Luyt C.E. Use of procalcitonin to reduce patients ‘exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial / PRORATA trial group. Lancet. 2010; 375:463-74.
5. Brocklehurst P., Farrell B., King A. Treatment of neonatal sepsis with intravenous immune globulin. N Engl J Me D. 2011; 365:1201-11.
6. Chaaban H., Singh K., Huang J. The role of inter-alpha inhibitor proteins in the diagnosis of neonatal sepsis. J Pediat. 2009; 154:620-2.

7. Dellinger R.P., Levy M.M, Carlet J.M. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Intensive Care Med. 2008; 34:17-60.
8. Dutta S., Levy M.M, Carlet J.M. Intrapartum antibiotics and risk factors for early onset sepsis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2010; 95:99-103.
9. Garges H.P., Moody M.A., Cotten C.M. Neonatal meningitis: What is the correlation among cerebrospinal fluid cultures, blood cultures, and cerebrospinal fluid parameters? Pediatrics. 2006; 117:1094-100.
10. Goldstein B., Giroir B., Randolph A. Consensus Conference on Pediatric Sepsis: International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005; 6:2-8.
11. Hartman M.E., Linde-Zwirble W.T., Angus D.C. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis. Pediatr Crit Care Med. 2013; 14:686-93.
12. Horan T.C., Andrus M., Dudeck M.A. CDC / NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control. 2008; 36:309-32.
13. Hornik C.P., Benjamin D.K., Becker K.C. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. Pediatr Infect Dis J. 2012; 31:799-802.
14. Jensen J.U., Hein L., Lundgren B. Procalcitonin And Survival Study (PASS) Group: Procalcitonin -guided interventions against infections to increase early appropriate antibiotics and improve survival in the intensive care unit: a randomized trial. Crit Care Med. 2011; 39:2048-58.
15. Klinger G., Levy I., Sirota L. Epidemiology and risk factors for early onset sepsis among very-low- birthweight infants. Am J Obstet Gynecol. 2009; 201(1):38.e1-6.2.
16. Kuhn P.A., Messer J., Paupe A. Multicenter, randomized, placebo-controlled trial of prophylactic recombinant granulocyte-colony stimulating factor in preterm neonates with neutropenia. J Pediatr. 2009; 155:324-30.
17. Kumar A., Roberts D., Wood K.E. Duration Of hypotension Before Initiation Of Effective Antimicrobial Therapy IS The Critical Determinant Of Survival In Human Septic Shock. Crit Care Med. 2006; 34:1589-96.
18. Madan J.C., Salari R.C., Saxena D. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2012; 97:456-62.
19. Manzoni P., Rinaldi M., Cattani S. Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology: Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: A randomized trial. JAMA 2009; 302: 1421-28.
20. Mercer B.M., Crouse D.T., Goldenberg R.L. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network: The antibiotic treatment of PPROM study: Systemic maternal and fetal markers and perinatal outcomes. Am J Obstet Gynecol. 2012; 206: 145.e1-9.
21. Mitha A., Foix-L'Hélias L., Arnaud C. EPIPAGE Study Group: Neonatal infection and 5-year neurodevelopmental outcome of very preterm infants. Pediatrics. 2013; 132:372-80.
22. Ng P.C., Ang I.L., Chiu R.W. Host-response biomarkers for diagnosis of late-onset septicemia and necrotizing enterocolitis in preterm infants. J Clin Invest. 2010; 120:2989-3000.
23. Pierrakos C., Vincent J.L. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care. 2010; 14:15.
24. Stoll B.J., Hansen N.I., Bell E.F. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network: Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. Pediatrics. 2010; 126:443-56.
25. Tang B.M., Eslick G.D., Craig J.C. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2007; 7:210-7.
26. Tita A.T., Landon M.B., Spong C.Y. Eunice Kennedy Shriver NICHD Maternal-Fetal Medicine Units Network: Timing of elective repeat cesarean delivery at term and neonatal outcomes. N Engl J Med. 2009; 360:111-20.
27. Van der Meer W., Van Gelder W., de Keijzer R. Does the band cell survive the 21st century. Eur J Haematol. 2006; 76:251-4.
28. Wu T.W., Tabangin M., Kusan R. The utility of serum hepcidin as a biomarker for late-onset neonatal sepsis. J Pediatr. 2013; 162:67-71.
30. Wynn J.L., Hansen N.I., Das A. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network: Early sepsis does not increase the risk of late sepsis in very low birth weight neonates. J Pediatr. 2013; 162: 942-8.
31. Wynn J.L., Cvijanovich N.Z., Allen G.L. The influence of developmental age on the early transcriptomic response of children with septic shock. Mol Med. 2011; 17: 1146-56.
32. Wynn J.L., Wong H.R., Shanley T.P. Time for a Neonatal-Specific Consensus Definition for Sepsis. Pediatr Crit Care Med. 2014; 15(6):523-8.

## SUMMARY

## PREDICTIVE MODEL OF EARLY BACTERIAL INFECTIONS DEVELOPMENT IN PREMATURE INFANTS

**Kovaleva E., Pokhylko V., Chernyavskaya Yu., Tsvirenko S., Belarus A.**

*Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Ukraine*

Symptoms and signs of early infection and sepsis in premature infants are varied; there are no clear criteria for the diagnosis of such conditions in this cohort. The aim of our study was to analyze and identify the risk factors for early infections in premature infants and to develop on their

basis the clinical prognostic model with high diagnostic performance. A retrospective cohort study, which included 152 premature infants, was conducted; 121 of them had the signs of early infections, 31 – had no signs of infection. 52 candidates of prognostic variables were considered. According to the results of multiple stepwise logistic regression analysis, the predictive model has been developed. It includes gestational age, visual changes of the placenta, Apgar score at the 1st minute, the level of monocytes more than 6.5%, the history of abortions and premature rupture of membranes. The diagnostic characteristics of the developed model are high: sensitivity – 82.2%, specificity – 93.55%, positive predictive value – 97.98%, negative predictive value – 58%. Therefore, when interpreting the figures of biomarkers, the decision as to the prescription of antibiotics should be based on the presence of maternal risk factors and clinical symptoms of the infection in the newborn.

**Keywords:** premature infants, intrauterine infection, early neonatal sepsis, risk factors, diagnostic markers.

## РЕЗЮМЕ

## ПРЕДИКТИВНАЯ МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ РАННИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЁННЫХ ДЕТЕЙ

**Ковалева Е.М., Похилько В.И., Чернявская Ю.И., Цвиренко С.М., Белорус А.И.**

*ВГУЗ «Украинская медицинская стоматологическая академия», кафедра педиатрии №1 с пропедевтикой и неонатологией», Полтава, Украина*

Симптомы и признаки ранних бактериальных инфекций (РБИ) и сепсиса у преждевременно рождённых детей неоднородны; четких критериев диагностики данных состояний в этой когорте не имеется. Целью исследования явились анализ и идентификация факторов риска развития ранних инфекций у преждевременно рожденных детей и разработка клинической прогностической модели с высокими диагностическими характеристиками. Проведено ретроспективное когортное исследование, в которое были включены 152 преждевременно рождённых младенца, клинические и лабораторные критерии инфицирования отмечались у 121, 31 - без признаков инфицирования. Рассмотрено 52 кандидата прогностических переменных. По результатам множественного ступенчатого логистического регрессионного анализа разработана прогностическая модель, которая включает гестационный возраст, визуальные изменения плаценты, оценку по шкале Апгар на 1 минуте, уровень моноцитов больше 6,5%, аборты в анамнезе и преждевременный разрыв околоплодных оболочек. Диагностические характеристики разработанной модели высокие: чувствительность - 82,2%, специфичность - 93,55%, положительное предиктивное значение - 97,98%, отрицательное предиктивное значение - 58%. Следовательно, при интерпретации показателей биомаркеров решение о назначении антибиотиков должно основываться на наличии материнских факторов риска и клинических симптомов инфекции у новорожденного.

## რეზიუმე

## ადრეული ბაქტერიული ინფექციის განვითარების პრედიქტული მოდელი დღენაკლულ ახალშობილებში

ე. კოვალიოვა, ვ. პოხილკო, იუ. ჩერნიავსკაია, ს. ცვირენკო, ა. ბელორუსი

უმაღლესი სახელმწიფო სასწავლო დაწესებულება «უკრაინის სამედიცინო სტომატოლოგიური აკადემია», პედიატრიის კათედრა №1 პროპედევტიკით და ნეონატოლოგიით, პოლტავა, უკრაინა

დღენაკლულ ახალშობილებში ბაქტერიული ინფექციის და სეფსისის სიმპტომები და ნიშნები მრავალფეროვანია. აღნიშნული მდგომარეობის დიაგნოსტიკის ზუსტი კრიტერიუმები ამ კოჰორტაში არ არსებობს. აქედან გამომდინარე, კვლევის მიზანს წარმოადგენდა დღენაკლულ ახალშობილებში ადრეული ინფექციის განვითარების რისკის ფაქტორების ანალიზი, იდენტიფიკაცია და აღნიშნულის საფუძველზე კლინიკური პროგნოზული მოდელის შემუშავება მაღალი დიაგნოსტიკური მახასიათებლებით. ჩატარებულია პროსპექტული და კოჰორტული გამოკვლევა, რომელშიც ჩართული იყო 152 დღენაკლული ახალშობილი, ამათგან 121 ბავშვს აღენიშნა ინფიცირების კლინიკური და ლაბორატორიული კრიტერიუმები, 31-ს ინფიცირების ნიშნები არ აღმოაჩნდა. განხილულია პროგნოზული ცვლილებების 52 კანდიდატი.

მრავალრიცხოვანი საფეხურებრივი ლოგისტიკური რეგრესიული ანალიზის შედეგად შემუშავებულია პროგნოზული მოდელი, რომელშიც გათვალისწინებულია გესტაციური ასაკი, პლაცენტის ფიზიკალური ცვლილებები, აპგარის შკალის შეფასება პირველ წუთზე, მონოციტების დონე 6,5%-ზე მეტი, აბორტი ანამნეზში და პლაცენტის დაზიანება. შემუშავებული მოდელის დიაგნოსტიკური მახასიათებლები საკმაოდ მაღალია: მგრძნობელობა - 82,2%, სპეციფიკურობა - 93,55%, დადებითი პრედიქტული მნიშვნელობა - 97,98%, უარყოფითი პრედიქტული მნიშვნელობა - 58%. ამგვარად, ბიომარკერების მაჩვენებლების ინტერპრეტაციის დროს ანტიბიოტიკების დანიშვნის გადაწყვეტილება უნდა მიღებულ იქნას დედის რისკის ფაქტორების და ახალშობილის ინფექციის კლინიკური სიმპტომების გათვალისწინებით.

# МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ТЕРАПИИ (ОБЗОР)

**Арведадзе Г.А., Геладзе Н.М., Хачапуридзе Н.С., Бахтадзе С.З., Капанадзе Н.Б.**

*Тбилисский государственный медицинский университет, департамент детской неврологии;*
*Медицинский центр "Medihelp", Тбилиси, Грузия*

Одной из значительных междисциплинарных проблем современной неонатологии и педиатрии являются митохондриальные болезни – группа таких патологических состояний, которые обусловлены клеточной энергетической недостаточностью ввиду нарушения биохимических процессов в митохондриях. В свою очередь нарушения клеточной энергетики приводят к полисистемным заболеваниям, страдают органы и ткани, наиболее энергозависимые – нервная система (энцефалопатии, полиневропатии), мышечная система (миопатии), сердце (кардиомиопатии), почки, печень, эндокринная система и другие органы [5,14,18,19,22,32,35].

Повреждение митохондрий возникает ввиду воздействия реактивных форм кислорода. Считается, что большинство реактивных форм кислорода образуется комплексами I и III, вследствие высвобождения электронов под воздействием коэнзимов в цепи передачи электронов. Митохондрии используют приблизительно 85% кислорода, потребляемого клеткой в процессе образования АТФ и вследствие нормального процесса окислительного фосфорилирования 0,4-4,0% употребляемого кислорода превращается в митохондриях в супероксидные радикалы ($O_2$) [5,31,45].

Супероксид трансформируется до пероксида водорода ($H_2O_2$) с помощью ферментов детоксикации – марганцевой суперкосиддисмутазы или цинк/медь-супероксиддисмутазы, а затем до воды - с помощью глутатионпероксидазы или пероксидредоксина III. Однако, если эти ферменты не способны достаточно быстро конвертировать реактивные формы кислорода, такие как супероксид-радикал, до воды, происходит оксидативное повреждение, которое аккумулируется в митохондриях.

В митохондриях элементами, особенно подверженными воздействию свободных радикалов, являются липиды, белки, окислительно-восстановительные ферменты и митохондриальная ДНК. Повреждение митохондриальных белков снижает их аффинность к субстратам или коферментам и, таким образом, нарушает их функцию. Однако, в случае повреждения митохондрии, их функция может быть скомпрометирована ростом потребностей клетки для процессов репарации энергии. В свою очередь митохондриальная дисфункция может привести к цепному процессу, при котором митохондриальное повреждение влечет за собой дополнительное повреждение [12,24,33,35].

В настоящее время известен диапазон на вид несвязанных заболеваний, от психических до эндокринных, которые имеют в своей основе общие патологические механизмы, а именно - митохондриальную дисфункцию, образование реактивных форм кислорода и накопление повреждений в митохондриальной ДНК.

На современном этапе выявлено более 200 заболеваний, причиной которых являются мутации митохондриальной ДНК. В то же время известно, что митохондриальные болезни обусловлены как патологией митохондриального, так и ядерного генома.

Основные митохондриальные заболевания связаны с точечными мутациями ДНК и наследуются по материнской линии (MERRF, MELAS, NARP, MHGIF), другие же обусловлены делециями или дупликациями (крупными перестроками митохондриальной ДНК), носят спорадический характер и не передаются потомству

Заболевания, обусловленные мутациями митохондриальной ДНК, характеризуются выраженным полиморфизмом клинических симптомов и вариабельностью течения.

Изучая признаки болезней и синдромов, связанных с нарушениями клеточной энергетики, ученые пришли к выводу, что распространенность состояний, связанных с митохондриальной дисфункцией не ограничивается только наследственными синдромами, вызываемыми мутациями генов, непосредственно ответственных за митохондриальные белки. Они могут проявляться в виде самостоятельного заболевания, что осложняет течение других болезней (как вторичные митохондриальные нарушения).

Впервые митохондриальные болезни описаны Luft et al. [26], когда обследовали 35-летнюю женщину с эутироидным состоянием, миопатией, чрезмерным потоотеделением, нетолерантностью к высокой температуре, полидипсией с полиурией и базовой скоростью метаболизма - 180% от нормы. Пациентка страдала от разобщения процессов окислительного фосфорилирования, которое является основным путем получения энергии в клетке. Энергия в форме АТФ образуется в митохондриях в процессе реакций, в которых электроны, высвобождающиеся из восстановленных субстратов никотинамидадениндинуклеотида и флавинадениндинуклеотида, поставляются на кислород по цепи респираторной протоновой

помпы. Это приводит к образованию тепла без соответствующего образования АТФ и влечет за собой дисфункцию общего состояния пациентки. В целях компенсации ее митохондрии увеличиваются в размере и умножаются, что отчетливо наблюдалось при анализе гистологической мышечной биопсии. После этого впервые опубликованного случая было отмечено, что митохондриальная дисфункция свойственна почти всем патологическим и токсикологическим состояниям. Однако, ввиду того, что симптомы варьируют от случая к случаю, в зависимости от возраста и начала заболевания, а также от скорости прогрессирования, митохондриальные дисфункции могут оказаться сложными для диагностирования при первом проявлении [1,7,10,12,24,33].

Ведущими неврологическими синдромами при заболеваниях, обусловленных мутациями митохондриальной ДНК, являются миопатический симптомокомплекс (непереносимость физических нагрузок, мышечная слабость, снижение мышечного тонуса), судороги, мозжечковый синдром (атаксия, интенционный тремор), поражение глазодвигательных нервов (птоз, наружная офтальмоплегия), полиневропатия.

Симптомы митохондриальной недостаточности часто носят неспецифический характер, затрудняя их раннюю диагностику. У маленьких детей заболевание начинается с отставания статикомоторных функций и/или психоречевого развития, появления слабости, утомляемости, дискоординации движений. Клиническая картина заболевания у детей приобретает черты так называемой митохондриальной энцефаломиопатии (мышечная слабость, гипотония, низкая переносимость физических нагрузок, судороги, миоклонические подергивания, миалгия). У детей старшего возраста регистрируют приступы мигрени, головокружения, инсультоподобные эпизоды, птоз и офтальмоплегию. Отмечается снижение зрения, слуха, эндокринные расстройства.

О наличии митохондриальной патологии у детей могут свидетельствовать миоклонические или мультифокальные судороги резистентные к антиконвульсантам, черепно-лицевой дизостоз, дисметаболические проявления и дыхательные нарушения, вовлечение в патологический процесс ЦНС, мышц, сердца, печени, почек, а также прогрессирующее течение заболевания.

Абсолютным критерием диагноза митохондриальной болезни являются результаты молекулярно-генетического исследования митохондрии ДНК с выявлением конкретных мутаций. В тоже время более доступными являются биохимические тесты (лактат-пируват-ацидоз), а также биопсия скелетных мышц с проведением специфических гистохимических реакций, выявление феномена «рваных красных волокон».

Классификация митохондриальных болезней основана на молекулярно-генетических данных, однако на практике применяется клинико-синдромологический подход. Трудности клинической диагностики связаны с мультисистемным поражением и выраженным фенотипическим полиморфизмом [2,10,11,15,20,21].

Известно, что значимым критерием диагностики митохондриальной дисфункции является повышение уровня лактата и пирувата в крови. Важность своевременной диагностики лактат-ацидоза, а также возможного наличия митохондриальной патологии, поиск клинических и лабораторных критериев этих заболеваний необходим для подбора адекватной терапии и предотвращения дальнейшего прогрессирования.

Ввиду того, что клинический полиморфизм митохондриальной дисфункции проявляется в виде различных синдромов поражения нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, с поражением печени и почек, желудочно-кишечных расстройств, нарушения зрения и слуха, возникает необходимость разностороннего обследования таких пациентов. Оно включает помимо клинического обследования - соматического, неврологического и эндокринологического статуса, офтальмологическое, аудиографическое, электронейромиографическое, ЭЭГ, кардиологическое исследования, при необходимости, проведение CT и MRT головного мозга.

Понятие - митохондриальная дисфункция - новый термин, примененный для объяснения нарушений синтеза энергии в клетке при разных патологических состояниях, которые, в свою очередь, отражают подавление активности ферментов различных участков митохондриальной дыхательной цепи и сопровождаются широким спектром функционально-метаболических нарушений, в том числе и со стороны нервной системы. В настоящее время установлена последовательность инактивации этих ферментов на разных стадиях патологического процесса. Одним из наиболее уязвимых его звеньев является перенос электронов от первого к третьему ферментному комплексу митохондриальной дыхательной цепи. Причинами нарушения этого процесса могут быть дисфункция самого первого ферментного комплекса, развивающаяся как неспецифическая реакция на ранних стадиях любой патологии, либо дефицит коэнзима $Q_{10}$ (Co $Q_{10}$) - переносчика электронов на этом участке, либо и то и другое. Все это делает особо актуальной проблему фармакологической коррекции нарушений энергетического аппарата клетки, а также поиск так называемых энерготропных средств, т. е. веществ, способствующих восстановлению функции дыхательной цепи, а следовательно и аэробного синтеза энергии [7].

К ним, прежде всего, относятся вещества, имеющие в структуре хиноновые радикалы, обладающие окислительно-восстановительными свойствами, которые, играя роль акцептора или переносчика восстановительных эквивалентов, могут формировать шунтирующие пути переноса электронов на поврежденном участке и, таким образом, осуществлять их взаимодействие с дыхательной цепью. Среди таких веществ на первом месте стоят природные коэнзимы Q, а также их синтетические производные с увеличенной биодоступностью [7,9,10,14,25,34,37,39,42].

Как отмечает большинство исследователей, эффективное лечение митохондриальных болезней остается нерешенной проблемой. Это связано с несколькими факторами: трудности ранней диагностики, недостаточная изученность отдельных звеньев патогенеза болезней, редкость некоторых форм патологии, тяжесть состояния больных в связи с мультисистемностью поражения. Затрудняет оценку проводимого лечения и отсутствие единого взгляда на критерии эффективности терапии.

Пути медикаментозной коррекции базируются на достигнутых знаниях патогенеза отдельных форм митохондриальных болезней. Основные лечебные мероприятия направлены на оптимизацию процессов биологического окисления, тканевого дыхания и коррекцию дефицита отдельных метаболитов, развивающегося при митохондриальных дисфункциях.

J. Finsterer et al [22] отмечают, что в настоящее время для лечения заболеваний протекающих на фоне митохондриальной дисфункции применяют только симтоматическую терапию, которая подразумевает медикаментозную терапию, переливание крови, гемодиализ, инвазивные методы, хирургическое вмешательство, диету и физиотерапию. Под медикаментозной терапией подразумевается специфическая терапия (при эпилепсии, головных болях, деменции, дистонии, экстрапирамидных симптомах, паркинсонизме, пароксизмальных проявлениях) и неспецифическая терапия (антиоксиданты, кофакторы, электрон-доноры, источники альтернативной энергии) или ограничение тех медикаментов, которые известны своим токсическим воздействием на митохондриальную функцию, и часто проявляются в виде побочных эффектов (стероиды, статины, фибраты, нейролептики и антиретровирусы). Инвазивные методы включают пейсмекеры, имплантацию бивентрикульных пейсмейкеров или стент-терапию. Что касается диеты, то она применяется при диабете, гиперлипидемии или имплантирование дефибриляторы или эпилепсии (кетогенная диета).

Обязательным условием терапии авторы считают ее индивидуальность и, несмотря на ограниченные возможности, симптоматическое лечение в каждом отдельном случае. В терапию помимо выше перечисленных факторов входят: антиоксиданты (хиноны, витамины Е, липовая кислота, стероиды, витамин С, глютатион); препараты снижающие лактат-бикарбонаты, дихлорацетат; электрондоноры – рибофлавины, сукцинаты, хиноны; источники альтернативной энергии - креатин-гидрохлорид, кофакторы – L аргинин, L-камитин, аспартат, тиамин, фолиевая кислота и др. витамины.

Авторы рекомендуют также каузальную-этиологическую терапию – стволовыми клетками и генетическую терапию.

Известно, что одним из наиболее частых, первичных клинических проявлений синдрома MELAS-является церебральный инсульт гипоксически-ишемического типа, с наличием на MRT диффузной патологии в виде очагов инфаркта, фокальных атрофических корковых очагов и т.д.

Лечение ишемического инсульта детского возраста представляет собой весьма серьезную проблему. Согласно рекомендации Американской ассоциации инсульта (2008 г., 2009 г.), в случае потери сознания, ребенок должен быть переведен в специализированный центр, где будут приняты срочные меры по первичной диагностике. Необходимо правильно соблюдать принципы срочного вмешательства, и, в первую очередь, уделять внимание вентиляции, циркуляции и своевременной антиконвульсантной терапии. Компьютерную томографию необходимо применять до транспортировки. Отмечено, что не существует рандомизированных, контролируемых исследований ведения терапии детских инсультов, в тоже время в детском возрасте не рекомендуется тромболиз, ввиду опасности развития геморрагии [27].

В некоторых случаях детям с высоким риском рецидивов инсульта необходимо проведение интервенционных нейрорадиологических процедур, таких как коилы или стенты, однако эти методы не всегда доступны. Это относится и к васкулярной нейрохирургии, такой как резекция аневризмы, клипинг, или стереотаксическая радиотерапия с целью облитерации артериовенозных нарушений. В случае, когда пациент находится в глубокой коме, посредством своевременного проведения хирургической декомпрессии возможно спасение его жизни.

Первые международные рекомендации относительно ведения детских инсультов (Pediatric Stroke Working Group, 2004) [34], в основном, опираются на весьма малочисленные педиатрические обследования, и в них представлена экстраполяция терапевтических

подходов взрослого контингента [2,9,11,28]. Тем не менее, основываясь на гайдлаины EPND, а также опыт ведущих неврологических педиатрических клиник, рекомендациями по лечению ишемического инсульта на современном этапе являются: установить правильный режим питания с интервалом 3 часа; уменьшить количество потребляемых жиров и увеличить углеводы; потребление большого количества жидкости как per os, так и интравенно; при наличии судорог правильный подбор группы антиконвульсантов с их последующим длительным приемом; постоянный прием кардиоаспирина не менее 20 мг в день (контроль коагулограмы); аскорбиновая кислота, витамин Е; кортикостероиды до 3 г в день (преднизолон, гидрокортизон, медрол); липоевая кислота; L-карнитин (кардитон от 100-150 мг/кг); идебенон от 40-250 мг в день. Препараты уменьшающие степень лактат-ацидоза- дихлорацетат, димефосфон [4,9,13,16,17,23,25].

При возникшей сочетанной кардионеврологической патологии применяют неотон 50-100мг внутривенно, в сочетании с тиотриазолином 1,0-2,0 мл внутримышечно в течение 10 дней. Из антиконвульсантов при синдроме MELAS рекомендуется кеппра (леветирацетам) или карбамазепин, при синдроме MERRF также – кеппра с параллельным приемом карниэля и коэнзима.

С.К. Евтушенко [2] опираясь на мировой и собственный опыт, заключает, что сегодня проблема инсультов у детей является междисциплинарной и формируется на стыках детской неврологии, кардиологии, ангиологии, нейрохирургии и патологии свертывающей системы крови. По мнению автора, рост цереброваскулярной патологии неизбежен. Не исключено, что ее увеличение произойдет и в связи с внедрением программы по стимуляции репродуктивной функции «500 г - жизнеспособный плод», а также внедрением новых технологий по выхаживанию новорожденных и применению интенсивных методов терапии, что, по всей вероятности, увеличит риск заболеваний нервной системы не только у детей, но в последующем и у взрослых. Проблема ангионеврологии становится не только междисциплинарной, но и возрастзависимой. Терапия больных с любым видом инсульта должна осуществляется реаниматологом, кардиологом и детским неврологом [2]. Таким образом, детская кардионеврология становится новым и необходимым направлением в педиатрии.

Ранняя диагностика митохондриальной дисфункции, а также таких синдромов как MELAS, затруднена, так как полное проявление специфического симптомокоплекса происходит обычно спустя определенное время после манифестации начальных проявлений болезни. Поэтому подросткам и молодым лицам, у которых наблюдаются церебральные эпизоды, клинически похожие на ишемические инсульты с атипичным течением, а также судорожный синдром неясной этиологии или мигренеподобные головные боли с рвотой в сочетании с признаками поражения других органов и тканей, следует проводить исследование крови на содержание молочной и пировиноградной кислоты и электронейромиографию. Эти методики можно считать скрининговыми тестами для выявления митохондриальной патологии, на основании которых должен решаться вопрос о биопсии скелетной мышцы и ДНК диагностике.

Лечение митохондриальных миопатий также проблематично ввиду мультисистемного поражения и тяжести общего состояния больных. Рекомендации касаются применения производных убидекаринона (убиквинон, коэнзим Q-в дозе от 60 до 250 мг в день, а также применения кортикостероидов до 3 г в день, дихлорацетат до 10 г в день, карнитин 6 г в день, витамины группы В, С, К). Показана диета, богатая антиоксидантами и повышающая содержание глутатиона.

Резюмируя данные исследователей, работающих с данной проблемой, следует заключить, что современные аспекты терапии митохондриальных заболеваний заключаются в повышении эффективности процессов окислительного фосфорилирования на системном уровне. Основные принципы лечебной тактики митохондриальной дисфункции при различных неврологических синдромах включают:
- диету с ограничением содержания углеводов до 10г/кг;
- назначение препаратов, способствующих переносу электронов в дыхательной цепи (коэнзим Q10, идебенон, витамины $K_1$ и $K_3$, янтарная кислота, цитохром С);
- введение кофакторов, учавствующих в энзимных реакциях энергетического обмена (никотинамид, рибофлавин, карнитин);
- применение по показаниям средств, уменьшающих степень лактат-ацидоза (димефосфон, дихлорацетат, 2-хлорпропионат);
- антиоксидантная терапия (аскорбиновая кислота, витамин Е);
- сопутствующая и симптоматическая терапия (при необходимости – противосудорожные и антидиабетические препараты, искусственная вентиляция легких, перитонеальный диализ, гемотрансфузии);
- исключение препаратов, способных ингибировать энергетический метаболизм (препараты вальпроевой кислоты, барбитураты, хлорамфеникол).

Такая комплексная терапия у 70% больных с выявленной митохондриальной дисфункцией приводит к стабилизации состояния и уменьшению лактат-ацидоза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глоба О.В. с соавт. Клинический полиморфизм митохондриальной дисфункции у детей. Журнал медико-биологическая наука 2008; 4: 52-53.

2. Евтушенко С.К. Инсульты у детей (клиника, диагностика, лечение): Метод. реком. 2000; 35.
3. Евтушенко С.К., Перепечаенко Ю.М. Рецидивирующий метаболический инсульт у детей, обусловленный MELAS-синдромом. Мат-лы международ. науч. практ. конф. "Неординарные (раритетные) синдромы и заболевания нервной системы у взрослых и детей". Донецк. Святогорск: 2003; 97-100.
4. Евтушенко С.К. Инсульты у детей. Современная педиатрия 2010; 3(31): 175-182.
5. Зозуля Ю.А., Черненко А.П. Митохондриальные заболевания ЦНС. Украина 2002; 5: 17-22.
6. Иллариошкин С.Н., Ершова М.В. Митохондриальная дисфункция у детей с печеночными формами глюкогеновой болезни. Consilium medicum 2007; 8: 105-106.
7. Лукьянова Л.Д. Новые возможности коррекции митохондриальной дисфункции в лечении неврологических заболеваний. Consilium medicum 2013; 9(8): 104-105.
8. Николаева Е.А. с соавт. Миоклонус эпилепсия с разорванными красными мышечными волокнами. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2012; 7: 84-88.
9. Сухоруков В.С. Актуальные вопросы лечения митохондриальных нарушений. Росс. вестник перинатологии и педиатрии 2013; 9(2): 72-75.
10. Сухоруков В.С., Николаева Е.А. Современная диагностика митохондриальных болезней у детей. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2007;4: 11-21.
11. Темин П.А., Никанорова М.Ю. Митохондриальная энцефалопатия, миопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные эпизоды (Обзор литературы). Рос. вестник перинатологии и педиатрии 1995; 6: 24-29.
12. Aicardi J. et al. Diseases of the Nervous System in childhood, 3rd edition. London: Mac Keith Press; 2009.
13. Biller J. Stroke in Children and Young adults. Second Editions. J.Biller. Printed in USA-Philadelphia:2009; 343.
14. Chinnery, Turnbull D.M. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. Am. J. Med. Genet. 2001; 106:94-101.
15. Dc Mauros et al. Mitochondrial encephalomyopathies: diagnostic approach. A nm. NY Acad. Sci. 2004; 1011:217-31.
16. De Veber G., Andrew M. Cerebral sinovenous thrombosis in children. Canadian Pediatric Ischemic Stroke Study Group. N. Engl. ed., 2001; 417-423.
17. De Veber G. Canadian Pediatric Ischemic Stroke Registry (Abstract) Paediat, Child Health. 2000; 17.
18. Di Mauro S. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic-acidosis and stroke-like episodes. Neuromusc. Disorders 2000; 2; 125-35.
19. Di Mauro S., Schon E. A., Rwoland L. P. Mitochondrial encephalopathies: diseases of mitochondrial DNA. Merritt's Textbook of Neurology. Ed. by L.P. Rowland, 9-th Ed. Philadelphia: 1995; 615-618.
20. Di Mauros, Schon E. A. Mitochodnrial respiratory-chain diseases. N. Engl. J. Med. 2003; 348(26): 2656-2668.
21. Fattal O. et al. Review of the literature on major mental disorders in adult patient with mitochondrial diseases. Psychosomatics. 2006; 47(1): 1-7.
22. Finsterer et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. Eur. J. Neurology 2009.
23. Fullerton H.J., Johnston S.C., Smith W.S. Arterial dissection and stroke in children. Neurology 2001; 57: 1155-1160.
24. Garsia-Casosiva A. et al. Long-term follow -up of Neonatal Mitochondrial Cytopathies: A Study of 57 Patient. Metabolic DIseases 2002; 3: 100-5.
25. Gruber A., Nasel C., Lang W. et al. Intra-arterial thrombolysis for the treatment of perioperative childhood cardioembolik stroke. Neurology 2000; 54: 1684-1686.
26. Luft R. et al. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical. Biochemical and Morphological Study Dininvest 1962; 41:1776-1804.
27. Managle P., Chan A., Massicotee P. et al. Antithrombotic therapy in children: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest. 2004; 126 (Suupl. 3): 645-687.
28. Management of Stroke in infants and Children. A Scientific Statement from a Special Writing Group of the American Heart Association Stroke Counsil on Cardiovascular Diseases in the Young. Stroke 2008; 39: 2644-2774.
29. Molinari F. et al. Impaired mitochondrial glutamate transporte in outosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. Amer. J. Hum. Genes. 2005; 76: 334-9.
30. Moncuso M. et al. Mitochondrial myopathy of childhood Associated with mitochondrial DNA Depletion and a Homozygous Mutation (T77M) in the TK2 Gene. Arch. Neurologic 2003; 60:1007-9.
31. Muller M. et al. Long-term tracking of neurological complication of encephalopathy and myopathy in a patient with nephropatic cystinosis: a case reperat and review of the literature. J. Med. Case Reports 2008; 2: 235.
32. Neustadt J., Mitochondrial disfunctions and diseases. Integrative Medicine 2006; 53: 14-20.
33. Nelson A. Textbook of pediatrics Mitochondrial Encephalopathies. 18th edition. 2007; 2496-99.
34. Paediatric Stroke Working Group. Stroke in childhood: clinical guidlines for diagnosis, management and rehabilitation, 2004, London: Royal College of Physicians www.replondon.ac.uk/pubs/books/child stroke.
35. Robinson B.H. Lactic acidemia and mitochondrial disease. Med. Genet. Metab. 2006; 89: 3-13.
36. Rose M.R. Mitochondrial Myopathies Genetic Mechanisms. Arch. Neurol. 1998; 55:17-24.
37. Scarpoole P.W., Kerr DS., Barnes C. et al. Controlled clinical trial of dichloracetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. Pediatrics 2006; 117: 1519-31.
38. Schon E.A., Manfredi G. Neonatal degeneration and mitochondrial dysfunction and mitochondrial dysfunction. J. Clin. Invest. 2003; 111(3) 303-312.

39. Sim K. G. et al. Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid, oxidantion disorders. Clin. Chim. Acta 2002; 323:37-58.
40. Simon D.K., Johns D.R. Mitochondrial disorders: Clinical and Genetic Features. Annual Review of Medicine. 1999; 50: 111-127.
41. Sue C. et al. Neonatal presentatous of mitochondrial metabolic disorders. Pediatrics 2000; 116(5): 1170-77.
42. Szewczuk A., Wojtczak L. Mitochondrial as a pharmacological target. Pharmacol. Rev. Mar. 2002; 54(1) 101-127.
43. Wallace D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative disease. aging and cancer. Ann. Rec. Genet. 2005; 39(1):359-407.
44. Wolf N.L., Smeitink J.A. Mitochondrial disorders a proposal for consensus diagnostic sriteria in infants and children. Neurology 2002; 59: 1402-5.
45. Zeiram M.D., Donato S. Mitochondrial disorders. Brains 2004; 127: 2153-72.

## SUMMARY

## MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION: MODERN ASPECTS OF THERAPY (REVIEW)

**Arveladze G., Geladze N., Khachapuridze N., Bakhtadze S., Kapanadze N.**

*Tbilisi State Medical University, Department of Pediatric Neurology; Medical Center "Medihelp", Tbilisi, Georgia*

Mitochondrial diseases are considered as one of the major problems of modern interdisciplinary neonatology and pediatrics.

Mitochondrial pathology can be revealed as refractory myoclonic or multifocal seizures, craniofacial dysostosis, dysmetabolic manifestations and respiratory disorders. Central nervous system (CNS), muscles, heart, liver and kidneys is involved in this pathological process.

An important criterion for diagnosis of mitochondrial dysfunction is increases in blood lactate and pyruvate levels; the absolute criterion - molecular genetic diagnostic studies of mitochondrial DNA.
Polymorphism of clinical symptoms complicates the process of early diagnostics, the lack clear recommendations complicates therapy.

Modern aspects of treatment of mitochondrial dysfunction in various neurological syndromes are based primarily in improving the efficiency of the processes of oxidative phosphorylation at the system level.

Dietary carbohydrate restriction, and medication (Coenzyme Q10, Idebenonum, Cofactors, drugs which reduce lactic acidosis- Dimephosphon, Dichloroacetate, Antioxidants, Anticonvulsants and Antidiabetic agents, vitamins C, E, K, hemotransfusions) is prescribed.

Such complex approach allows us to achieve a reduction in lactate-acidosis, and improve the condition of patients in 70% of cases.

**Keywords:** mitochondrial dysfunction, lactic acidosis, neurological syndromes, therapy.

## РЕЗЮМЕ

## МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ТЕРАПИИ (ОБЗОР)

**Арведадзе Г.А., Геладзе Н.М., Хачапуридзе Н.С., Бахтадзе С.З., Капанадзе Н.Б.**

*Тбилисский государственный медицинский университет, департамент детской неврологии; Медицинский центр "Medihelp", Тбилиси, Грузия*

Одной из значительных междисциплинарных проблем современной неонатологии и педиатрии являются митохондриальные болезни – группа таких патологических состояний, которые обусловлены клеточной энергетической недостаточностью вследствии нарушения биохимических процессов в митохондриях.

Митохондриальная патология может проявляться в виде рефрактерных миоклонических или мультифокальных судорог, черепно-лицевого дизостоза, дисметаболических проявлений и дыхательных нарушений, а также вовлекать в патологический процесс ЦНС, мышцы, сердце, печень, почки.

Важным критерием диагностики митохондриальной дисфункции является повышение уровня лактата и пирувата в крови, а абсолютным критерием – молекулярно-генетические исследования митохондрии ДНК.

Полиморфизм клинических симптомов осложняет своевременную диагностику, а отсутствие четких рекомендаций затрудняет терапию.

Современные аспекты терапии митохондриальной дисфункции при различных неврологических синдромах основаны в первую очередь на повышении эффективности процессов окислительного фосфорилирования на системном уровне. Назначается диета с ограничением углеводов, препараты коэнзим Q10, идебенон, кофакторы, препараты снижающие лактат-ацидоз-димефосфон, дихлорацетат, антиоксиданты, антиконвульсанты и антидиабетические средства, витамины С, Е, К, гемотрансфузии. Такой комплексный подход позволяет добиться уменьшения лактат-ацидоза, а также улучшения состояния пациентов в 70% случаев.

რეზიუმე

მიტოქონდრიული დისფუნქცია: თერაპიის თანამედროვე ასპექტები (მიმოხილვა)

გ. არველაძე, ნ. გელაძე, ნ. ხაჭაპურიძე, ს. ბახტაძე, ნ. კაპანაძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ბავშვთა ნევროლოგიის დეპარტამენტი; სამედიცინო ცენტრი "Medihelp", თბილისი, საქართველო

მიტოქონდრიული დაავადებები თანამედროვე ნეონატოლოგიის და პედიატრიის მნიშვნელოვანი პრობლემაა, განპირობებული უჯრედოვანი ენერგეტიკული უკმარისობით მიტოქონდრიებში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესების დარღვევის შედეგად.

მიტოქონდრიული დისფუნქციის დიაგნოსტიკის მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს სისხლში ლაქტატის და პირუვატის დონის მატება, ხოლო მიტოქონდრიული დნმ-ის მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევა დიაგნოსტირების აბსოლუტური კრიტერიუმია.

კლინიკური სიმპტომების პოლიმორფიზმი ართულებს მიტოქონდრიული დაავადებების დროულ დიაგნოსტიკას, ხოლო მკაფიო რეკომენდაციების არარსებობა ართულებს თერაპიის მართვას. მიტოქონდრიული დისფუნქციის თერაპიის თანამედროვე ასპექტები სხვადასხვა ნევროლოგიური სინდრომის დროს, პირველ რიგში, ეფუძნება ჟანგვითი ფოსფორილირების პროცესის გაუმჯობესებას სისტემურ დონეზე. ინიშნება დიეტა ნახშირწყლების შეზღუდვით, კოენზიმ Q10-ის პრეპარატები, იდებენონი, კოფაქტორი, ლაქტატ-აციდოზის დონის შემამცირებელი პრეპარატები - დიმესფონი, დიქლორაცეტატი, ასევე ანტიოქსიდანტები, ანტიკონვულსანტები და ანტიდიაბეტური პრეპარატები, ვიტამინები C, E, K, ჰემოტრანსფუზია. ასეთი კომპლექსური მიდგომით შემთხვევათა 70%-ში მცირდება ლაქტატ-აციდოზის დონე და პაციენტების ზოგადი მდგომარეობა მნიშვნელოვნად უმჯობესდება.

---

# ACELLULAR HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE AS A THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLD FOR THE TREATMENT OF MUCOGINGIVAL DEFECTS

**[1,2]Karalashvili L., [1,2]Kakabadze A., [3]Vyshnevska G., [1]Kakabadze Z.**

*[1]Tbilisi State Medical University; [2]Ilia State University, Tbilisi, Georgia;*
*[3]Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine*

In clinical practice, the application of human amniotic membrane has been recently started in the following spheres: plastic surgery, management of skin burns, ophthalmology and maxillofacial surgery [7,13,16,24]. However, in the field of dentistry, there are only a limited number of reports. Multiply conducted studies have shown, that amniotic membrane has low immunogenicity and immunomodulative features, has the ability to generate IL-1 alpha and IL-1 beta antagonist, IL-10 and metalloproteinase inhibitor which stipulates anti-inflammatory features of the amniotic membrane [11,21,26], the production of the beta defensin and elapine provides it with antimicrobial features [2,14] and it also reinforces vascularization or revascularization process [2,11,14,15,21,26,29,30]. Amniotic membrane possesses analgesic and anti-fibrotic, anti-scar formation features [13]. It is also noteworthy, that placenta and its components contain I, IV, V, VII and XVII type collagens, Laminine-1, Laminine-5, elastin, proteoglycans, adhesion proteins and fibronectin [3,9]. Beside the entire above mentioned, placenta generates growth factors such as: epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor-b (TGF-b) [8].

This study was conducted to evaluate the usefulness of decellularized and lyophilized extracellular matrix, which was acquired from human amniotic membrane, for surgical closure of the mucogingival defects.

**Materials and methods.** *The method of obtaining decellularized and lyophilized amniotic membrane from human placenta*

The study was conducted on 3 full-term placentas from donors who signed an informed consent form and who

gave birth at 37–41 weeks of gestation. The study was approved by the Georgian National Institute of Medical Research ethical committee. All the donors had normal pregnancies and delivered healthy newborn babies with weights ranging from 2300 g to 3900g. Newly acquired placentas were washed with 0,9% saline solution and heparin at 37$^0$C under physiological pressure. For this purpose, a polyethylene catheter was inserted into the umbilical artery of the placenta and fixated with 2 sutures. Third catheter was inserted into the umbilical vein. Washing was started through a catheter that was inserted into the artery. Washing was stopped as soon as the clear solution started to flow from the umbilical vein. After the washing, placentas were frozen at the temperature of -80$^0$C. Frozen placentas were thawed at 4$^0$C and washed with Phosphate buffered saline (PBS, Sigma) overnight through perfusion via placental arteries. Placenta was perfused with Sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma) in distilled water for 72 hours starting with 0.01% SDS for 24 hours and then with 0.1% SDS for 24 hours and with 1% SDS for 24 hours. Subsequently, Placentas were washed with distilled water for 15 minutes and with 1% Triton X-100 (Sigma) for 30 minutes to remove residual SDS. Decellularized placentas were washed with PBS for 1 hour. After decellularization placenta were sterilized in 0.1% peracetic acid (Sigma) in PBS for 3 hours. Amniotic membrane was processed with 10% Fetal bovine serum (FBS, Sigma), 1% streptomycin (Sigma) and fixated on special glass holders, which had the shape of frames, with dimensions of 40x40 mm. The amniotic membrane, together with the frames, was placed in the device for lyophilization (Power Dry PL 6000 Freeze Dryers). After lyophilization, the amniotic membranes were packed in a disposable plastic bag and sterilized with gamma radiation (dose of 15 kGy). Until transplantation, the decellularized and lyophilized amniotic membranes were stored aseptically at room temperature. Before the transplantation, the amniotic membrane was rehydrated by placing it in a 0.9% saline solution for 30 minutes.

*Bone marrow mononuclear cells isolation and ex vivo seeding on the acellular human amniotic membrane*

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of the Institutional Animal Care Committee. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of the Georgian National Medical Research Institute in Tbilisi, Georgia. To study the possibility of cell adhesion on the surface of decellularized human amniotic membrane the bone marrow stem cells were used. For acquiring the bone marrow stem cells, the 10 Lewis inbred line laboratory rats of both sexes weighing 200-250g were used. Animals were euthanized with an injection of lethal dose of a 0.5% sodium thiopental solution (Sigma). The lower extremities were amputated after they were processed with 70% alcohol solution. Femurs, which were cleared of muscle tissues, were resected in the epiphysis and diaphysis area. The needle was inserted into the lumen of the bone canal and by using a syringe, the bone marrow was eluted with the Dulbecco medium (Sigma). Afterwards, the bone marrow that was obtained with this method was suspended with pipetting. The acquired suspension was centrifuged at 400g for 30 minutes. Mononuclear cells were isolated by gradient method. After washing with PBS, cells were centrifuged at 200g 5 min. The part of the cells were dissolved in 1 ml of PBS, then placed in a Neubauer chamber and their vitality was determined by using Trypan Blue (Sigma). The remaining portion of mononuclear cells were seeded on the surface of samples of decellularized human amniotic membrane sized with 2x3 cm and flooded in nutritive medium containing a solution of Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Sigma), 10% FBS, 250 kU/L penicillin, 1,25 mg/100 mg/l streptomycin, 50 mkl/l gentamicin and 1.2 g/l of sodium bicarbonate. Cultures were maintained at 37$^0$C with a humidified 5% $CO_2$ in an incubator. After 4 days from in vitro cultivation, the bone marrow stem cells equally covered the surface of decellularized human amniotic membrane.

*Surgical Procedure*

40 Lewis inbred rats aged 8–10 weeks, weighing 200–250g were obtained from the breeding facility of the Tbilisi State Medical University (Georgia). The animals were housed in standard laboratory conditions under 12-hour day-night cycles with provision of pelleted rodent diet and water ad libitum. The animals were divided into 2 equivalent groups. All surgical procedures were under anesthesia with intra-abdominal administration of ethaminal-natrium (30 mg/kg). Preliminarily, to create a gingival recession defect, silk ligature was applied on the gingival part of the upper incisor in the first (experimental) (n=20) and second (control) (n=20) groups. On the 14$^{th}$ day, the ligature was removed and the damaged gingival tissues were resected. The formed mucogingival defect, in the animals of the first group, was covered with acellular human amniotic three-dimensional scaffold with bone marrow stem cells, which were fixated to the edges of the wound with nodal sutures using atraumatic needle 7/0 (Ethicon). The size and shape of the amniotic membrane matrix was adapted to the size of the defect. Surgeries were performed using microsurgical techniques under Surgical Microscope (Zeiss). Animals with mucogingival defect of the second group were left untreated and served as controls. After the surgical operations, all animals were kept under standard vivarium conditions. The animals were taken out of the experiment on 3$^{rd}$, 5$^{th}$, 7$^{th}$ and 14$^{th}$ days after transplantation by an intraperitoneal injection of a lethal dose of a 0.5% solution of sodium thiopental. In order to identify the vessels of microcirculatory bed in the area of mucogingival defect, the transillumination method was used with impregnation of arterial vessels using contrasting masses.

*Method of Transillumination*

For this purpose, on 3$^{rd}$, 7$^{th}$ and 14$^{th}$ days after the surgery, laparotomy was performed under general anesthesia and

abdominal aorta and inferior vena cava were isolated in first (n = 10) and second (n = 10) animal groups. Before the injection of contrasting masses, vascular system was washed with 0.9% saline together with heparin at $37^0$C. For this, polyethylene catheter was inserted into the aorta and fixated with 2 sutures. A second catheter was inserted into the inferior vena cava. Latex (NAIRIT-L3, Armenia) that was stained in red color was injected through the catheter that was inserted into the aorta and blue colored latex was injected through the catheter that was inserted into the portal vein. After the vessels were filled with contrast mass, excision of tissue in area of mucogingival defect was made. The excised tissues were placed between glass slides, which were fixated with patches. In order to study the newly formed blood vessels, in the area of the defect, the method of transillumination was used. Transillumination of the objects was carried out in transmitted light using a MBS-9 (Russia) microscope. To rate the linear sizes or dimensions of the observed objects, the ocular with 8x diopter leveling and interchangeable scale (or net) was used. At the same time, the studies to determine the dynamics of change in the altitude of the recession after transplantation have been conducted.

*Mathematical Assessment*

To assess the dynamics of the healing of the defect, we introduced a mathematical function that describes the change in altitude of the recession (distance between the cementoenamel junction and the most apical point of the gingival margin), depending on the time elapsed since the conducted manipulation. Function has been chosen in such valuation, that the significance of the computed values of the altitude of the defect, at the dates of their measurement, were within the statistical dispersion of the experimental data. This function has the following form:

$$\mathbf{H\ (t) = H_0\ exp\ [-(t-t_0)\ /T],}$$

H (t) is the altitude of the recession during the time t, which was elapsed after removing the ligature and renovation of the edges of the wound; $H_0$ – initial size (altitude) of the recession. Two additional parameters are included in the formula: $t_0$ – the time that was elapsed from the moment of formation of recession until the beginning of the regeneration process; and T, which characterizes the speed of the flowing of the regeneration process (the less T is, the faster the process).

*Histologic Studies*

For the rest of the animals of both groups, on the same dates, for morphological studies, the tissues resected from the gingival area defects were fixated in 10% formalin solution and embedded in paraffin according to standard methods. Afterwards, 5 microns thick paraffin sections were prepare. Sections were incubated in a thermostat at $37^0$C for 12 hours. Further sections were deparaffinized and dehydrated in alcohol solutions. Sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson Trichrome.

**Results and their discussion.** On the first day, as the results of the research have shown, after removing the ligatures and closing mucogingival defect with human amniotic membrane in the experimental group, the slight swelling of the surrounding tissues with exudative inflammation was observed. On day 2 in the outer surface of the membrane, facing the oral vestibule, the cellular infiltration was detected. In the same period, the membrane began to dehydrate. The color of the membrane started to change. From light yellow it became dark brown. In the area of mucogingival defect, the destructive changes persisted, as well as swelling of the connective tissue. Unlike control group, in animals of the experimental group an increase of cell elements due to different degrees of maturity of fibroblasts was observed in the surrounding tissues of the transplanted membrane. On the third day, the edges of the membrane were lifted which moved the sutures. From the edge of the elevated amniotic membrane the granulation tissue was seen. The process of sequestration was accompanied by the formation of granulation barrier followed by its increase, which gradually filled the wound defect and extruded the membrane. On the fifth day in the area of mucogingival defect the formation of new vessels and cellular elements of the gingival epithelium was observed. Unlike the animals from the control group, in animals from the experimental group the mucogingival defect already on the seventh day was completely closed and there was the newly formed epithelial lining, which in shape and color did not differ from the normal. Thickening of the epithelial layer of the gingiva was observed with a slightly expressed keratinization. During first three days, in both groups, the dysfunction of microcirculation was observed in the area of mucogingival defect. These events were specifically expressed in the control group within 7 days, where the destruction of vessels was revealed with the beginning of the formation of connective scar tissue. The swelling of the tissues in the animals of the experimental group was not specifically expressed. The decrease of the percentage of vessels with a diameter of less than 10 microns was observed which caused an increase in the percentage of vessels with a diameter greater than 10 microns. On the third day a general decrease in density of the vessel diameters was observed mostly in vessels with diameters from 6 to 10 microns. After 14 days from the transplantation, gingival epithelial lining did not differ from the normal. The graphs, where dependency of the altitude of the recession on the time, calculated according to the above mentioned formula, as well as experimental data and their statistical dispersion are presented in the Figure 1, where it shows that all calculated curves coincide with the experimental data. For the first group of laboratory animals, $t_0$ equals 5±1 day, which means that regeneration begins at about the fifth day after the transplantation of the decellularized amniotic membrane, and for the second group, $t_0$ equals 7±1 day, which means that the regeneration starts 2 days later. The T parameter for the first group of animals equals 11±1 days and 96±2 days for the second group.

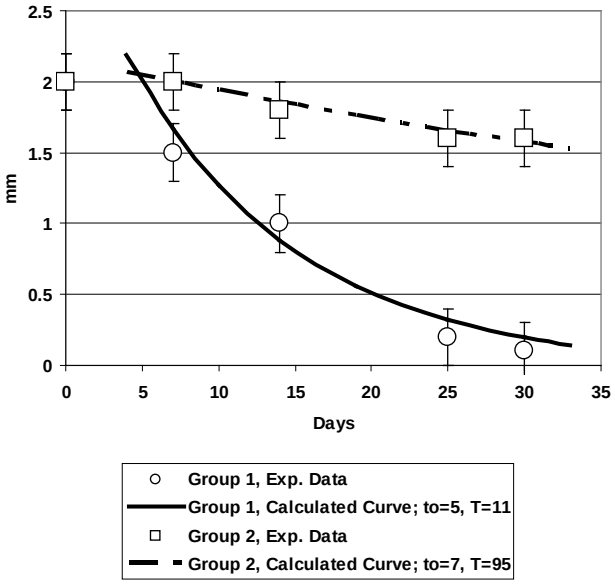



*Fig. Dynamic of tissue regeneration, in control group and after acellular human amniotic membrane transplantation*

To better understand the nature of the parameter T, it is convenient to introduce the value of $T_{1/2} = T \ln 2 \approx 0.693T$. $T_{1/2}$ represents the time during which the defect altitude reduces by 2 times. If there is no treatment, than $T_{1/2} \approx 66$ days, and if the treatment is present, than $T_{1/2} \approx 7{,}5$ days, which means that when there is no treatment the altitude of the defect is reduced by 2 times every 65-67 days and when the treatment is present the altitude of the defect reduces by 2 times every 7-8 days. When comparing these figures, we can conclude that the use of acellular human amniotic membrane together with bone marrow stem cells, the regeneration process is about 8-9 times faster.

Generally in clinical practice, various surgical techniques have been proposed for treating mucogingival defects. The most commonly used methods are the subepithelial connective tissue graft, free or pedicle flaps, rotational flaps, lateral sliding flaps, coronally repositioned flaps [1,4,10,19]. However, the flap surgery technique has disadvantages such as an additional injury when acquiring the graft, following discomfort and the risk of bleeding at the donor site, insufficient (limited) capacity of tissues, aesthetic problems in a patient which are associated with improper engraftment and possible differences in color compared to healthy gingivae and regenerated tissue caused by poor vascularization, short-term positive results, which lead to the following relapse [6,12,20,22,25]. In recent years, in order to improve the results of surgical treatment of the patients with mucogingival defects, using collagen membrane is offered as a material for guided tissue regeneration (GTR). The noted by authors, the main advantages of these membranes are: barrier function [18]; the ability to form a blood clot that provides an early stabilization of the wound and many other [5]. The results that we acquired are confirmed by studies of other authors [17,23,28]. Our studies have shown that decellularized amniotic membrane can be successfully used to fill the mucogingival defect as it represents a three-dimensional carrier substrate of natural origin, which enables the cells cultivated on it, using physical and chemical signals, to direct their differentiation and assembling into the three-dimensional tissue. This study showed that acellular human amniotic membrane can be used as an intraoral wound-dressing material as well; it is biologically acceptable for treating not only soft tissue wounds, but also for exposed bone in the oral cavity. Also, using the acellular human amniotic membrane can be an alternative to other conventional methods of treating gingival recession. This study can pave a way for the future studies and researches that may investigate its application in various fields of aesthetic surgery.

**Conclusion.** Acellular human amniotic membrane as a three-dimensional scaffold boosts angiogenesis and increases the reparative regeneration of the damaged tissues; and it is well-tolerated by the gingival tissues. Hence, human amniotic membrane might be a suitable alternative to other conventional methods of treating mucogingival defects.

## REFERENCE

1. Alghamdi H, Babay N, Sukumaran A. Surgical management of gingival recession: A clinical update. Saudi Dent J. 2009; 21(2):83-94.
2. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. Am J Obstet Gynecol. 2004; 191(5):1678-87.
3. Chen CP, Aplin JD. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. Placenta 2003; 24(4):316-25.
4. Cortellini P, Tonetti M, Prato GP.The partly epithelialized free gingival graft (pe-fgg) at lower incisors.A pilot study with implications for alignment of the mucogingival junction. J Clin Periodontol. 2012; 39(7):674-80.
5. Devlieger R, Millar LK, Bryant-Greenwood G, Lewi L, Deprest JA. Fetal membrane healing after spontaneous and iatrogenic membrane rupture: a review of current evidence. Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(6):1512-20.
6. Doshi S, Jain S, Hegde R. Effect of low-level laser therapy in reducing dentinal hypersensitivity and pain following periodontal flap surgery. Photomed Laser Surg. 2014; 32(12):700-6.
7. Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2014; 67(5):662-75.
8. Forbes K, Westwood M. Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. J Endocrinol. 2010; 207(1):1-16.
9. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Dif-

ferential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. Cornea. 1999; 18(1):73-9.
10. Futran ND, Haller JR. Considerations for free-flap reconstruction of the hard palate. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1999; 125(6):665-9.
11. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea.2000; 19(3):348-52.
12. Harris RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. J Periodontol. 1998; 69(11):1305-11.
13. Khademi B, Bahranifard H, Azarpira N, Behboodi E. Clinical application of amniotic membrane as a biologic dressing in oral cavity and pharyngeal defects after tumor resection. Arch Iran Med. 2013; 16(9):503-6.
14. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007; 28(2-3):161-9.
15. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. Hum Immunol 2000; 61: 1095-1101.
16. Liu T, Zhai H, Xu Y, Dong Y, Sun Y, Zang X, Zhao J. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn. Mol Vis. 2012; 18:2137-46.
17. Lima GM, Severo MC, Santana-Melo GF, Carvalho MA, Vilela-Goulart MD, Salgado MA, Gomes MF.Amniotic membrane as a biological dressing for 5-fluoruracil-induced oral mucositis in rats. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015 Feb 3.
18. Michael G Ross. Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. J Physiol. 2011; 589(Pt 1): 5.
19. Pendor S, Baliga V, Bhongade ML, Turakia V, Shori T. A comparison between connective tissue grafts combined with either double pedicle grafts or coronally positioned pedicle grafts: A clinical study. J Indian Soc Periodontol. 2014; 18(3):326-30.
20. Perisanidis C, Herberger B, Papadogeorgakis N, Seemann R, Eder-Czembirek C, Tamandl D et al. Complications after free flap surgery: do we need a standardized classification of surgical complications? Br J Oral Maxillofac Surg. 2012; 50(2):113-8.
21. Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. Cell Transplant 1995; 4: 343-346.
22. Salama AR, McClure SA, Ord RA, Pazoki AE.Free-flap failures and complications in an American oral and maxillofacial surgery unit. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009; 38(10):1048-51.
23. Shah R, Sowmya NK, Mehta DS. Amnion membrane for coverage of gingival recession: A novel application. Contemp Clin Dent. 2014; 5(3):293-5.
24. Sharma N, Lathi SS, Sehra SV, Agarwal T, Sinha R, Titiyal JS, et al. Comparison of umbilical cord serum and amniotic membrane transplantation in acute ocular chemical burns Br J Ophthalmology. 2014; 4.
25. Shanmugam M, Sivakumar V, Anitha V, Sivakumar B. Clinical evaluation of alloderm for root coverage and colour match. J Indian Soc Periodontol. 2012; 16(2):218-23.
26. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. Br J Ophthalmol. 2001; 85(4):444.
27. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. J Cell Physiol. 1999; 179(3):325-35.
28. Tsuno H, Noguchi M, Okabe M, Tomihara K, Yoshida T3, Nikaido T. Use of hyperdry amniotic membrane in operations for cleft palate: a study in rats. Br J Oral Maxillofac Surg. 2015; Feb 12.
29. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, et al. The Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. Cell Transplant 2003; 12: 545–552.
30. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshha Reddy KB, Wiess RJ, et al. Immune response of human umbilical wharton jelly-derived cell. Stem Cells 2008; 26: 2865-74.

## SUMMARY

## ACELLULAR HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE AS A THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLD FOR THE TREATMENT OF MUCOGINGIVAL DEFECTS

**[1,2]Karalashvili L., [1,2]Kakabadze A., [3]Vyshnevska G., [1]Kakabadze Z.**

*[1]Tbilisi State Medical University; [2]Ilia State University, Tbilisi, Georgia; [3]Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine*

This study was conducted to evaluate the usefulness of decellularized and lyophilized extracellular matrix, which was acquired from human amniotic membrane, for surgical closure of the mucogingival defects.

Preliminarily, to create a gingival recession defect, silk ligature was applied on the gingival part of the upper incisor in the first (experimental) (n=20) and second (control) (n=20) groups. On the 14$^{th}$ day, the ligature was removed and the damaged gingival tissues were resected. The formed mucogingival defect, in the animals of the first group, was covered with acellular human amniotic three-dimensional scaffold with bone marrow stem cells. Animals with

mucogingival defect of the second group were left untreated and served as controls.

Unlike the animals from the control group, in animals from the experimental group the mucogingival defect already on the seventh day was completely closed and there was the newly formed epithelial lining, which in shape and color did not differ from the normal. Acellular human amniotic membrane as a three-dimensional scaffold boosts angiogenesis and increases the reparative regeneration of the damaged tissues; and it is well-tolerated by the gingival tissues. Hence, human amniotic membrane might be a suitable alternative to other conventional methods of treating gingival recession.

**Keywords:** gingival recession, human amniotic membrane, a three-dimensional scaffold.

## РЕЗЮМЕ

## ТРЕХМЕРНАЯ МАТРИЦА ИЗ АЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ АМНИОНА ЧЕЛОВЕКА В ЛЕЧЕНИИ МУКОГИНГИВАЛЬНОГО ДЕФЕКТА

**[1,2]Каралашвили Л.Г., [1,2]Какабадзе А.З., [3]Вишневская А.А., [1]Какабадзе З.Ш.**

*[1]Тбилисский государственный медицинский университет; [2]Государственный университет им. Ильи, Тбилиси, Грузия; [3]Одесский национальный медицинский университет, Украина*

Целью исследования явилась оценка перспективы использования децелюляризированного и лиофилизированного трехмерного матрикса, полученного из амниона человека для хирургического закрытия мукогингивальных дефектов в эксперименте.

В качестве экспериментальных животных были использованы 40 белых лабораторных крыс линии Левис, которые были разделены на 2 эквивалентные группы по 20 в каждой. Всем животным в области резцов верхней челюсти предварительно создавали лигатурную модель дефекта десны. На 14 день после удаления лигатуры, поврежденные ткани десны иссекали, а образовавшийся дефект ткани десны у животных I группы покрывали трехмерной матрицей, заселенной мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга. Животные II группы с мукогингивальным дефектом служили контролем.

В результате проведенного исследования выявлено, что у животных первой группы, в отличие от контрольной, мукогингивальный дефект на седьмые сутки был полностью покрыт вновь образованной эпителиальной выстилкой, которая по форме и цвету не отличалась от нормальной десны.

На основании проведенного исследования следует заключить, что трехмерная матрица из децелюляризированного амниона с мезенхимальными стволовыми клетками является альтернативой другим традиционным методам лечения мукогингивального дефекта.

## რეზიუმე

## მუკოგინგივური დეფექტის მკურნალობაში ადამიანის ამნიონისაგან შექმნილი აცელულური სამგანზომილებიანი მატრიქსის გამოყენება

[1,2]ლ. ყარალაშვილი, [1,2]ა. კაკაბაძე, [1]ა. ვიშნევსკაია, [1]ზ. კაკაბაძე

[1]თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი; [2]ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი, თბილისი, საქართველო; [3]ოდესისი ეროვნული სამედიცინო უნივერსიტეტი, უკრაინა

წარმოდგენილი ნაშრომი ეხება მუკოგინგივური დეფექტის მკურნალობისათვის ადამიანის ამნიონისაგან შექმნილი აცელულური სამგანზომილებიანი მატრიქსის გამოყენებას და მისი ეფექტურობის შეფასებას. ექსპერიმენტი ჩატარდა ლევისის ხაზის 40 თეთრ ლაბოლატორიულ ვირთაგვაზე. ცხოველები დაიყო ორ ეკვივალენტურ ჯგუფად, თითო ჯგუფში - 20 ცხოველი. ყველა ცხოველს წინასწარ ექმნებოდა ღრძილის რეცესიის ლიგატურული მოდელი. აბრეშუმის ძაფის გამოყენებით მოხდა ზედა ყბის საჭრელების ლიგირება. 14 დღის შემდეგ ლიგატურა სცილდებოდა და დაზიანებული ღრძილის ქსოვილები განახლდებოდა ჯანსაღი ქსოვილების ფარგლებში. ამის შემდეგ პირველი ჯგუფის ცხოველებში დეფექტი დაიფარა ადამიანის აცელულური ამნიონური მემბრანისაგან მიღებული სამგანზომილებიანი მატრიქსით ძვლის ტვინის ღეროვან უჯრედებთან ერთად, ხოლო მეორე ჯგუფის ცხოველები წარმოადგენდნენ კონტროლს მკურნალობის გარეშე. პირველ ჯგუფის ცხოველებში, განსხვავებით საკონტროლო ჯგუფისაგან, მუკოგინგივური დეფექტი მეშვიდე დღეს მთლიანად დაფარული იყო ახლადწარმოქმნილი ეპითელიუმით, რომელიც ფორმით და ფერით არ განსხვავდებოდა ნორმალური ღრძილის ქსოვილისაგან. ამრიგად, ადამინის ამნიონური მემბრანისგან შექმნილი აცელულური სამგანზომილებიანი მატრიქსი მეზენქიმურ ღეროვან უჯრედებთან ერთად შეიძლება გამოყენებულ იქნას მუკოგინგივური დეფექტების აღსადგენად.

# EXPERIMENTAL-MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF EXPEDIENCY TO USE THE SKIN GLUE «DERMABOND» FOR POSTOPERATIVE WOUND CLOSURE

**Avetikov D., Loza K., Starchenko I., Loza E., Marushchak M.**

*Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery with Plastic and Reconstructive Surgery of the Head and Neck. Poltava, Ukraine*

According to the latest statistics, published in modern scientific journals, pathological scarring occur in 10% of the total population of the world [1]. Therefore, an optimal aesthetic scar was and remains a major problem in plastic and maxillofacial surgery [2].

The nature and type of postoperative scar depends on various factors. Belousov A.E. studied the effect of general and local factors on the quality of scars. He divided all local factors into two groups. The first group factors depend on the surgeon and the second one are independent of the surgeon. General factors are attributed to heredity, age and immune status of the victim [4].

1. Factors beyond the control of the surgeon (traumatic wounds): the nature of the damage, its scope, location, nature of blood flow in the walls of the wound, the presence of pollution, etc.
2. Factors, which are determined by the surgeon (surgical wound): method of surgical wound closure, its location relative to the field lines of the skin, methods and quality of drainage.

There are many publications and dissertations devoted to the impact of different methods of the wound edges approximation and suturing on their healing, but there is still a significant number of unsatisfactory results [7,8].

Quite important local factor is the trauma of suturing. Needles, like a scalpel, cut through not only the epidermis and dermis, but also a variety of skin appendages. The processes of restoring the integrity of damaged tissues begin to develop there. However, the tissue repairing associated with connective components is imperfect. As a result, a normal reaction of tissue on the local action of a foreign body (ligatures) is often taken for infection at the site of the seam. These reactions are usually called "stitch" (ligature) abscesses. Moreover, in such cases, shifted epithelium of the injured skin appendages can form small keratinized cysts. Clinically, they appear as small, dense, white or yellow-white papules, often taken for miliary or epidermoid cysts. These formations are usually reversing between 10 and 25 days, followed by replacement of scar tissue. "Stitch" abscesses tend to disappear, but miliary cysts may remain.

Until the middle of XX century, surgical thread problem has not caused much interest. Only from 50's XX century revealed that the quality, chemical composition and structure of the material filaments influence on tissue reaction on its implantation, and ultimately, often on the result of the operation. It is proved that the nature and type of scar depends on processes occurring in the wound in the early postoperative period, which, in turn, greatly influences the type of used suture material [4].

We aimed to investigate the morphological features of healing of postoperative wounds in the early stages of reparative process in the experiment, depending on the used type of the wound closure.

**Material and methods.** The experiment included 20 male rats, weighing 180-200 g. All rats were anesthetized by a single intraperitoneal injection of sodium thiopental. After the shaving operative field, 2 cm full-thickness incision wound was made on the anterior surface of the abdomen in the longitudinal direction. As suture material for wound closure in the 1st experimental group (10 rats) we used surgical filament "Polyamide 4-0». In the 2nd experimental group (10 rats) wounds were closured by using skin glue "Dermabond".

All of the animals were taken out of the experiment on day 3 after surgery by administering a lethal dose of sodium thiopental. Directed biopsy of skin wound for histological examination was performed. Biopsy specimens were fixed in 12% neutral formalin, dehydrated and embedded in paraffin by standard methods [6]. From the paraffin blocks were made 5-7 mm thick sections that were stained with hematoxylin-eosin and examined under the microscope.

We determined the density and the ratio of cellular elements of different classes in the wound area, using the method of standard space ($S = 10000\ um^2$). The processing of the results was performed by standard statistical methods [3, 5].

**Results and their discussion.** The examination of skin wounds in animals of group 1: in all cases there was swelling and mild redness of the skin around the scar. The scar lines with node stitches were uneven nature through penalty wound edges nodal seams. The postoperative wounds were covered with crusts in 10 cases. Also, we observed postoperative wounds fester in all cases.

During the examinations under the microscope we observed forming scar, wedge-shaped, which consisted of granula-

tion tissue and extended throughout the thickness of the skin, subcutaneous tissue and partly to muscles. There was a high density of cellular elements – 46.9±0.53 in 10000 $um^2$. Mostly, there were cells of macrophage-monocytic series, plasma cells and lymphocytes. Sometimes, the cells with grainy basophilic cytoplasm were found in perivascular spaces. The presence of above cells is common for the early stages of reparative process. The quantity of such cells was up to 71.9±0.74% of all cellular elements of the forming scar. All other cells 28.1±0.74% were elements of fibroblastic series, mainly young fibroblasts - cells with elongated oval or rounded nucleus and basophilic cytoplasm (Fig. 1).

It should be noted, that most of the fibroblasts were in the depth of postoperative scar, whereas when macrophages and lymphocytes localized mainly in its surface sections.

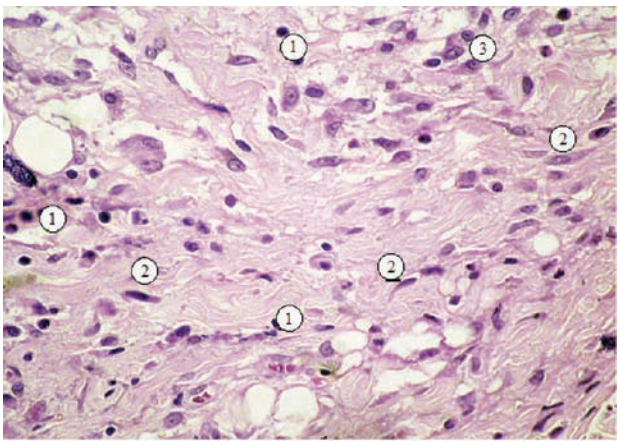



*Fig. 1. The basal layer of scar formed on day 3 after the imposition of nodal joints sutures (1st experimental group of animals), H&E, x280*
*1 - lymphocytes; 2 - adult fibroblasts; 3 - young fibroblasts*

We could detect squamous epithelium above the granulation tissue in five cases. This finding indicated the beginning of the process of the wound defect epithelization. A complete epithelization has been find in two observations, when epithelium completely covered the wound defect. Partial (incomplete) epithelization was discovered in three cases. In those cases, epithelium was detected only in the peripheral parts of the wound defect; while in the central parts of the wound surface eosinophilic structureless mass has been found. Such a pattern indicates incomplete wound cleaning process (Fig. 2).

Constantly, we detected circulatory disorders, localized in the dermis on the periphery of the forming scar. Such disorders included a plethora of arterial and venous microvessels, small perivascular hemorrhages, some small clots in the capillaries. Sometimes, we met piecemeal congestion of lymphocytes and macrophages diasionally, mainly near the small blood vessels in the reticular layer of the dermis. We found the remains of suture material, which looked like almost homogeneous, eosinophilic fragments of various sizes, surrounded by inflammatory infiltration, with a predominance of neutrophils in the last and macrophages.

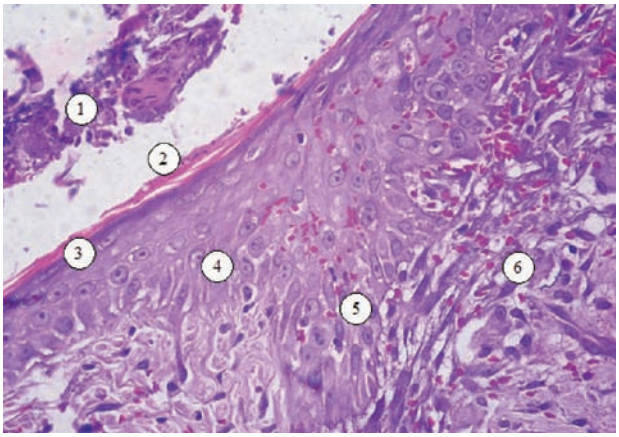



*Fig. 2. The structure of the scar formed on day 3 after the imposition of nodal sutures (I experimental group of animals), H&E, x280*
*1 - tissue detritus; 2 - the stratum corneum; 3 - granular layer; 4 - basal layer; 5 - acanthotic cord;*
*6 - granulation tissue*

The examination of skin wounds in animals of group 2: in all cases there was equal linear scar, no effects of edema and hyperemia in the surrounding tissues, while, as in the previous group, such signs were detected.

Microscopic study show results similar to the previous group. We determined granulation tissue that covered the entire thickness of the skin and hypodermis. However, the density of cellular elements was significantly lower than in the previous experimental group and averaged – 35.0±0.60 10000 $um^2$. The number of lymphocytes and macrophages 61.1±0.82% was predominant among the total number of granulation tissue cells. However, the relative number of fibroblasts was significantly higher than in the previous group and was 38.9±0.82%.

In compare with the previous group we observed higher number of newly formed blood microvessels in the forming scar. It may be the evidence of faster tissue regeneration under the skin glue (Fig. 3).

The results of epithelization were also not like in the previous group. The epithelium covered the wound defect almost completely in eight cases. Incomplete epithelization was observed in two cases.

It should be noted that there was the lack of tissue detritus in the area of postoperative scar. That indicated about a complete cleaning of the wound.

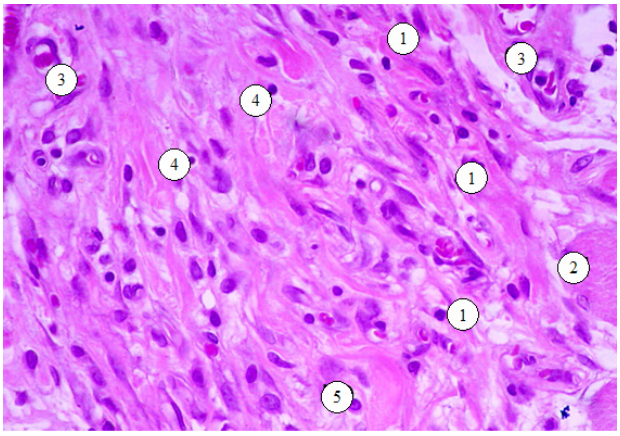



*Fig. 3. The basal section of the scar formed on day 3 after surgery using skin glue (II experimental group), H&E, x280*
*1 - fibrocytes; 2 - adjacent muscles; 3 - blood microvessels; 4 - lymphocytes; 5 - macrophage*

**Conclusions:**
According from our experiment, the usage of skin glue creates better conditions for wound healing:
1. Accelerates wound cleansing of tissue detritus.
2. Helps to accelerate the maturation of granulation tissue in the connective tissue.
3. Improves vascularization of the forming scar.
4. Creates a better condition of surrounding tissues for wound epithelization.
Thus, to achieve a more aesthetic scar, we recommend applying skin glue instead of using nodal joints.

Also, we are planning to work out the method of intraskin suturing for better wound closuring with the skin glue.

The work is a part of research of the department of surgical dentistry and maxillofacial surgery, plastic and reconstructive surgery of the head and neck “Optimization of conservative and surgical treatment of patients having defects and deformation of maxillofacial area», № state registration № 0110U004629.

**REFFERENCES**

1. Аветіков Д.С., Трапова Х.О. Порівняльний аналіз методик профілактики утворення патологічних рубців. Український медичний альманах. Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції «Сучасні можливості стоматології». Луганськ: 2013; Том 16 (1): 9-11.
2. Аветіков Д.С. Сучасні методи профілактики та лікування патологічних рубців обличчя та шиї. «Світ медицини та біології» 2012; 8(3): 74-76.
3. Автандилов Г.Г. Методика расчета сложности морфологических систем при морфологических исследованиях. Суханов С.Т. Архив анат., гистол., эмбриологии 1982; 83(8): 77–80.
4. Белоусов А.Е. Рубцы и их коррекция. Очерки пластической хирургии. Том 1. СПб.: Командор. SPB: 2005; 128.
5. Лакин Т.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1980: 170.
6. Меркулов А.Б. Курс патогистологической техники. М.: Медицина; 1969: 237.
7. Gulsoy M. Closure of skin incisions by 980-nm diode laser welding. Dereli Z, Tabakoglu Hasim O. et al. Ozquncem Lasers Med. Sci. 2006; 21: 5-10.
8. Windgerow A.D. New innovations in scar management. Chait L.A., Stals R., Stals P.J. Aesthetic Plast. Surg. 2000; 24(3): 227-234.

**SUMMARY**

**EXPERIMENTAL-MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF EXPEDIENCY TO USE THE SKIN GLUE «DERMABOND» FOR POSTOPERATIVE WOUND CLOSURE**

**Avetikov D., Loza K., Starchenko I., Loza E., Marushchak M.**

*Higher State Educational Establishment of Ukraine “Ukrainian Medical Stomatological Academy”, Department of surgical dentistry and maxillofacial surgery with plastic and reconstructive surgery of the head and neck. Poltava, Ukraine*

We aimed to investigate the morphological features of healing of postoperative wounds in the early stages of reparative process in the experiment, depending on the used type of the wound closure.

It is proved that the nature and type of the scar depends on the processes that occur in the wound at the early postoperative stage, which in turn greatly affects the form of suture material used.

The experiment included 20 male rats, weighing 180-200 g. All rats were anesthetized by a single intraperitoneal injection of sodium thiopental. After the shaving operative field, 2 cm full-thickness incision wound was made on the anterior surface of the abdomen in the longitudinal direction. As suture material for wound closure in the 1st experimental group (10 rats) we used surgical filament “Polyamide 4-0». In the 2nd experimental group (10 rats) wounds were closured by using skin glue “Dermabond”.

According from our experiment, the usage of skin glue creates better conditions for wound healing. Thus, to achieve a more aesthetic scar, we recommend applying skin glue instead of using nodal joints.

**Keywords:** post-operative scarring, wound healing, morphology of wounds, skin glue, microscopic study.

**РЕЗЮМЕ**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОЖНОГО КЛЕЯ «ДЕРМАБОНД» ПРИ ЗАКРЫТИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ РАНЕВЫХ ДЕФЕКТОВ КОЖИ**

**Аветиков Д.С., Лоза К.О., Старченко И.И., Лоза Е.А., Марущак М.И.**

*Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии с пластической и реконструктивной хирургией головы и шеи, Полтава, Украина*

Целью исследования явилось изучение морфологических свойств заживления постоперационных ран на ранних ступенях репаративного процесса в эксперименте, в зависимости от типа ушивания раны.

Доказано, что характер и вид рубца зависят от процессов, которые происходят в ране на раннем послеоперационном этапе, на которые, в свою очередь, в значительной степени влияет вид использованного шовного материала.

Эксперимент проведен на 20 крысах-самцах массой 180-200 г. Всем животным при обезболивании тиопенталом натрия проводили полнослойные прямолинейные разрезы длиной в 2 см на передней поверхности живота в продольном направлении. В качестве шовного материала для закрытия послеоперационной раны животным I экспериментальной группы (10 крыс) применяли хирургические нити «Полиамид №4». Животным II экспериментальной группы (10 крыс) был нанесен кожный клей «Дермабонд».

Данные морфологического исследования показали, что применение кожного клея в эксперименте создает лучшие условия для заживления послеоперационной раны. Таким образом, для достижения более эстетичного нормотрофического рубца авторы рекомендуют нанесение кожного клея вместо применения узловых ших.

რეზიუმე

კანის წებო "დერმაბონდ"-ის გამოყენების ექსპერიმენტულ-მორფოლოგიური დასაბუთება კანის პოსტოპერაციული ჭრილობის დეფექტის დახურვის მიზნით

დ. ავეტიკოვი, კ. ლოზა, ი. სტარჩენკო, ე. ლოზა, მ. მარუშჩაკი

უკრაინის სახელმწიფო სასწავლო დაწესებულება “უკრაინის სამედიცინო სტომატოლოგიური აკადემია”, ქირურგიული სტომატოლოგიისა და ყბა-სახის ქირურგიის კათედრა თავ-კისრის პლასტიკური და რეკონსტრუქციული ქირურგიით, პოლტავა, უკრაინა

დადგენილია,რომ ნაწიბურის ხასიათი და სახეობა დამოკიდებულია იმ პროცესებზე, რომლებიც ჭრილობაში ადრეულ პოსტოპერაციულ პერიოდში ვითარდება, თავის მხრივ, მნიშვნელოვნად განისაზღვრება გამოყენებული საკერავი მასალის ტიპით.

ექსპერიმენტი ჩატარდა 20 მამრ თეთრ ლაბორატორიულ ვართაგვაზე მასით 180-200 გ. ყველა ცხოველს ნატრიუმის თიოპენტალით გაუტკივარების ფონზე უტარდებოდა 2 სმ სიგრძის სწორი პირდაპირი განაკვეთი მუცლის წინა ზედაპირზე.

საკერავი მასალის სახით გამოყენებულია ქირურგიული ძაფი “პოლიამიდ №4” (I სერია, 10 ცხოველი) და კანის წებო “დერმაბონდ” (II სერია, 10 ცხოველი).

მორფოლოგიური კვლევის შედეგების მიხედვით, კანის წებოს გამოყენების პირობებში პოსტოპერაციული ჭრილობის შეხორცება მიმდინარეობს სრულფასოვნად ესთეტიკური ნორმოტროფიკული ნაწიბურის ჩამოყალიბებით,რაც ავტორებს უფლებას აძლევს რეკომენდაცია გაუწიონ კანის წებოს კვანძოვანი ნაკერის გამოყენების ნაცვლად.

# HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF ATHEROSCLEROTIC AND SENILE CALCIFIC AORTIC VALVE STENOSIS

**[1]Saladze T., [1]Gogiashvili L., [1,2]Tsagareli Z., [2]Bakhutashvili Z., [2]Kavtaradze T.**

*[1]I. Javakhishvili Tbilisi State Uuniversity, A. Natishvily Institute of Morphology;*
*[2]Acad. G. Chapidze Emergency Cardiology Center, Tbilisi, Georgia*

In the developed world the leading cause of cardiovascular morbidity is aortic valve (AV) disease; at the macroscopic and cellular levels aortic valve is highly responsive to continuous mechanical forces. Among the AV disease the most frequent pathological process is aortic stenosis which may be caused by aortic valve leaflets calcification associated with atherosclerosis or aging process [2,6]. Non rheumatic aortic valve calcification increasingly afflicts our aging dismetabolic population. The cellular and molecular mechanisms involved in the development of calcific aortic stenosis associated with advanced age had not been fully elucidated [12,16]. Based on the researches it is obvious that aortic wall calcification associated with atherosclerosis frequently contains full formed bone tissue including morrow [8,9].

The cellular origin is not known, also there is hypothesis that calcific aortic stenosis is an active process initiated by inflammation of unknown etiology with development osteogenesis within the leaflets. As a sequence of events calcification starts by local injury to the endothelium, however the cause of this injury is still unknown, there is most support for mechanical stress hypothesis. Because of anatomical singularity of the three leaflets aortic valve allows stress sharing between the leaflets and the sinuses of Valsalva [6]. In addition, histopathologic evidence suggests that early lesions in aortic valves are not just a disease process secondary to aging, but an active inflammatory process with similarities and dissimilarities with atherosclerosis. Aortic valve stenosis incidence in total population is of 20-30% and 85% over 85 years [3,6,10,12,16].

In both atherosclerosis and aortic stenosis cased by aging process, the initiating factors are postulated to include endothelial injury at sites of low shear high tensile stress. Some of the same clinical factors implicated in the pathogenesis of atherosclerosis have been proposed as possible risk factors for valvular aortic stenosis, including age, sex, hypertension, hyperlipidemia and diabetes. In contrast to the early lesion of atherosclerosis, it appears that there is little involvement of smooth muscle cells in the early valve lesion [1,5]. The abnormalities noted were not confined to the area bounded by the elastic lamina but instead extended into the adjacent fibrosis. With standard endothelial cell markers, no significant neovascularization was detected. Microscopic mineralization appeared to be prominent in the early valve lesions than in typical in atherosclerosis [7,8,13,15]. Early lesion of valvular aortic stenosis have several features including lipid, protein, calcium accumulation and the presence of a chronic inflammatory infiltrate, which also are present in clinically stenotic valves but which do not appear to be merely associated with aging [6,8,11,12]. These findings are consistent with hypothesis that, rather than representing a process that is degenerative and thus, by implication, volvular aortic stenosis is an active processing part by chronic inflammation.

The clinical evident resulting from atherosclerosis is directly related to the oxidation of lipids in low density lipoproteins that become trapped in the extracellular matrix of the sub endothelial space. These oxidized lipids activate an NFkB-like transcription factor and induce the expression of genes containing NFkB binding sites. The protein products of these genes initiate an inflammatory response that initially leads to the development to the fatty streak [1,4,11,14].

At the present time, there is no known therapy that can slow or reverse disease progression in patients with calcific aortic stenosis. The aortic valve surgical replacement is only introduced therapy for elderly patients with sever aortic stenosis (AS). The overall 30-day mortality was 4.1% (5/123). Predicted mortality was 25.0±15.7% by logistic EuroSCORE, 7.3±6.9% by STS score, and 7.8±8.7% by EuroSCORE II. The combined risk of aortic valve replacement (2-10% mortality) and prosthesis-related complications (2-3%/year) is the greater then the risk of sudden cardiac death “Watchful waiting” is therefore recommended [2,6,8,16].

**Material and methods.** The comparative histological study of the Aortic valve leaflets with senile and atherogenic aortic valve calcification was obtained from non rheumatic patients, to characterize developing aortic valve lesion and the level of inflammatory cells activation. Stains were evaluated by two observers with side-by-side comparisons of the different stains on sequential tissue sections to allow correlation of the location of abnormalities. We have investigated aortic valve leaflets which were obtained from patients undergoing aortic valve replacement. Total 65 Patients (there age were from 54- 84 year), 35 male and 30 female. Case Selection – the clinical data including surgical and medical history. Clinical data are shown in Table 1.Samples for histological and immunohistochemical analysis were taken vertically through the center of aortic valve leaflets which were excited during the valve replacement and fixed in 10% buffered formalin and processed to obtain paraffin blocks. All samples were macroscopically cal-

*Table1. Patients Clinical Characteristics uner aortic valves stenosis before Aortic valve replacement*

| Characteristic | Clinical date |
|---|---|
| Age | 5<54 – 84>10 |
| Sex male/female | 35/30 |
| Clinical Disease - Aortic valve stenosis | 100% |
| Heavy | 80% |
| Moderate | 20% |
| Hypertension | 90% |
| Accompanying disease | 60% |
| Major Complication of the Underlying disease | 50% |
| History of diabetes | 60% |
| History of hyperholesterinemia | 50% |
| Hypothyreosis | 40% |

*Table 2. Surgical Speciments From patients undergoing aortic valve replacement for non rheumatic stenosis*

| | |
|---|---|
| Macroscopic Calcification | + |
| Macroscopic thickening | + |

cified, Table 2. Paraffin embedded sections of calcific aortic valves were examined for leaflet cellularity and the presence of adipose cells using Hematoxylin and Eosin staining. By using immunohistochemical techniques we examined pattern and number of cellular components, we measured angiogenesis and new vessels formation in all stains of the valve leaflets using the following commercially available rabbit polyclonal antibodies to detect new blood vessels formation by VEGF-165. All procedures were evaluated: examination of basal lamina type IV collagen in order to assess invasion in accordance to specific marker "RED FLUKA" and by using CD-31(PECAM -1) endothelial cell marker to detect angiogenesis.

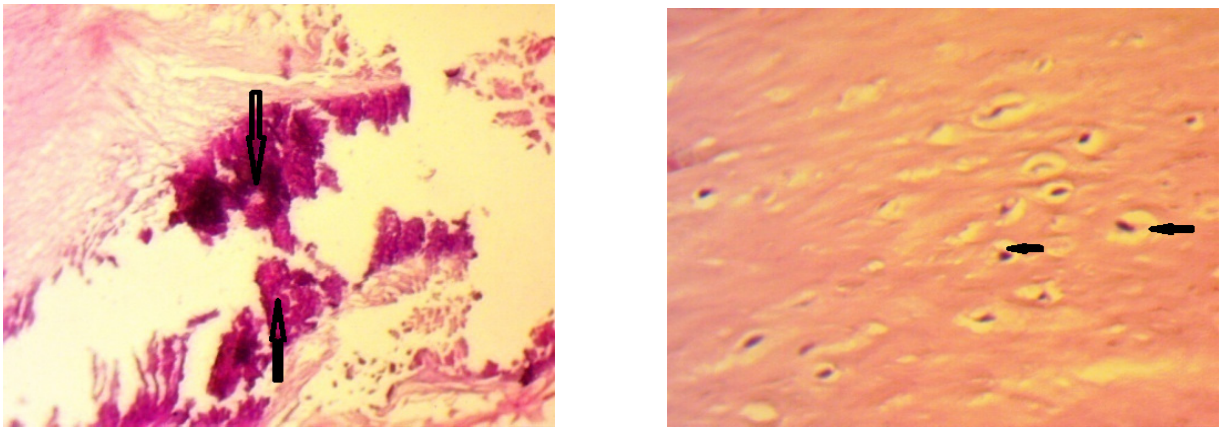
**Results and their discussion.** *Hematoxylin and Eosin Microscopy.*

By H&E microscopy (Fig. 1) – senile aortic valve structure under the senile aortic valve stenosis is disorganized, in the central zones of the leaflets it was seen destruction of elastic fibers, multifocal various sizes, calcium deposits as well as lympho-macrophages infiltration.

Typically, the structure is replaced by sclerotic aortic valve graft, chondrogenic and osteogenic row cells, fibroblasts observed in a dark core, elastic fibers disruption, covering endothelial destruction and subendothelial desquamated zone. Atherogenic calcification time more clearly depicted – angiogenesis perivascular infiltration and necrosis of the muscle cells – necrosis type Celina.

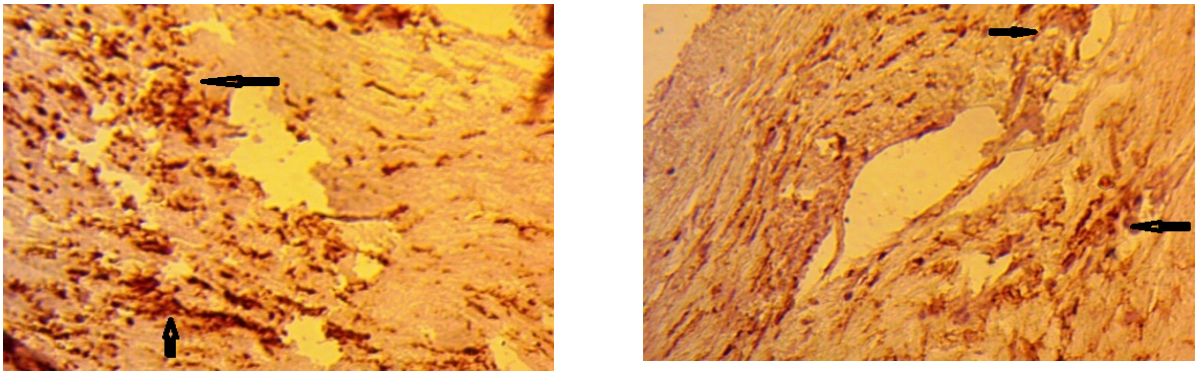
*Immunohistochemistry*

All samples from aortic valve calcification were divided in 2 groups: I group - patients with isolate senile aortic stenosis and II group - atherosclerotic aortic valve calcific ones. All of the simples hade some similar features: 1- CD 31 immunopositivity was recognized within the endothelium (Fig, 2), H&E revealed the presence of abundant amount collagen replacing elastic fibers within the thickened valve.



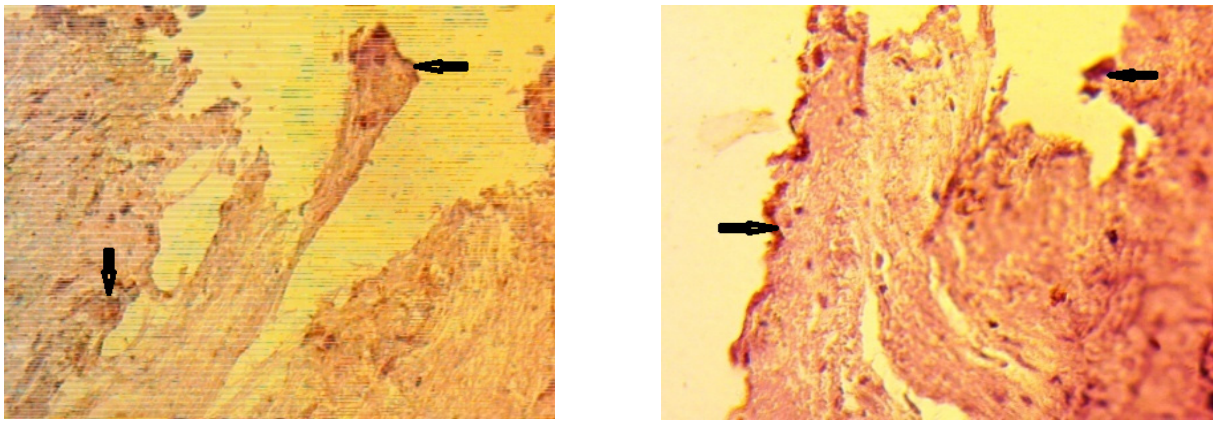
a b

*Fig. 1 Senile and Atherogenic aortic valve calcification. Tissue samples-aortic valve leaflets, H & E microscopy 165X: a) Centers of calcification, displacement of elastic lamina; b) Celina- type necrosis*



a b

*Fig. 2. Senile and Atherogenic valve leaflets reviled high expression of CD 31; Immunoperoxydase reaction 160X. a) Vascular endothelium in De novo- senile process, b) at the time of atherogenic etiologies*



a b

*Fig. 3. Senile and Atherogenic aortic valve leaflets . a) Senile process, b) at the time of atherogenic etiologies. Immunohistochemisttry showed presence of new vessels formation by VEGF expression of the aortic valve*

*Table 3. The histological difference of Subjects in two groups between the Senile and Atherosclerotic aortic valve stenosis*

| Aortic valve stenosis | Senile | Atherosclerosis |
|---|---|---|
| CD31 immunopositivity | +++ | +++ |
| VEGF | +++ | +++ |
| Calcification | +++ | ++ |
| Chondrocytes | +++ | + |
| Osteocytes | +++ | + |
| Inflammatory cellular infiltration | +++ | +++ |
| Lipid deposition | ++ | +++ |
| Smooth muscle cells | ++ | +++ |

Aortic valves also revealed multiple small blood vessels by VEGF 4 (Fig. 3).

It was seen the areas of massive inflammatory cellular infiltration around large dilated blood vessels compared to simples with isolate sever senile calcific leaflets cells had features of: osteocytes and large amount of calcification and small numbers smooth muscle cells.

The hypothesis that the aortic valve calcification is an active process rather than passive calcium deposition has been set forth over the past decade [1,7,8,17]. Also it is well known that aortic valve calcification cased by senile process have same similarities to atherosclerosis [1,6,11,17]. Our previous study is focused on angiogenesic potential and differentiation of the Aortic valve stenosis cased by senile and atherogenic calcification by using CD31 and VEGF immunostaining to access the inflammation level and major characteristics in both cases. The importance of accepting the aortic active inflammatory process and to focus on the potential vascular and molecular mechanisms involved in the pathogenesis of aortic valve stenosis lies in that it would become novel therapeutic interventional strategies before and after surgical aortic valve replacement.

The comparative histological study of the Aortic valve leaflets with senile and atherogenic aortic valve calcification was obtained from non rheumatic patients, to characterize developing aortic valve lesion and the level of inflammatory cells activation. Stains were evaluated by two observers with side-by-side comparisons of the different stains on sequential tissue sections to allow correlation of the location of abnormalities. We have investigated aortic valve leaflets which were obtained from patients undergoing aortic valve replacement. Total 65 Patients (there age were from 54- 84 year), 35 male and 30 female.

Examination of calcific aortic valves revealed: multiple blood vessels in central zone which are similar to atherosclerotic aortic stenosis compared to total absence in normal aortic valves(5 cases same age group from forensic autopsy). Inflammatory cellular infiltration is detected in both cases cells more having features of osteocytes were recognizable in isolate sever senile calcific stenosis. New blood vessels were detected by VEGF and angiogenesis detected and by CD 31was significant in both cases [17].

Aortic valves in both cases also revealed multiple small blood vessels by VEGF 4 (Fig. 3) - it was seen the areas of massive inflammatory cellular infiltration around large dilated blood vessels compared to simples with isolate sever senile calcific leaflets where cells had features of: I. osteocytes and large amount of II calcification and small numbers of III smooth muscle cells.

Despite a number of studies published about inflammation in aortic valve calcification [1,2,6-8,11,17], it is first elucidated comparative study of aortic valve calcification cased by senile and atherosclerotic infiltration by the use immunohistochemical technique and no endothelial antigens, including angiogenesis regulators and detection (CD34, VEGF respectively) are specific in comperativ studies in two groups. However, the present study agrees with Safinaz Salah el-Din Sayed and Waleed Gamal el- Din Abou Sennawith ther assumption by immunohistochemistry.

The histological study of the senile calcific aortic valves demonstrates features similar to atherosclerosis: lipid deposition, fibroblasts infiltration and basement membrane disruption and some dissimilarities: massive inflammatory cellular infiltration, presence of prominent mineralization , small numbers of smooth muscle cells and abundant expression of VEGF and CD31 newly formed endotheliocytes, compared to total absence in the normal aortic valves.

**Conclusions.** According to our postulation, senile aortic stenosis has some similarities with atherogenic aortic valve stenosis. In both cases we can see an active inflammatory cellular infiltration, vessel formation de novo and endochondral ossification rather then passive deposition of calcium. From that point of view we can conclude that there is opportunity to novel therapeutic interventional strategies before and after surgical aortic valve replacement.
Thus, in both cases leading to morphological changes:
- Displacement of elastic lamina, scleral-fibrosis aortic valve in the central zone, as necrosis solution.
- Persistent inflammatory cell infiltration.
- Neoangiogenezi, angiogenetic factor high expression.
- Intensive multifocal calcification senile origin stenosis.
- Predominantly degenerative changes during atherogenesis.

## REFERENCES

1. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edvards PA, et al. Atherosclerosis: besic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. Circulation. 1995;91(9); 2488-96.
2. Bonow RO, Greenland P. Population-wide trends in aortic stenosis incidence and outcomes. Circulation 2015; 131(11):919-71.
3. Bostrom K.L., Rajamanna N.M., Towler D.A. The Regulation of valvular and vascular Sclerosis by Osteogenic Morphogens. Circulation Research 2011; 109: 564-577.
4. Caira F., Stuart B., Stock R., Gleason Th.G., GcMee E.C., et. al. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low density lipoprotein receptor –related protein 5 receptor mediated bone formation. J. Am Coll. Cardiol. 2006; 4.
5. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reidj J, Northridge DB, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis . The new England Journal of Medicine 2005; 352 (23):2398-97.
6. Cowell J., Newby D.E., Boon N.A., Elder A.T. Calcific aortic stenosis; same old story? Age and Ageing 2004; 33: 538-544.
7. Disthabanchong S. Lowering vascular calcification burden in chronic kidney disease; Is it possible? World Journal of Nephrology 2013; 2(3).
8. Dweck MR, Khaw HJ, Sng GK, Luo EL, Baird A, Williams MC, Makiello P, Mirsadraee S, Joshi NV, van Beek EJ, Boon NA, Rudd JH, Newby DE. Aortic stenosis, atherpsclerosis, and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation? Eur Heart J. 2013; 34(21): 1567-74.
9. Egan K.P., Kim J-Hoon, Mohler E.R., Pignolo R.J. Role for circulating osteogenic precursor cells in aortic valvular disease. Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011:31:2965-2971.
10. Fandolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. Circ. Res. 2014; 114 (11): 1757- 71.
11. Fang L., Miller Y.I. Emerging applications For Zebrafish as a model organism to study oxidative mechanisms and their roles in inflammation ands vascular accumulation of oxidized lipids. Free Radic Bio Med 2012; 53(7).
12. Johansson M., Nozohoor S., Zindovic I., Nilsson J., Kimblad P.O., Sjoqren J. Prediction of 30-day mortality after transcatheter aortic valve implantation: competition

of logistic. J Hart Valve Dis. 2014; 23(5): 567-74.
13. Knappen S.P., Korckx M., Van Cauwelaert P., Bortier H., Mistiaen W. Histological evaluation of autophagic cell death in calcified aortic valve stenosis. J Heart Valve Dis. 2006; 15(1); 43-7.
14. Lee Y.S., Chou Y.Y. Endothelial alteration and senile calcific aortic stenosis: anelectronic microscopic observation. Proc Natl Sci Counc Repub China B. 1997; 21(4):137-43.
15. Miler J.D., Weiss R.M., Serrano K.M., Brooks R.M., Berry C.J., Zimmerman K., Young S.G., Heistad D.D. Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice 2009; 119: 2693-2701.
16. Muira S., Arta T., Kumamaru H., Domei T., Soqa Y., Shirai S., Hanyu M., Ando K. Cause of death and mortality and evaluation of prognostic factors in patients with sever aortic stenosis in an aging society. J. Cardiol. 2015 Apr 15.
17. Safinnaz Salah El-Din Saied, Waleed Gamal EL-Din Abou Senna. Neoangiogenesis and Ossification in Senil Calcific aortic valve: A histological and Immunohistochemical Study. Egypet J. Histol. Val. 2010: 192-201.

## SUMMARY

## HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF ATHEROSCLEROTIC AND SENILE CALCIFIC AORTIC VALVE STENOSIS

**[1]Saladze T., [1]Gogiashvili L., [1,2]Tsagareli Z., [2]Bakhutashvili Z., [2]Kavtaradze T.**

*[1]I. Javakhishvili Tbilisi State Uuniversity, A. Natishvily Institute of Morphology; [2]Acad. G. Chapidze Emergency Cardiology Center, Tbilisi, Georgia*

The goal of this study - description of morphogenesis aortic valve stenosis in the senile and vice atherosclerotic aortic valve and definition inflammatory processes in them, improving pathology-anatomic diagnostic, macro- and microscopic examination of the stage of development of atherosclerotic plaques in the operating material fragments of aortic valve on the basis of morphological (histochemical and immunohistochemical studies by using markers CD31, VEGF) and idiopathic characteristics of atherosclerotic plaques, the differential diagnosis of the degree of calcification of the aortic valve in the atherogenic and idiopathic aortic stenosis. Calcification in senile aortic stenosis is characterized by three main parameters: infiltration of inflammatory cells, while senile origin stenosis observed the potential growth of angiogenesis. In endothelial walls of the aortic valve imunnhistochemicaly revealed high expression of endothelial and panendothelial growth factors.

We have investigated aortic valve leaflets which were obtained from patients undergoing aortic valve replacement. Total 65 Patients (there age were from 54-84 year), 35 male and 30 female.

The results indicate that senile lesion of aortic valve leaflets have several features including: sclera-fibrosis, inflammatory cell infiltration, new vessels formation and calcification which also are present in clinically stenotic valves cased by atherosclerosis. As a result of overlap clinical factors within atherosclerosis and senile calcific disease may be determined such as factors contributing progress of obstruction and vice versa, morphological pre-conditions for occlusion of thrombosis and blood vessels that will become significant part of strategy on treatment of wall structure stability and post-operation treatment.

**Keywords:** Stenosis, Senile, VEGF (vascular endothelial growth factor), CD31 – neoangiogenesis, atherosclerosis, calcification.

## РЕЗЮМЕ

## ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ И СЕНИЛЬНОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ ПРИ СТЕНОЗЕ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

**[1]Саладзе Т.М., [1,2]Гогиашвили Л.Г., [1,2]Цагарели З.Г., [2]Бахуташвили З.Л., [2]Кавтарадзе Т.А.**

*[1]Тбилисский государственный университет им. И.А. Джавахишвили, Институт морфологии им. А.Н. Натишвили; [2]Центр неотложной кардиологии им. акад. Г. Чапидзе, Тбилиси, Грузия*

Цель данного исследования – описание морфогенеза стеноза аортального клапана при сенильном и атеросклеротическом пороке аортального клапана и определение воспалительных процессов в них, улучшение патологоанатомической диагностики, макро- и микроскопическое исследование стадии развития атеросклеротических и идиопатических бляшек в операционном материале фрагментов клапанов аорты на основании морфологической (гистохимического и иммуногистохимического исследования посредством маркеров CD31, VEGF) характеристики атеросклеротических и идиопатических бляшек, для дифференциальной диагностики степени кальциноза аортального клапана при атерогенном и идиопатическом стенозе аорты. Кальциноз при сенильном стенозе аортального клапана характеризуется тремя основными параметрами: инфильтрационным воспалением клеток, во время стеноза сенильного генеза наблюдается потенциальный рост ангиогенеза. В эндотелии стенок аортального клапана иммунногистохимически выявляется высокая экспрессия эндотелиального и панэндотелиального факторов роста.

Базой данных послужили 65 образцов аортальных клапанов после протезирования аортального клапана ввиду тяжелого стеноза 35 мужчин и 30 женщин в возрасте от 54 до 84 лет.

В результате проведенного исследования повреждения атеросклеротических и сенильных бляшек аортального клапана нами выявлены следующие процессы: эрозии, разрывы, некроз и рост липидного ядра, различная степень выраженности воспалительной реакции, неоваскуляризация, явления кальциноза, изменения vasa vasorum. Наличие иммунокомпетентных CD31 и VEGF позитивных клеток в атеросклеротических и идиопатических бляшках свидетельствует, что воспаление в стенке, особенно интиме аортального клапана, является основным процессом, обуславливающим персистенцию активной деструкции, в связи с чем можно предложить новую терапевтическую тактику.


## რეზიუმე

### სენილური და ათეროგენული აორტის სარქვლის კალცინოზის ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოქიმიური კვლევა


[1]თ. სალაძე, [1,2]ლ. გოგიაშვილი, [1,2]ზ. ცაგარელი, [2]ზ. ბახუტაშვილი, [2]თ. ქავთარაძე

[1]ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, ა. ნათიშვილის სახ. მორფოლოგიის ინსტიტუტი; [2]აკად. გ. ჩაფიძის სახ. გადაუდებელი კარდიოლოგიის ცენტრი, თბილისი, საქართველო

კვლევის მიზანია ათეროგენული და სენილური კალცინოზის მადიფერენცირებელი მორფოლოგიური ნიშნების დადგენა, ასევე აორტის სარქვლის ობსტრუქციის ხელშემწყობი იმუნომორფოლოგიური ფაქტორების გამოვლენა თამედროვე მეთოდებით.

კვლევა ჩატარდა ათეროგენული და სენილური ცვლილებების მქონე აორტის სარქვლის კარედების 65 ნიმუშებზე. ყველა ქსოვილოვან ნიმუშზე ჩატარდა მორფოლოგიური და იმუნომორფოლოგიური კვლევა. პაციენტების ასაკი – 54-84 წელი (30 ქალი, 35 მამაკაცი).

აორტის სარქვლის სენილურ კალციფიკაციას ახასიათებს: დინამიკური, პროგრესირებადი ანთებითი პროცესი და უჯრედული ანთებითი ინფილტრაცია, იმავე უჯრედებში ანგიოგენეზის პოტენციალის ზრდა, რომელსაც ადასტურებს CD31-ის დადებითი ექსპრესია სისხლძარღვთა კედელში, VEGF პოზიტიური ნეოანგიოგენეზი კი ენდოქონდრული ოსიფიკაციის და ოსტეობლასტების ფენოტიპის დაგროვების ხელშემწყობი ფაქტორია. ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, იხსნება პერსპექტივა პრევენციული თერაპიისათვის, დაავადების ნებისმიერ სტადიაზე როგორც ოპერაციამდე, ასევე, ოპერაციის შემდგომ პერიოდში.

---

# PREDICTION OF PESTICIDE RISKS TO HUMAN HEALTH BY DRINKING WATER EXTRACTED FROM UNDERGROUND SOURCES

**Antonenko A., Vavrinevych O., Omelchuk S., Korshun M.**

*O.O. Bogomolets National Medical University, Hygiene and Ecology Institute, Kyiv, Ukraine*

Population growth, industrial development and intensification of agriculture of Ukraine and other European countries led to increasing of environmental pollution by ecotoxicants. Among the factors that cause poor health situation of the population of Ukraine and people of other states is unfavorable salt composition of drinking water, pollution of water, soil with chemical fertilizers, pesticides and their derivatives [4,9-11]. In particular, during the period from 1999 to 2012 the fraction of fungicides in the structure of plant protection chemicals assortment, permitted for use in Ukraine amounted to 28,6±1,1%, the growth of fungicide assortment – 340%, and the volume of use of fungicides increased by 63,2% [6].

The most common, modern and perspective fungicides for crops protection are triazoles, and conazoles, strobilurynes, carbamates, ethylene bis-dithiocarbamates, pirazolcarboxamides and others [17,18]. It is noteworthy that feature of the fungicides use is their two- and threefold application for crops protection throughout the growing season, which

can lead to the accumulation of this group of pesticides in the environment.

It is worth be noted that almost 70% of the Ukrainian villages and settlements of urban type and 65% of the population in Europe consumes drinking water from wells (groundwater) that have the greatest probability of pollution with pesticides [10,11,21].

Among the main factors, contributing to behavior in the environment and the possibility of getting into the groundwater of active ingredients (a.i.) of chemical plant protection products, is their physicochemical properties, such as water solubility, vapor pressure, rate of sorption in soil ($K_{oc}$) and half-life period in soil and water ($DT_{50}$) [14].

The aim of our work was scientific substantiation of method of prediction of the risk of contamination of groundwater with different classes' fungicides in soil and climatic conditions of Ukraine and other European countries, as well as hygienic assessment of their impact on public health.

**Experimental procedure (materials and methods)**
Information about physical and chemical properties, stability in the environmental objects, parameters of stability in soil and water of the studied active substances of different chemical classes and main toxicological properties represented in table 1 [18].

The most widely used chemical fungicides of following chemical classes were used for studying: triazoles (penconazole, difenoconazole, tebconazole); strobilurines (pyraclostrobin, trifloxystrobin, azoxystrobin); ethylene-bis-dithiocarbamate (metiram, mancozeb); cyanopyrrole (fludioxonil); anilides (benalaxyl-M, boscalid); anilidepyrimidines (cyprodinil, valifenale, pyrimethanil); pyrazole-carboxamides (fluxapyroxad, penthiopyrad, isopyrazam).

Parameters of studied fungicide stability in soil and climatic conditions of Ukraine are given on the results of own field researches [1-3,20].

Prediction of possibility of migration of pesticides in groundwater was carried out by a number of indices. Leaching potential index or Groundwater ubiquity score (GUS) [13] was calculated according next formula:

$$GUS = \log DT_{50} \times [4 - \log K_{oc}],$$

where $DT_{50}$ – stability in soil, day;
$K_{oc}$ – organic carbon (o.c.) sorption coefficient, ml/g o.c.

If the value of GUS > 2,8 – pesticide probably leaches into groundwater; if <1,8 – pesticide probably not leaches into groundwater; 1,8-2,8 – possibility of pesticide leaching in groundwater is insignificant.

Also screening index of leaching (LIX) was used [19]:

$$LIX = \exp(-k \times K_{oc}),$$

where k – constant of first order equation for a substance, $day^{-1}$;
$K_{oc}$ – organic carbon (o.c.) sorption coefficient, ml/g o.c.

LIX values ranging from 0 to 1, indicating respectively the minimum and maximum leaching potential into groundwater.

The index of potential contamination of groundwater and river water LEACN was developed in 1982 by Laskovskij (Ласковским) et al. It takes into account water solubility, the rate of degradation of pesticides in soil ($DT_{50}$), organic carbon sorption coefficient ($K_{oc}$) and vapor pressure. In 2004 a modified formula which excludes the vapor pressure was proposed [17]:

$$LEACH_{mod.} = \frac{S_w \times DT_{50\ field}}{K_{oc}},$$

where $S_w$ – water solubility, mg/l;
$DT_{50\ field}$ – half life period substances in the soil in natural conditions, day;
$K_{oc}$ – organic carbon (o.c.) sorption coefficient, ml/g o.c.

The authors explain that the possibility of substances evaporation from the soil surface are taken into account in the $DT_{50}$ field index, because in field conditions this is one of substance destruction processes [14,17]. Evaluation of the index: 0,0-1,0 – low risk of pollution (3 class), 1,1-2,0 – average (moderate) risk (2 class), >2,0 – high risk (1 class).

**Results and their discussion.** Field researches conducted in different soil and climatic zones of Ukraine and usage of mathematical modeling method made it possible to calculate parameters of studied compounds stability the in soil ($DT_{50}$) (Table 1).

Considering that the leading chain of migration processes in the biosphere is ground, we have carried risk assessment of the probability of groundwater contamination by the GUS and LIX in soil and climatic conditions of Ukraine and other countries (Fig., Table 2).

It was found that under the application of fungicides of triazole, strobilurines, ethylene-bis-dithiocarbamate, cyanopyrroles, anilides, anilidepyrimidines, pyrazole-carboxamides class the risk of groundwater contamination in the soil and climatic conditions of Ukraine are low, as in all cases GUS was <1.8 (Fig.). Value of the GUS for active ingredients (a.i.) of ethylene-bis-dithiocarbamate, cyanopyrroles classes and most of a.i. of triazole, strobilurines, anilides, anilidepyrimidines classes, received us in the $DT_{50}$ values calculations in soil and climatic conditions of Ukraine, correspond with the data of [18].

*Table 1. Basic physical and chemical properties, parameters of studied active ingredients of different chemical classes stability in soil and water, its basic toxicological parameters*

| Active ingredient | lg $K_{ow}$ | Solubility in water, mg/l | $K_{oc}$ | Vapor pressure, Hg mm | k, доба$^{-1}$ | $DT_{50}^{1}$ soil, day | $DT_{50}^{2}$ soil, day | $DT_{50}^{2}$ water, day | Acute oral $LD_{50}$ (mg/kg) (Rat) | ADI[1], mg/kg | ADI[2], mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| penconazole | 3,72 | 73,0 | 2205 | $1,5\times10^{-6}$ | 0,022 | 31,6±0,9 | 90 (22-115) | 2,0 | >2000 | 0,007 | 0,03 |
| difenoconazole | 4,2 | 15,0 | 3760 | $9\times10^{-10}$ | 0,022 | 31,3±1,7 | 85 (20-265) | 3,0 | 1453 | 0,002 | 0,01 |
| tebconazole | 3,7 | 32,0 | 769 | $1\times10^{-8}$ | 0,021 | 32,3±0,6 | 47,1 (25,8-91,6) | 42,6 | 1700 | 0,030 | 0,03 |
| pyraclostrobin | 3,99 | 1,9 | 9304 | $1,95\times10^{-10}$ | 0,063 | 10,7±0,8 | 32 (8-55) | 2,0 | >5000 | 0,030 | 0,03 |
| trifloxystrobin | 4,5 | 0,61 | 2377 | $2,55\times10^{-10}$ | 0,051 | 13,8±1,3 | 7 (2-12) | 1,1 | >5000 | 0,020 | 0,10 |
| azoxystrobin | 2,5 | 6,7 | 589 | $7,5\times10^{-8}$ | 0,067 | 10,5±0,4 | 180,7 (120,9-261,9) | 6,1 | >5000 | 0,030 | 0,20 |
| metiram | 1,76 | 2,0 | 998 | $7,5\times10^{-7}$ | 0,098 | 7,1±0,3 | 7 (~7) | 0,7 | >5000 | 0,020 | 0,03 |
| mancozeb | 1,33 | 6,2 | 500000 | $9,75\times10^{-8}$ | 0,092 | 7,5±0,2 | 18 (1) | 0,2 | >5000 | 0,005 | 0,05 |
| fludioxonil | 4,12 | 1,8 | 145600 | $2,9\times10^{-9}$ | 0,05 | 14,1±0,4 | 20,5 (8-43) | 2,0 | >5000 | 0,015 | 0,37 |
| benalaxyl-M | 3,67 | 33,0 | 7175 | $5,02\times10^{-6}$ | 0,065 | 10,6±0,8 | 44 (36-124) | 38,0 | >2000 | 0,005 | 0,04 |
| boscalid | 2,96 | 4,6 | 772 | $5,25\times10^{-9}$ | 0,05 | 13,8±0,9 | 118 (28-208) | 9,0 | >5000 | 0,040 | 0,04 |
| cyprodinil | 4,5 | 13,0 | 2277 | $3,82\times10^{-8}$ | 0,056 | 12,3±0,8 | 45 (11-98) | 12,5 | >2000 | 0,030 | 0,03 |
| valifenale | 3,1 | 24,1 | 1686 | $7,2\times10^{-12}$ | 0,09 | 7,8±0,6 | 1,9-12,0 hours | 5,0 | >5000 | 0,005 | 0,07 |
| pyrimethanil | 2,84 | 0,121 | 301 | $1,65\times10^{-7}$ | 0,063 | 11,0±0,8 | 29,5 (23-54) | 16,5 | 4150 | 0,020 | 0,17 |
| fluxapyroxad | 3,13 | 3,44 | 728 | $2,7\times10^{-6}$ | 0,064 | 11,3±1,8 | 151 (53-424) | 4,4 | >2000 | 0,020 | 0,02 |
| penthiopyrad | 4,62 | 1,375 | 804 | $6,43\times10^{-4}$ | 0,056 | 12,5±0,9 | 9,2 (0,8-33,3) | 9,9 | >2000 | 0,100 | 0,10 |
| isopyrazam | 4,25 | 0,55 | 2416 | $1,3\times10^{-4}$ | 0,055 | 12,5±0,7 | 72 (9,11-173) | 2,3 | 2000 | 0,010 | 0,03 |

*notes: 1 – results of own researches in soil and climatic conditions of Ukraine; 2 – data from [18]*

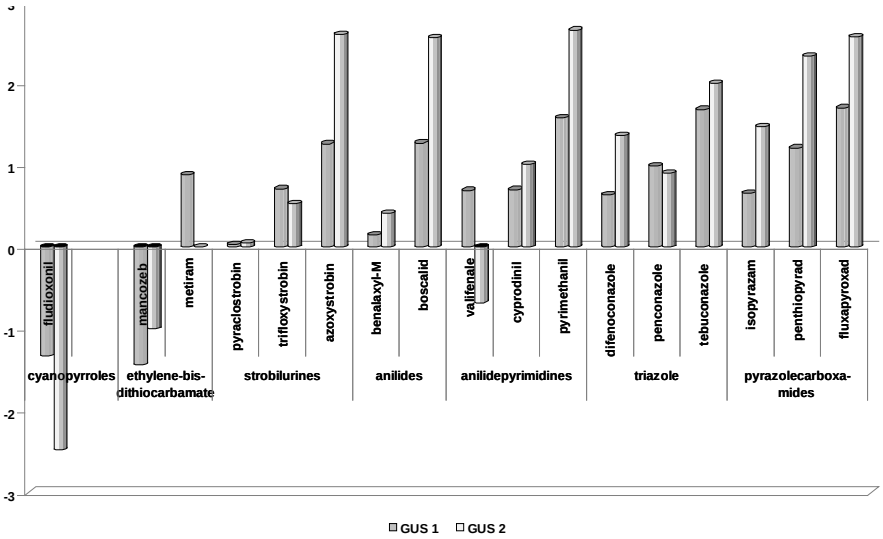



*Fig. Risk assessment of groundwater pollution with fungicides of different classes (GUS 1- in soil and climatic conditions of Ukraine, GUS 2 – data from [18])*

*Table 2. Indices of test substances migration in groundwater*

| Active ingredient | GUS[1] | | GUS[2] | | LIX | LEACH[1] | | LEACH[2] | | IGCHI | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | value | rank[3] | value | rank[3] | | value | class | value | class | value | |
| penconazole | 0,64 | 5 | 1,36 | 10 | $8,56\times10^{-22}$ | 1,0462 | 2 | 2,9796 | 1 | 6 | 3 |
| difenoconazole | 0,99 | 11 | 0,9 | 8 | $1,19\times10^{-36}$ | 0,1249 | 3 | 0,3391 | 3 | 6 | 3 |
| tebconazole | 1,68 | 16 | 2,0 | 12 | $9,69\times10^{-08}$ | 1,3441 | 2 | 1,9599 | 2 | 9 | 1B |
| pyraclostrobin | 0,032 | 3 | 0,05 | 5 | $2,74\times10^{-255}$ | 0,0022 | 3 | 0,0065 | 3 | 3 | 4 |
| trifloxystrobin | 0,71 | 9 | 0,53 | 7 | $2,25\times10^{-53}$ | 0,0035 | 3 | 0,0018 | 3 | 3 | 4 |
| azoxystrobin | 1,26 | 13 | 2,60 | 16 | $4,79\times10^{-12}$ | 0,1194 | 3 | 2,0555 | 1 | 6 | 3 |
| metiram | 0,88 | 10 | 0,00 | 4 | $3,34\times10^{-43}$ | 0,0142 | 3 | 0,0140 | 3 | 4 | 4 |
| mancozeb | -1,44 | 1 | -1,00 | 2 | 0,00 | 0,0001 | 3 | 0,0002 | 3 | 3 | 4 |
| fludioxonil | -1,33 | 2 | -2,48 | 1 | 0,00 | 0,0002 | 3 | 0,0003 | 3 | 3 | 4 |
| benalaxyl-M | 0,15 | 4 | 0,41 | 6 | $2,86\times10^{-203}$ | 0,0488 | 3 | 0,2024 | 3 | 7 | 2 |
| boscalid | 1,27 | 14 | 2,56 | 14 | $1,72\times10^{-17}$ | 0,0822 | 3 | 0,7031 | 3 | 5 | 3 |
| cyprodinil | 0,70 | 8 | 1,01 | 9 | $4,19\times10^{-56}$ | 0,0702 | 3 | 0,2569 | 3 | 6 | 3 |
| valifenale | 0,69 | 7 | -0,68 | 3 | $1,26\times10^{-66}$ | 0,1115 | 3 | 0,0071 | 3 | 6 | 3 |
| pyrimethanil | 1,58 | 15 | 2,65 | 17 | $5,81\times10^{-09}$ | 0,0044 | 3 | 0,0119 | 3 | 5 | 3 |
| fluxapyroxad | 1,70 | 17 | 2,57 | 15 | $5,83\times10^{-21}$ | 0,0534 | 3 | 0,7135 | 3 | 4 | 4 |
| penthiopyrad | 1,21 | 12 | 2,33 | 13 | $2,79\times10^{-20}$ | 0,0214 | 3 | 0,0157 | 3 | 5 | 3 |
| isopyrazam | 0,66 | 6 | 1,47 | 11 | $1,95\times10^{-58}$ | 0,0028 | 3 | 0,0164 | 3 | 6 | 3 |

*notes: 1 – results of own researches in soil and climatic conditions of Ukraine; 2 – data from [18]; 3 – from mimimal to maximal value*

Considering that the leading chain of migration processes in the biosphere is ground, we have carried risk assessment of the probability of groundwater contamination by the GUS and LIX in soil and climatic conditions of Ukraine and other countries (Fig., Table 2).

It was found that under the application of fungicides of triazole, strobilurines, ethylene-bis-dithiocarbamate, cyanopyrroles, anilides, anilidepyrimidines, pyrazole-carboxamides class the risk of groundwater contamination in the soil and climatic conditions of Ukraine are low, as in all cases GUS was <1.8 (Fig.). Value of the GUS for active ingredients (a.i.) of ethylene-bis-dithiocarbamate, cyanopyrroles classes and most of a.i. of triazole, strobilurines, anilides, anilidepyrimidines classes, received us in the $DT_{50}$ values calculations in soil and climatic conditions of Ukraine, correspond with the data of [18].

*Table 3. The scale of assessment of pesticides hazard indices under pollution of groundwater and surface water*

| Index, units | Assessment in scores, depending on value of the index | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| LEACH, c.u. | <0,01 | 0,01-0,1 | 0,11-1,0 | >1,0 |
| $DT_{50}$ in water, day [13] | <5 | 5-10 | 11-30 | >30 |
| ДДД, мг/кг [5] | >0,02 | 0,0051–0,02 | 0,0021–0,005 | ≤0,002 |

In soil and climatic conditions of the other countries GUS values of tebconazole, fludioxonil, boscalid, pyrimethanil, fluxapyroxad, penthiopyrad, isopyrazam, penconazole, azoxystrobin, benalaxyl-M, cyprodinil were higher, which is probably due to the greater stability of these substances in soils of North and the West Europe [20].

But for these entire test substances and the rest of the studied pesticides in European soils there is a low risk of groundwater contamination except the first six for which it is negligible. It should be noted that none of the substances has a high risk of contamination of groundwater.

When ranking the GUS values from minimal to maximal possibility of substance leaching into groundwater, ranks of these substances on the results of a studying in soil and climatic conditions of Ukraine and other European countries are not identical, but for most compounds did not significantly differ and in both cases fall in the first or in the second ten.

Unfortunately, this index has disadvantages, including getting negative GUS values for substances with short half life period and/or large coefficient of sorption. So Claudia Spadotto in 2002 proposed LIX index [19]. For the entire test substances value of this index approached the “0” that correlates with the data obtained by other authors for a number of pesticides [17,19]. This is due to their rapid destruction of in soil (Table 2) and high coefficients of sorption by organic carbon (Table 1). As can be seen, this approach also has drawbacks. First, not all significant parameters, that can influence on the behavior of pesticide in the system “ground-water”, were taking into account; secondly, there is no clear gradation of hazard assessment in leaching of pesticides into groundwater, which complicates comparative assessment of the index for these substance.

The best, in our opinion, leaching potential index is LEACH. First, this index determines not only the possibility of contamination of groundwater, but also rivers, where pesticides may leach from surface runoff. Second, it takes into account the maximum number of parameters that can influence the transition of pesticides from soil into other mediums. According to table 2 in soil and climatic conditions of Ukraine the risk of contamination of ground and surface water by all studied fungicides is low (3 class), except penconazole and tebuconazole that pertain to 2 class (medium risk). In conditions of other European countries almost the same results were received, except penconazole and azoxystrobine that pertain to 1 class (high risk of contamination). For other test substances: tebuconazole attributed to the 2 class (medium risk), the rest – to 3 class (low risk).

It should be noted, that all above calculated indices characterize only the potential of pesticides penetration into groundwater and surface water without reliable estimate of the probability of such penetration. Moreover, they do not allow us to estimate the risk to human health when consuming water contaminated in such a way. In a number of countries there were attempts to develop such a evaluation methods. So, Uzbek scientists have developed a method of calculation of global of leaching index GLI [17], which takes into account the same parameters as the LEACH and additionally – octanol-water distribution coefficient. Irish scientists have developed a methodology that except the properties of the pesticide takes into account also soil properties (texture, clay content, permeability) and climatic and weather conditions (mainly, rainfall, expressed in number of “wet days” per year) [15]. But these methods do not take into account toxic properties of substances and their effects on the human body.

In Ukraine, Sergeev S.G. (Сергеєв С.Г.) et al [8] developed a method, which includes an assessment of GUS, $DT_{50}$ in water and Z (ratio between per oral half lethal concentration ($LD_{50}$) to limit (threshold) of chronic effect) in scores and further calculation of integrated danger vector by the formula.

In our opinion, this method also has disadvantages. As mentioned above, the GUS index is not the most optimal and complete for evaluation of pesticides migration into groundwater and do not takes into account the possibility of substances transition into surface water, which is also widely used for household and drinking water supplying. In addition, the calculation by the formula, especially using the square root, leads to obtaining of large decimal points, rounding of which, in its turn, leads to errors and inaccuracies of further evaluation.

We recommend for integrated assessment of the potential hazard of pesticide exposure on the human organism when it enters ground and surface waters assess 3 indices: LEACH, $DT_{50}$ in water and allowable daily intake (ADI) on a scale which provides four gradations (Table 3).

After adding all scores obtained integral groundwater contamination index (IGCHI) estimate as follows: IGCHI at a value of 3 or 4 points - substances low hazardous for human

(4 class), 5 and 6 – moderately hazardous (3 class), 7 and 8 – hazardous (2 class), 9 and 10 – highly hazardous (1B class), 11 and 12 – an extremely hazardous (1A class).

So, most of the studied fungicides attributed to the low (pyraclostrobin, trifloxystrobin, metiram, mancozeb, fludioxonil, fluxapyroxad) and moderately hazardous (penconazole, difenoconazole, azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, valifenale, pyrimethanil, penthiopyrad, isopyrazam). Exceptions are only benalaxy-M, due to its high stability in water (stored over a month) and tebuconazole that besides high stability in water, also is characterized by high potential for leaching into groundwater and surface water.

Conclusions: 1. The calculation and comparative evaluation of various indices of pesticides migration into groundwater were conducted. It was established that the most optimal and complete is an LEACN index according to which in soil and climatic conditions of Ukraine the risk of contamination of ground and surface water by all studied fungicides is low, except penconazole and tebuconazole for which there is medium contamination risk. In conditions of other European countries almost the same results were received: penconazole and azoxystrobine attributed to the 1 class (high risk of contamination), tebuconazole – 2 class (medium risk), the rest test substances – 3 class (low risk).
2. We have developed a method of integrated assessment of the potential hazard of pesticide exposure on the human organism when it enters ground and surface waters, integral index of which – IGCHI – is obtained by adding of scores assigned to main indicators characterizing the danger to humans in pesticides gets into the water: LEACH, $DT_{50}$ in water and the allowable daily intake (ADI).
3. It was established that, benalaxy-M is hazard when it leached into groundwater and surface water, tebuconazole is highly hazard, which is primarily due to their high stability in water (in both cases) and significant potential for leaching (in the latter case).

**REFERENCES**

1. Антоненко А.М. Оцінка екотоксикологічної небезпечності та ризику забруднення підземних вод новими пестицидами інгібіторами 4-гідроксифеніл піруватіоксигенази та інгібіторами мікросомальних ферментів. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії 2014; Том 14: Випуск 3 (47): 43-47.
2. Вавриневич Е.П., Бардов В.Г., Омельчук С.Т. Сравнительная эколого-гигиеническая оценка поведения и персистентности фунгицидов разных классов в почве. Здоровье и окружающая среда: сб. науч.тр. Минск: РНМБ; 2014: Т.1, Вып. 24: 138–143.
3. Вавріневич О.П., Омельчук С.Т., Бардов В.Г. Порівняльна гігієнічна оцінка потенційного ризику для працюючих при застосуванні фунгіцидів різних класів. Лікарська Справа/Врачебное дело 2013; 3-4: 130-138.
4. Засипка Л.Г., Ворохта Ю.М., Бабієнко В.В. та ін. Стан здоров'я населення в зонах інтенсивного сільськогосподарського виробництва. Медичні перспективи 2011; XVI (1): 91-96.
5. Кавецький В.М., Макаренко Н.А. Екотоксикологія та критерії якості навколишнього середовища. Агроекологія і біотехнологія. К.: 1998; Випуск 2: 65–69.
6. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. Офіційне видання. Київ: Юнівест Медіа: 2014; 832.
7. Пестициди. Класифікація за ступенем небезпечності: ДСанПіН 8.8.1.002-98 Затв. 28.08.98. Зб. важливих офіційних матеріалів з санітарних і протиепідемічних питань. Київ: 2000; 9(1): 249-266.
8. Сергеев С.Г. и др. Индикаторные критерии и прогноз опасности загрязнения подземных вод гербицидами на основе эфиров кислот. Современные проблемы токсикологии 2010; 2-3: 76-79.
9. Тотанов Ж.С., Умбетпаев А.Т., Черепанова Л.Ю. и соавт. Санитарно-гигиенические проблемы применения пестицидов и заболеваемость населения крупного зерносеющего региона Казахстана. Международный журнал по иммунореабилитации (International Journal on Immunorehabilitation) 2009; 11(1): 151-152.
10. Яцик А.В. Водогосподарська екологія: У 4 т., 7 кн. К.: Генеза, 2004; Т. 4, кн. 6-7: 434.
11. European water resources and policy. http://freshwater.org/wp-content/uploads/joomla/PDFs/critical-water/water-resourcesineurope.pdf.
12. Fungicides. Edited by: Odile Carisse: InTech, 2010; 538.
13. Gustafson D.I. Groundwater ubiquity score : a simple method for assessing pesticide leachability. Environmental Toxicology and Chemistry 1989; 8: 339-357.
14. Kerle E.A., Jenkins J.J., Vogue P.A. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State University. Rreprinted April 2007.
15. Labite H.E., Cummins E. Development of a screening tool to assess the temporal risk of pesticides leaching to groundwater using the source, target, vector approach.. An Irish case study for shallow groundwater. Environ. Monit. Assess. 2015; 187(3):91.
16. Novotny V. Diffuse pollution from agriculture – A worldwide outlook. Water science and technology 1999; 39: 1-13.
17. Papa E., Castiglioni S., Gramatica P. at el. Screening the leaching tendency of pesticides applied in the Amu Darya Basin (Uzbekistan). Water research 2004; 38: 3485-3494.
18. PPDB: Pesticide Properties Data Base [електронний ресурс] Режим доступу: http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/.
19. Spadotto C.A. Screening method for assessing pesticide

leaching potential. Pesticidas: R. Ecotoxicol. Curitiba: 2002; 12: 69-78.
20. Vavrinevych O.P., Antonenko A.M., Omelchuk S.T., Korshun M.M., Bardov V.G. Prediction of soil and groundwater contamination with fungicides of different classes according to soil and climate conditions in Ukraine and other european countries. Georgian Medical News 2015; № 5(242): 77-84.
21. Water resources across Europe - confronting water scarcity and drought. EEA Report No 2/2009.

## SUMMARY

## PREDICTION OF PESTICIDE RISKS TO HUMAN HEALTH BY DRINKING WATER EXTRACTED FROM UNDERGROUND SOURCES

**Antonenko A., Vavrinevych O., Omelchuk S., Korshun M.**

*O.O. Bogomolets National Medical University, Hygiene and Ecology Institute, Kyiv, Ukraine*

The aim of our work was to develop the method of prediction of the risk of contamination of groundwater with different classes' fungicides in soil and climatic conditions of Ukraine and other European countries, as well as hygienic assessment of their impact on public health. The calculation and comparative evaluation of various indices of pesticides migration into groundwater were conducted. It was established that the most optimal and complete is an LEACN index according to which in soil and climatic conditions of Ukraine the risk of contamination of ground and surface water by all studied fungicides is low, except penconazole and tebuconazole for which there is medium contamination risk. We have developed a method of integrated assessment of the potential hazard of pesticide exposure on the human organism when it enters ground and surface waters, which are intensive used for drinking water supplying. Integral index of this method – IGCHI – is obtained by adding of scores assigned to main indicators characterizing the danger to humans in pesticides gets into the water: index of leaching (LEACH), half life period in water ($DT_{50}$) and the allowable daily intake (ADI). According developed method all studied fungicides are low hazard for human, except benalaxy-M and tebuconazole which are hazard and highly hazard, respectively.

It was established that, benalaxy-M is hazard when it leached into groundwater and surface water, tebuconazole is highly hazard, which is primarily due to their high stability in water (in both cases) and significant potential for leaching (in the latter case).

**Keywords:** pesticides, groundwater, surface water, drinking water, method of risk assessment, health.

## РЕЗЮМЕ

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕСТИЦИДОВ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДЛЯ ПИТЬЯ ГРУНТОВЫХ ВОД

**Антоненко А.Н., Вавриневич Е.П., Омельчук С.Т., Коршун М.М.**

*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Институт гигиены и экологии, Киев, Украина*

Целью исследования явилось создание методики прогнозирования негативного влияния на человека пестицидов при их поступлении в организм с питьевой водой. В материалах приведены результаты собственных исследований и данные литературы. Разработана методика интегральной оценки потенциального риска для здоровья человека при попадании пестицидов в грунтовые и поверхностные воды, активно использующиеся для питьевого водоснабжения. Интегральный показатель данной методики – IGCHI рассчитывается путем суммирования баллов присвоенных таким значимым показателям влияния вещества на человека, как показатель вымывания в грунтовые воды (LEACH), период полуразрушения в воде ($DT_{50}$) и допустимая суточная доза (ДСД). Согласно разработанной методике, все исследованные фунгициды малоопасны для человека, кроме беналаксила-М и тебуконазола, которые классифицированы, соответственно, как опасный и очень опасный.

## რეზიუმე

## ადამიანის ორგანიზმზე პესტიციდების გავლენის პროგნოზირება გრუნტის წყლების სასმელად გამოყენების შემთხვევაში

ა. ანტონენკო, ო. ვავრინევიჩი, ს. ომელჩუკი, მ. კორშუნი

ო. ბოგომოლცის სახ. ნაციონალური სამედიცინო უნივერსიტეტი, ჰიგიენის და ეკოლოგიის ინსტიტუტი, კიევი, უკრაინა

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ადამიანის ორგანიზმში სასმელი წყლის მეშვეობით პესტიციდების მოხვედრის პირობებში მათი ნეგატიური ზემოქმედების პროგნოზირების მეთოდიკის შემუშავება. სტატიაში მოყვანილია ავტორების საკუთარი გამოკვლევის შედეგები და ლიტერატურის მონაცემები. კვლევის შედეგად შემუშავებულია ადამიანის ჯანმრთელობისათვის პოტენციური რისკის ინტეგრალური შეფასების მეთოდიკა პესტიციდების გრუნტის ზედაპირულ წყლებში მოხვედრის შემთხვევაში, როდესაც ეს

წყლები აქტიურად გამოიყენება სასმელად. ამ მეთოდიკის ინტეგრალური მონაცემის IGCHI-ის გაანგარიშება ხდება ადამიანზე ნივთიერების ზემოქმედების მაჩვენებლებისათვის მინიჭებული ისეთი სიდიდეების შეკრების გზით, როგორიცაა წყალში ნახევრად დაშლის პერიოდი ($DT_{50}$), გრუნტის წყალში ჩარეცხვის კოეფიციენტი და ადამიანისათვის სადღეღამისო დასაშვები დოზა. შემუშავებული მეთოდიკის გამოყენებით ყველა გამოკვლეული ფუნგიციდი ნაკლებ საშიშროებას წარმოადგენს ადამიანისათვის,რაც არ შეიძლება ითქვას ბენალაქსილა-M და ტებუკონაზოლზე, რომლებიც კლასიფიცირდება, როგორც საშიში და ძლიერ საშიში.

---

## ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЛЕПТОСПИРОЗА В ГРУЗИИ

**[1]Мамучишвили Н.И., [3]Кучулория Т.С., [2]Мчедлишвили И.М., [1]Имнадзе П.Г., [1]Мирзашвили Д.Ш.**

*[1]Национальный центр контроля заболеваний и общественного здоровья;*
*[2]Тбилисский государственный медицинский университет, департамент общественного здоровья;*
*[3]Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили,*
*департамент общественного здоровья, Грузия*

Лептоспироз одна из наиболее распространенных инфекций во многих странах мира, которая чревата значительными социально-экономическими последствиями. В последнее время в мире ежегодно выявляется 873 тыс. случаев этой инфекций, из которых 48 тысяч заканчиваются летальным исходом [5]. Усиление миграционных процессов, интенсификация туризма, изменение климата и глобальное потепление способствуют более широкому распространению этой болезни [4,6,10,11].

В мире лептоспироз распространен неравномерно. В Европейских странах показатель заболеваемости колеблется в пределах от 0,01 до 1,0 на 100 тысяч населения, а в странах с тропическим и субтропическим климатом уровень заболеваемости значительно выше [7,13].

В Грузии лептоспироз относится к инфекциям, которые имеют тенденцию к росту. Значимость заболевания обусловлена и широкой распространенностью этой инфекции в соседней с Грузией Российской Федерации, где ежегодно регистрируется от 1500 до 2500 случаев, в некоторых регионах летальность составляет около 20%. Особенно интенсивно распространена инфекция в Южных Федеральных Округах России, в основном, в Краснодарском крае, который непосредственно граничит с Грузией [1].

Систематическое изучение лептоспироза в Грузии началось с 1950 г., когда в Гудаутском районе были зафиксированы случаи этой инфекции. Серологические исследования подтвердили клинический диагноз. У всех переболевших в крови обнаруживались в высоких титрах антитела к лептоспирам серогруппы Pomona [2,3].

В конце 50-х и в начале 60-х годов в Грузии были проведены масштабные серологические исследования, которые включали обследование населения. Вместе с тем, посредством реакции микроагглютинации, на наличие антител к лептоспирам различных серогрупп был обследован крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, а также отловленные грызуны, преимущественно серые крысы.

В результате, среди населения были выявлены антитела к серогруппам Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae. Установлено преимущественное значение в этиологии заболевания лептоспир серогруппы Pomona. Этот же серотип являлся ведущим среди сельскохозяйственных животных, а среди грызунов доминировали лептоспиры серогруппы Icterohaemorrhagiae [3].

Известно, что этиологическая структура лептоспироза за короткое время может изменяться [8,9,12], чему в немалой степени способствуют социально-экономические преобразования, усиление миграции населения. Вследствие этого не исключено появление новых серогрупп возбудителя.

Учитывая вышеизложенное, целью данного исследования явилось изучение этиологической структуры лептоспироза в Грузии.

**Материал и методы**. Для установления степени распространения лептоспироза и его этиологической структуры проведено лабораторное исследование, включавшее: в период 1994-2005 гг. на базе лаборатории Национального центра контроля заболеваний и общественного здоровья исследование сыворотки крови 195 лиц, подозреваемых на наличие лептоспирозной инфекции, для выявления антител к лептоспирам различных серогрупп. С этой целью применяли реакцию микроагглютинации (МАТ). В этот же период, тем же методом исследовали 125 проб, взятых у сельскохозяйственных животных (коровы, овцы, свиньи). Для установления инфицированности серых крыс (rattus norvegicus), исследовали 160 особей, отловленных в двух районах г. Тбилиси - в Глданском и Надзаладевском.

В период 2010-2012 гг. посредством реакции МАТ исследована также сыворотка крови 28 больных лептоспирозом, которые дали положительный результат при проведении иммуноферментного анализа для установления сероваров и серотипов возбудителя.

Обработку полученных данных проводили с использованием программы Epi info.

**Результаты и их обсуждение.** Как было указано выше, в Грузии лептоспироз регистрируется в течение многих десятилетий. Систематическое изучение этой инфекции в стране началось с 1950 года, когда были выявлены первые случаи заболевания среди населения Гудаутского района. Серологические исследования подтвердили диагноз, поставленный клиническим методом. У всех больных в крови обнаруживались в высоких титрах антитела к лептоспирам серогруппы Pomona. За исключением 1986 г., в последующем периоде в стране регистрировались единичные случаи инфекций.

Начиная с 2000 г., заболеваемость лептоспирозом в Грузии характеризуется устойчивой тенденцией к росту (рис.).

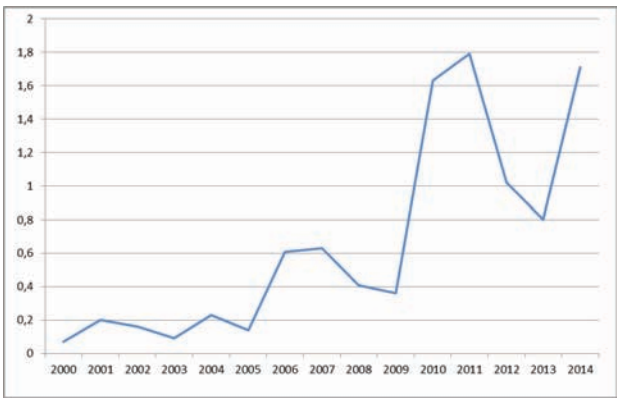



*Рис. Динамика заболеваемости лептоспирозом в Грузии за 2000-2014 гг. (показатель на 100 тысяч населения)*

Особенно интенсивно распространена инфекция в Аджарском регионе, где в 2014 г. показатель заболеваемости составил 11,4 на 100 тысяч населения. Следует предполагать, что теплый и влажный климат этой местности создает исключительно благоприятные условия для распространения лептоспироза. Такой высокий уровень заболеваемости наблюдается, в основном, в странах с тропическим и субтропическим климатом.

Как показывают проведенные исследования, за последние десятилетия в Грузии, в основном, циркулировали лептоспиры тех серогрупп, которые встречались в предыдущем периоде. Так, при серологическом исследовании 195 больных с подозрением на лептоспироз, в 20 случаях получен положительный ответ (10,3±2,2%). У больных чаще всего выявлялись антитела к лептоспирам серогрупп Pomona и Icterohaemorrhagiae (соответственно 45% и 35% случаев). Встречались также L. Grippotyphosa и L. Hebdomadis.

При серологическом исследовании посредством МАТ в сыворотках крови 106 сельскохозяйственных животных положительные результаты получены в 11 случаях (10,4±3,0%). При этом обнаружены специфические антитела к лептоспирам серологических групп Icterohaemorrhagiae, Pomona и Grippotyphosa. Среди обследованных 19 свиней положительный результат получен в 5 случаях, антитела выявлены исключительно к серогруппе Pomona. Что касается грызунов, то из 160 отловленных в г. Тбилиси крыс, большинство были инфицированы лептоспирами. Положительными оказались пробы у 111 грызунов (69,4±3,6%). Заслуживает внимания, что у всех выявлялись антитела только к серогруппе Icterohaemorrhagiae. Результаты исследования инфицированности сельскохозяиственных животных и грызунов объясняют тот факт, что основным возбудителем лептоспироза среди населения являлись L. Pomona и Icterohaemorrhagiae.

Вместе с тем, данные исследования, проведенного в 2010-2012 гг., свидетельствуют, что в настоящее время этиология лептоспироза жителей Грузии весьма мозаична. Среди 28 больных лептоспирозом, у которых иммуноферментный анализ выявил положительный результат, в 16 случаях посредством МАТ были выделены антитела к различным серогруппам лептоспир (таблица).

В результате проведенных исследований установлено, что в крови больных лептоспирозом чаще всего обнаруживаются антитела к серогруппе Sejroe (серовары Wolfii и Hardjio). Следует отметить, что эта серогруппа ранее практически не встречалась. То же самое можно сказать относительно серогруппы L. Australis (серовар Bratislava).

*Таблица. Результаты серологического обследования на лептоспироз сыворотки крови больных*

| Серогруппы лептоспир | Количество положительных в МАТ |
|---|---|
| L. Sejroe | 4 |
| L. Australis | 3 |
| L. Bataviae | 3 |
| L. Icterohaemorrhagiae | 2 |
| L. Pyrogenes | 2 |
| L. Autumnalis | 1 |
| L. Hebdomadis | 1 |

Таким образом, в настоящее время в Грузии выявлены серогруппы лептоспир, которые раньше практически не встречались на территории страны.

Как было отмечено выше, в Грузии в настоящее время отмечается тенденция быстрого роста заболеваемости лептоспирозом. Предполагаем, что это является результатом значительного улучшения качества диагностики этого заболевания. Кроме Тбилиси лабораторная диагностика лептоспироза проводится и в других крупных городах страны. Не исключено, что повышение уровня заболеваемости лептоспирозом обусловлено также появлением в стране новых серогрупп возбудителя, что видимо, является результатом значительной интенсификации миграционных процессов в стране.

В результате проведенного исследования следует заключить, что лептоспироз в стране в настоящее время стал более полиэтиологичным, а заболевание часто вызывается теми серогруппами лептоспир, которые раньше не встречались.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Болоцкий И.А., Семенцов В.И., Пруцаков С.В. и др. Эпизоотическая роль диких животных при лептоспирозе на Северном Кавказе. Ветеринария Кубани 2009; 3: 18-21.
2. Деметрадзе И.Н. Лептоспирозы в Грузинской ССР. Автореферат дисс… канд. мед. наук. Тб.: 1968; 18.
3. Кулов А.Б. Клинико-эпидемиологическая картина иктерогеморрагического лептоспироза среди людей. Материалы научной конференции, посвященной 50-летию Грузинской противочумной станции. Тб.: 1988; 112-115.
4. Adler B., Dela Penia Mactezuma A. Leptospira and Leptospirosis. Vet. Microbiol. 2010; 140(3-4): 287-296.
5. Abela-Ridder B., Bertherat E., Durski K. Prince Mahidol Award Conference 2013. Prince Mahidol Award Conference, Bangkok, Thailand; 2013. Global burden of human Leptospirosis and cross-sectional interventions for its prevention and control.
6. Bandara M., Ananda M., Wickramage K., et al. Globalization of Leptospirosis through travel and migration. Global Health 2014;10(1): 61-73.
7. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). Annual epidemiological report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stokholm: ECDC, 2013. Available from http:/www.ecdc.europa.eu/en/Publications/Publications/annual epidemiological-report-2013. pdf
8. Goris M.G., Boer K.R., Duarte T. et al. Human Leptospirosis trends, the Netherlands, 1925-2008. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19(3): 371-378.
9. Katz A.R., Rucholz A.E., Hinson K. et al. Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999-2008. Emerging Infect. Dis. 2011; 17(12): 221-226.
10. Lagi F., Corti G., Meli M. et al. Leptospirosis acquired by tourists in Venice, Italy. J. Travel. Med. 2013; 20: 128-130.
11. Mc lver L., Hashizume M., Kim H. et al. Assessment of climatesensitive infectious diseases in the Federated States of Micronesia. Trop. Med. Health 2015; 43(1): 29-40.
12. Van Alphen L. B., Lemcke Kunoe A., Ceper T. Trends in human Leptospirosis in Denmark, 1980-2012. Euro Surveill. 2015; 20(4): 21019. Available online: http:/www.eurosurveillance. org/ViewArticle.aspx? Articled=21019
13. Victoriano A.F., Smythe J.D., Gloriani-Barzaga N. et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infect. Dis. 2009; 9: 147-154.

**SUMMARY**

**ETHIOLOGY OF LEPTOSPIROSIS IN GEORGIA**

**[1]Mamuchishvili N., [3]Kuchuloria T., [2]Mchedlishvili I., [1]Imnadze P., [1]Mirzashvili D.**

*[1]National Center for Disease Control and Public Health; [2]Tbilisi State Medical University, Department of Public Health; [3]I. Javakhisvili Tbilisi State University, Department of Public Health, Georgia*

Investigation of leptospirosis was initiated in 1950s, when the first cases in humans were detected in Gudauta rayon. Serology test confirmed the diagnose. High level of antibodies to serogroup Pomona was revealed in all cases. Later on the infection encountered as sporadic cases, the exception was 1986, when a large outbreak was reported in Sukhumi. At present leptospirosis is widely spread in the country, especially in Ajara region, where indicators of morbidity recently reached 11.4 per 100 thousand population. It is likely that warm humid climate creates exceptionally

favorite conditions for spreading of Leptospira.

In order to determine the true magnitude of the infection in the country a seroprevalence study was carried out in 50-60-ies of the past century in humans, agricultural animals and rodents. It was found that serotgroups Pomona, Icteroheamorrhagiae and Grippothypos prevailed in humans, Serogroup L. Pomona - dominated in animals, while in rodents the dominated serotgrouo was L. Icteroheamorrhagiae. Similar study, conducted by us in 1990-2005 showed that L.Pomona and L. Icteroheamorrhagiae prevailed in humans and rodents while L. Icteroheamorrhagiae was the only serogroup isolated in gray rats, trapped in Tbilisi. Infectivity of rodants composed 70%.

Currently lesptosirosis is caused by a new serogroups of Leptospira - L. Sejroe, namely by serotypes Wolfii and Hardjo, L. Australis (serotype Bratislava) and L. Autumnalis along with the previously occurring serogroups L. Icteroheamorrhagiae, L. Bataviae, L. Hebdomadis.

In our opinion the recent increase in leptospirosis in the country is attributable to the improvements in diagnostics of the infection as well as to the emergence of new serogroups of Leptospira, which in turn is a result of intensive migration processes in the country.

**Keywords:** leptospirosis, ethiology, Georgia.

**РЕЗЮМЕ**

**ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЛЕПТОСПИРОЗА В ГРУЗИИ**

**[1]Мамучишвили Н.И., [3]Кучулория Т.С., [2]Мчедлишвили И.М., [1]Имнадзе П.Г., [1]Мирзашвили Д.Ш.**

*[1]Национальный центр контроля заболеваний и общественного здоровья; [2]Тбилисский государственный медицинский университет, департамент общественного здоровья; [3]Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили, департамент общественного здоровья, Грузия*

Изучение лептоспироза в Грузии началось с 1950 года, когда были выявлены первые случай заболевания среди людей в Гудаутском районе. Серологические исследования подтвердили диагноз. У всех переболевших в крови обнаруживались в высоких титрах антитела к лептоспирам серогруппы Pomona. В дальнейшем инфекция встречалась в спорадических случаях. Исключением был 1986 год, когда в Сухуми зафиксировали крупную вспышку. В настоящее время лептоспироз в стране распространен достаточно широко. Особенно интенсивно распространено заболевание в Аджарском регионе, где в 2014 году показатель заболеваемости достиг 11,4 на 100 тысяч населения. Видимо теплый, влажный климат этой местности, создает исключительно благоприятные условия для распространения лептоспироза.

Для выявления масштабов реального распространения этой инфекции в стране в 50-60-ых годах было проведено серологическое обследование людей, сельскохозяйственных животных и грызунов, Установлено, что среди людей преимущественно встречались лептоспиры серогруппы Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa. Среди животных доминировала L. Pomona, а среди грызунов - L. Icterohaemorrhagiae. При проведении нами аналогичных исследований в 1990-2005 годах, выяснилось, что как среди людей, так и среди сельскохозяйственных животных доминировали L. Pomona и L. Icterohaemorrhagiae. А среди серых крыс, отловленных в г. Тбилиси, встречалась только L. Icterohaemorrhagiae. Инфицированность грызунов составляла примерно 70%.

В настоящее время среди людей заболевание вызывается и новыми, ранее не регистрируемыми серогруппами лептоспир - L. Sejroe, а именно сероварами Wolfii и Hardjo, L. Australis (серовар Bratislava) и L. Autumnalis. Однако встречаются и те серогруппы, которые выявлялись и ранее - L. Icterohaemorrhagiae, L. Bataviae, L. Hebdomadis.

По мнению авторов, значительный рост заболеваемости лептоспирозом в Грузии в последнее время, связан не только с улучшением качества диагностики этой инфекции, но и появлением циркулирующих новых серогрупп лептоспир, что, по-видимому, является результатом значительной интенсификации миграционных процессов в стране.

რეზიუმე

ლეპტოსპიროზის ეტიოლოგიური სტრუქტურა საქართველოში

[1]ნ. მამუჩიშვილი,[3]თ. ქუჩულორია,[2]ი. მჭედლიშვილი, [1]პ. იმნაძე,[1]დ. მირზაშვილი

[1]დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრი; [2]თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის დეპარტამენტი; [3]ივ. ჯავახიშვილის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი,საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის დეპარტამენტი, საქართველო

ლეპტოსპიროზის შესწავლა საქართველოში დაიწყო 1950 წლიდან, როდესაც გუდაუთის რაიონში ადამიანებში დაფიქსირდა დაავადების პირველი შემთხვევები. სეროლოგიური კვლევით დადასტურდა დაავადების დიაგნოზი. ყველა ავადმყოფს სისხლში აღმოაჩნდა L. Pomona-ს მიმართ

ანტისხეულების მაღალი ტიტრი. შემდგომში დაავადება ქვეყანაში, როგორც წესი, გვხვდებოდა სპორადული შემთხვევების სახით. გამონაკლისი იყო 1986 წელს, როდესაც ქ. სოხუმში დაავადების დიდი აფეთქება განვითარდა. დღეისათვის საქართველოში ლეპტოსპიროზი საკმაოდ ფართოდ არის გავრცელებული. 2014 წელს ავადობის მაჩვენებელმა 1,71-ს მიაღწია 100 ათას მოსახლეზე. განსაკუთრებით ინტენსიურადაა გავრცელებული ინფექცია აჭარის რეგიონში, სადაც იმავე წელს ავადობის მაჩვენებელმა 100 ათას მოსახლეზე 11,4 შეადგინა. როგორც ჩანს, ამ ტერიტორიისათვის დამახასიათებელი თბილი, ტენიანი კლიმატი ხელსაყრელ პირობებს ქმნის ლეპტოსპიროზის გავრცელებისათვის.

ქვეყანაში დაავადების რეალური გავრცელების მასშტაბების დასადგენად გასული საუკუნის 50-60-იან წლებში ჩატარდა ადამიანების, სასოფლო-სამეურნეო საქონლის და მღრნელების სისხლის სეროლოგიური გამოკვლევა. ამ კვლევებით დადგინდა, რომ ადამიანებში დაავადებას ყველაზე ხშირად იწვევდა L. Pomona-ს, L. Icterohaemorrhagiae-ს, L. Grippotyphosa-ს სეროჯგუფები. შინაურ ცხოველებში დომინირებდა L. Pomona-ს სეროჯგუფი, ხოლო მღრნელებში L. Icterohaemorrhagiae. ანალოგიური კვლევა ავტორთა მიერ ჩატარდა 1994-2005 წლებში. დადგინდა, რომ როგორც ადამიანებში, ისე სასოფლო-სამეურნეო საქონელში წამყვანი სეროტიპები იყო L. Pomona და L. Icterohaemorrhagiae. მღრნელებში, განსაკუთრებით - რუხ ვირთაგვებში, რომლებიც თბილისის ტერიტორიაზე იქნენ დაჭერილი, მხოლოდ L. Icterohaemorrhagiae აღმოჩნდა. ამ სეროტიპით ვირთაგვების ინფიცირების დონე 70%-ს უახლოვდებოდა.

თანამედროვე პირობებში ლეპტოსპიროზი ხშირად გამოწვეულია ლეპტოსპირების ახალი სეროჯგუფებით - L.Sejroe, კერძოდ L.Wolfii და L.Hardjo-ს სეროვარებით, L.Australis-ით (სეროვარი Bratislava) და L. Autumnalis-ით. აღინიშნება, აგრეთვე, ის სეროტიპები, რომლებიც ადრე ქვეყანაში ფართოდ იყო გავრცელებული – L. Icterohaemorrhagiae, L. Bataviae, L. Hebdomadis.

ავტორთა აზრით საქართველოში ლეპტოსპიროზით ავადობის დონის მნიშვნელოვანი ზრდა, გარდა ამ ინფექციის დიაგნოსტიკის გაუმჯობესებისა, განპირობებული უნდა იყოს ქვეყანაში ლეპტოსპირების ახალი სეროჯგუფების გამოჩენით, რაც ალბათ, თავის მხრივ, საქართველოში მიგრაციული პროცესების მკვეთრი ინტენსიფიკაციის შედეგია.

---

## ALTERATIONS OF PROPERTIES OF RED BLOOD CELLS MEMBRANES PROTEINS OF DIFFERENT AGE AND SEX VOLUNTEERS

**Pruidze N., Khetsuriani R., Sujashvili R., Ioramashvili I., Arabuli M., Sanikidze T.**

*Tbilisi State Medical University, Department of Normal Anatomy; Department of Medical Physics and Biophysics; Iv. Beritashvili Center of Experimental Biomedicine, Department of Biophysics, Georgia*

Red Blood Cells (RBC) are multifunctional cells. Besides the transport of gases they participate in the regulation of blood clotting transport of biologically active substances and immune complexes. RBCs play important role in the regulation of blood flow, vascular tone, arterial and venous blood pressure, affect platelets function [12,23]. RBCs have the ability to modulate specific immune response and apoptosis of activated T cells [10], prevent interaction of lymphocyte with endothelium [17], and inhibit the neutrophils' apoptosis [5,6].

It has been shown that the rheological properties of RBCs significantly depend on their membranes properties. Physical and chemical characteristics of the RBCs membrane, its conformational changes are closely related to the intensity of cellular metabolism, enzymatic and receptors activity.

Considering the age and gender-dependent trend in the manifestation of various diseases, as well as an important pathogenic role of circulatory disorders, we decided to study the age-dependent alterations of the physical properties of RBCs membrane proteins (their electric charge and molecular weight) in healthy people of different sex (males and females) and age.

**Materials and methods.** Blood of 56 healthy volunteers (Tbilisi, Georgia) of different sex and age was studied. The patients were divided in 8 groups (7 patients in each groups): 1 – 18-25 years old male, 2 - 18-25 years old female, 3 - 25-44 years old male, 4 - 25-44 years old female, 5 - 44-60 years old male, 6 - 44-60 years old female; 7 – 60-80 years old male, 8 – 60-80 years old female [1]. Volunteers' blood samples (groups 1 -6) were receiving

from the Blood Bank of the Institute of Hematology and Transfusiology (Tbilisi, Georgia), blood samples of volunteers' of groups 7 and 8 were collected in the regional ambulatory center (Tbilisi, Georgia). Individuals often consume alcohol addicts, pregnant women and patients with chronic diseases were excluded from the study. In groups 6 and 8 were women in menopause (was determined according 12 months of amenorrhea [18]).

The study protocol was approved by Ethical Committee of the Tbilisi State Medical University (protocol N39/1).

RBCs membrane proteins have been extracted from human heparinized blood acording to Novgorodseva T. P. [1,2,4,22], modified by R. Sujashvili, I. Yoramashvili (Iv. Beritashvili Experimental Center of Biomedicine, Tbilisi, Georgia) and their electrophoretic mobility was studied by electrophoretic method.

For this purpose:
1. Heparinized blood was centrifuged at 3000 g for 10 minutes.
2. Lower fraction of obtained sediment was taken and washed in phosphate buffer at a ratio of 1:10, 10mM $Na_2HPO_4$, 1.8mM $NaH_2PO_4$, 140mM NaCl, 2.7 mM KCl (isotonic solution) and centrifuged at 3000 g for 10 min.
3. Obtained pallet was resuspended in hypotonic solution of 0.25% NaCl; after homogenization it was centrifuged at 3000 g for 10 min;
4. Sedimented proteins were dried by adding acetone in volume rata 1: 9 and centrifuged at 1000 g for 5 min;
5. Membrane proteins of erythrocytes were dissolved in sample buffer: 0.05M Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, pH6.8.
6. Speed of proteins mobility was studied by SDS-PAGE method (9) using 15%gels.

The electrophoretic mobility of proteins was calculated by the formula:
B= LR/TV $sm^2$/Volt min
where B – electriphoretic mobiliti; L – lenght of camera; R- Protein displacement; T- time of the protein passage; V- Voltage.

Statistical analysis of data was carried out using the "Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (SPSS version 11.0). Data were reported as mean ± SD. A significant level of 0.05 ($p<0.05$) was chosen to assess the statistical significance.

**Results and their discussion.** The electrophoretic mobility of RBCs membrane proteins from patients of the lower age group is much higher and decreases with age. It should be noted that in female patients the electrophoretic mobility of the RBCs membrane proteins especially intensively decreases in period of menopause (Fig. 1).

The electrophoretic mobility of proteins usually increases with an increase of the total charge of the protein which depends on electrically charged amino acids content (at physiological conditions - positively charged arginine, lysine and negatively charged aspartate, glutamate) [24]. Electrophoretic redistribution of membrane cellular components is the primary physical mechanism of intracellular signaling pathways (including phospho-inositol-3-kinase (PI3K) [1] pathway, which participates in the regulation of RBCs functions, their proliferation and survival, cell's mobility and orientation) [11,17,26].

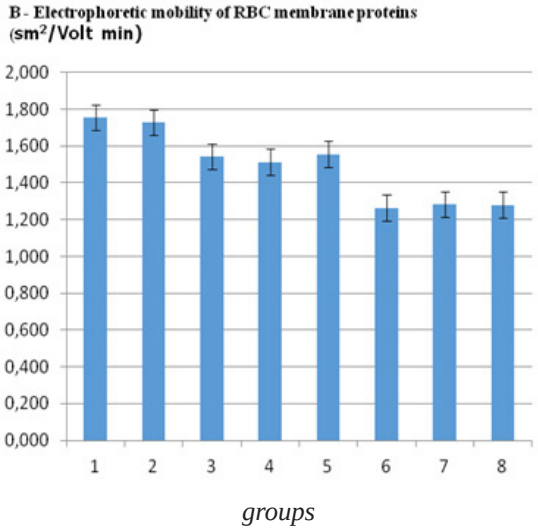
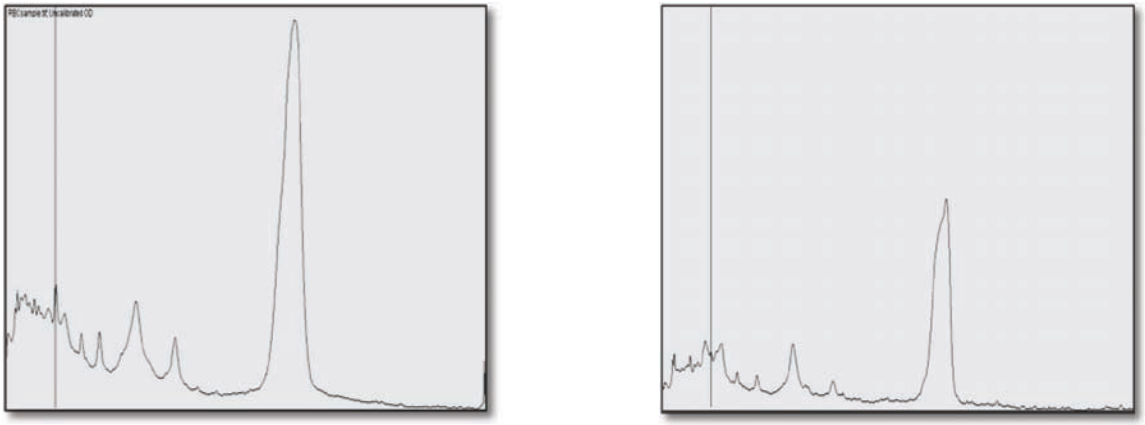



*Fig. 1. Electrophoretic mobility of RBCs membrane proteins from patients of different sex and age groups (1 – 18-25 years old male, 2 - 18-25 years old female, 3 - 25-44 years old male, 4 - 25-44 years old female, 5 - 44-60 years old male, 6 - 44-60 years old female; 7 – 60-80 years old male, 8 – 60-80 years old female)*

Intensively decrease electrophoretic mobility of RBCs membrane proteins from female patients in period of menopause indicates on estrogen related mechanism of the regulation membrane proteins conformation and composition in females.

As it is known, the protective effects of estrogen on RBCs are mediated via activation of membrane estrogen receptors (ER-α, ER-β) [10]. It was shown that the ligand binding domain of the activated estrogen receptor (ER alpha-α) makes the bonds with high mobile groups of membrane proteins, such as negatively charged amino acid Asp-351-containing group [15]. Insufficiency of estrogens in menopause may be accompanied by reduction of estrogen receptors and hence the bonding to the highly mobile negatively charged groups of membrane proteins [26].

Alterations of the properties of RBCs (mechanical, electrical, etc.) is considered to be one of the course of the high level of acute cardiac events in post-menopausal women versus pre-menopausal women and men [7]. This diffe-



a b

*Fig. 2. The densitometry scale of RBCs membrane proteins from patients of different age (a – group 1; b- group 7)*

rence partly is due to the specific distribution of RBCs to their age (increase amount of "young" RBCs) caused by monthly bleeding in pre-menopausal women. This propose is proofed by the results of comparison the mechanical properties of blood of pre-menopausal women and age-matched men, also young and senescent RBCs [12].

On the Fig. 2a,b is shown the densitometry scale of RBCs membrane proteins from patients of different aging groups. From densimometric picture it follows that in RBCs membranes from patients of alder age group high level of the high molecular weight proteins (100-200 kDa) are manifested, low molecular weight proteins almost completely are hydrolyzed.

The membrane proteins play important role in regulation the shape and stability of the RBCs [10,15]. It was shown by Piagnerelli M. et al [21], that concentration of high molecular weight membrane proteins in most of the RBCs from critically ill patients was more higher than in healthy volunteers.

Manifestation of high molecular weight proteins in RBCs membranes from patients of alder age group (or critically ill patients) may be caused to disorders of protein-protein interaction mechanisms, their ubiquitinylation or oligomerisation and formation of complexes of inactivated proteins in aged RBCs [7,16,18]. These processes play important role in regulation of the RBCs shape and stability.

**Conclusion:**

Identified sex- and age-related alterations of RBCs membranes proteins affect the rheological properties of blood and can be considered as the etiologic and pathogenic markers of various diseases.

## REFERENCES

1. Арцруни Г.Г., Саакян Г.В., Погосян Г.А. In vitro воздействие внешнего электростатического поля на физические параметры эритроцитарных мембран. Биофизика 2013; 58(6): 1022-1027.
2. Новгородцева Т.П., Э.А. Эндакова, И.Л. Иванова, Возрастные и половые особенности фосфолипидного состава эритроцитов крыс линии Вистар в процессе постнатального онтогенеза. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова 2002; 88(1): 53-62.
3. Age Standartization and Rates. A new WHO Standarts, 2001.
4. Allen G.M., Mogilner A., Theriot J. A. Electrophoresis of Cellular Membrane Components Creates the Directional Cue Guiding Keratocyte Galvanotaxis. Current Biology 2013; 23: 560-568.
5. Andrews DA, Low PS. Role of red blood cells in thrombosis. Curr Opin Hematol. 1999; 6(2):76-82.
6. Aoshiba K, Nakajima Y, Yasui S, Tamaoki J, Nagai A. Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils. Blood. 1999; 93(11): 4006-10.
7. Chmiel B, Karkoszka H, Cierpka L, Wiecek A. Rheological properties of red blood cells in kidney transplant recipients: the role of lipid profile and type of immunosuppresion. Transplant Proc. 2005 May;37(4):1885-8.
9. Corsi D, Paiardini M, Crinelli R, Bucchini A, Magnani M. Alteration of alpha-spectrin ubiquitination due to age-dependent changes in the erythrocyte membrane. Eur J Biochem. 1999; 261: 775-783.
9. DoucetD. R., BonitzR. P., Feinman BS.R., Colorado I., Ramanathan M., et al. Estrogenic Hormone Modulation Abrogates Changes in Red Blood Cell Deformability and Neutrophil Activation in Trauma Hemorrhagic Shock J Trauma. 2010; 68(1): 35–41.
10. Fonseca AM, Porto G, Uchida K, Arosa FA. Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes. Blood. 2001; 97(10): 3152-60.
11. Kaestner L., Bernhardt I. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. Bioelectrochemistry 2002; 55: 71–74.
12. Kameneva M.V, Garrett K.O., Watach M.J.; Borovetz H.S. Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. Clinical Hemorheology and Microcirculation 1998, 18, 67–74.
13. Kendziorski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments.

Biostatistics 2003; **4:**465-477.
14. Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(5259): 680-5.
15. Liu H, Park WC, Bentrem DJ, McKian KP, Reyes Ade L, Loweth JA, Schafer JM, Zapf JW, Jordan VC. Structure-function relationships of the raloxifene-estrogen receptor-alpha complex for regulating transforming growth factor-alpha expression in breast cancer cells. J Biol Chem. 2002 .
16. Lutz HU. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. Cell Mol Biol. 2004;50*:* 107-*116.*
17. Melder RJ, Yuan J, Munn LL, Jain RK. Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo. Microvasc Res. 2000; 59(2):316-22.
18. Namazi G, Pourfarzam M, Jamshidi Rad S, Movahedian Attar A, Sarrafzadegan N, Sadeghi M, Asa P. Association of the total cholesterol content of erythrocyte membranes with the severity of disease in stable coronary artery disease. Cholesterol. 2014; 2014:821686.
19. Norsigian J., Vivian Pinn. Our Bodies, Ourselves: Menopause. – October 3, 2006 by Boston Women's Health Book Collective
20. Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M: In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. Blood 2006; 108:791-801.
21. Piagnerelli M, Cotton F, Van Nuffelen M, Vincent JL, Gulbis B. Modifications in erythrocyte membrane protein content are not responsible for the alterations in rheology seen in sepsis. Shock 2012; 37(1):17-21.
22. Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology. editor : M.R. Nowrousian. New York: Springer Wien; 2008: 41-43.
23. Ruskovska T, Bennett SJ, Brown CR, Dimitrov S, Kamcev N, Griffiths HR. Ankyrin is the major oxidised protein in erythrocyte membranes from end-stage renal disease patients on chronic haemodialysis and oxidation is decreased by dialysis and vitamin C supplementation. Free Radic Res. 2015; 49(2):175-85.
24. Swanepoel AC, Pretorius E. Erythrocyte-platelet interaction in uncomplicated pregnancy. Microsc Microanal. 2014; 20(6):1848-60.
25. Taniguchi N. Medical Biochemistry, Ed, 2010, p 18
26. Verrier CS1, Roodi N, Yee CJ, Bailey LR, Jensen RA, Bustin M, Parl FF.High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation. Mol. Endocrinol. 1997; 11(8):1009-19.

## SUMMARY

## ALTERATIONS OF PROPERTIES OF RED BLOOD CELLS MEMBRANES PROTEINS OF DIFFERENT AGE AND SEX VOLUNTEERS

**Pruidze N., Khetsuriani R., Sujashvili R., Ioramashvili I., Arabuli M., Sanikidze T.**

*Tbilisi State Medical University, Department of Normal Anatomy; Department of Medical Physics and Biophysics; Iv. Beritashvili Center of Experimental Biomedicine, Department of Biophysics, Georgia*

Considering the age and sex-dependent trend in the manifestation of various diseases, as well as an important pathogenic role of circulatory disorders, we decided to study the age-dependent changes in the physical properties of RBCs membrane proteins (their electric charge and molecular weight) in healthy people of different sex (males and females) and age.

Blood of 56 healthy volunteers (Tbilisi, Georgia) of different sex and gender was studied (the patients were divided in 8 groups (7 patients in each groups): 1 – 18-25 years old male, 2 - 18-25 years old female, 3 - 25-44 years old male, 4 - 25-44 years old female, 5 - 44-60 years old male, 6 - 44-60 years old female; 7 – 60-80 years old male, 8 – 70-80 years old female). In groups 6 and 8 were women in menopause was determined according 12 months of amenorrhea. Individuals often consume alcohol addicts, pregnant women and patients with chronic diseases were excluded from the study. The study protocol was approved by Ethical Committee of the Tbilisi State Medical University.

RBCs membrane proteins have been extracted from human heparinized blood and their mobility was studied by electrophoretic method.

The electrophoretic mobility of RBCs membrane proteins decreases with age of healthy volunteers, that indicates decrease of total charge of proteins, depending on the electrically charged amino acids content. In female patients the electrophoretic mobility of the RBCs membrane proteins especially intensively decreases in period of menopause. Increase of molecular weight of proteins (100-200 kDa) from RBCs' membranes of alder age group was manifested.

Intensively decrease electrophoretic mobility of erythrocytes membrane proteins from female patients in period of menopause indicates on estrogen related mechanism of the regulation of membrane protein conformation and composition in females. Increased content of high molecular weight proteins in the RBCs membranes from patients of older age groups may be caused to disorders of protein-protein interaction mechanisms, their ubiquitinylation or oligomerisation and formation of high molecular weight complexes of inactivated proteins in aged RBCs. These

processes play important role in regulation of the RBCs shape and stability.

Identified sex- and age-related alterations in RBCs membranes proteins affect the rheological properties of blood and can be considered as the etiologic and pathogenic markers of various diseases.

**Keywords:** red blood cells, sex- and age-related alterations, membrane protein content.

**РЕЗЮМЕ**

**ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН ДОБРОВОЛЬЦЕВ С УЧЕТОМ ВОЗРАСТА И ПОЛА**

**Пруидзе Н.К., Хецуриани Р.Г., Суджашвили Р.Ш., Иорамашвили И.В., Арабули М.Б., Саникидзе Т.В.**

*Тбилисский государственный медицинский университет, департамент нормальной анатомии; департамент медицинской физики и биофизики; Научный центр экспериментальной биомедицины им. И. Бериташвили, департамент биофизики, Грузия*

Возрастные и зависимые от пола особенности развития различных заболеваний и их патогенетическая роль в нарушении кровообращения диктует необходимость изучения изменений физических свойств мембран эритроцитов у здоровых лиц различного пола и возраста.

Исследованы электорофоретические показатели белков эритроцитарных мембран в крови добровольцев разного возраста и пола (n=56), проживающих в г. Тбилиси. Исследуемые лица в зависимости от возраста и пола были разделены на 4 группы, по 7 мужчин и женщин в каждой: I группа –18-25 лет; II группа - 25-44 лет; III группа – 44-60 лет; IV группа – 60-80 лет. В группы III и IV были включены женщины с менопаузой (признаком менопаузы считалась 12-месячная аминорея). Из исследования были исключены лица часто употребляющие алкоголь, наркоманы, беременные и больные различными хроническими заболеваниями. Протокол исследования одобрен Комитетом этики Тбилисского государственного медицинского университета (протокол N39/1).

Методом электрофореза исследовалась подвижность белков, выделенных из зритроцитарных мембран гепаринизированной крови добровольцев.

Электрофоретическая активность белков эритроцитарных мембран уменьшалась с увеличением возраста пациентов; более интенсивное уменьшение электрофоретической подвижности белков выявлено у женщин в периоде менопаузы.

У пожилых лиц установлено увеличение молекулярного веса мембранных белков эритроцитов (100-200 кДа).

Значимое уменьшение электрофоретической подвижности эритроцитов в период менопаузы указывает на эстроген-зависимый характер регуляции белкового состава эритроцитарных мембран у женщин. Увеличение удельного веса белков с высокой молекулярной массой в мембранах эритроцитов лиц пожилого возраста, по всей вероятности, обусловлено нарушением механизмов взаимодействия белков, их олигомеризацией, убиквитинизацией и образованием высокомолекулярных комплексов в мембранах стареющих эритроцитов, что играет значимую роль в регуляции их формы и стабильности.

Выявленные в данном исследовании пол- и возраст-зависимые изменения белков эритроцитарных мембран являются причиной изменения реологических свойств крови и рассматриваюстя в качестве этиологического и патогенетического маркеров развития различных заболеваний.

რეზიუმე

ერითროციტის მემბრანის ცილების ცვლილებები სხვადასხვა ასაკისა და სქესის მოხალისეებში

ნ. ფრუიძე, რ. ხეცურიანი, რ. სუჯაშვილი,
ი. იორამაშვილი, მ. არაბული, თ. სანიკიძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ნორმალური ანატომიის დეპარტამენტი; სამედიცინო ფიზიკის და ბიოფიზიკის დეპარტამენტი; ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრი, ბიოფიზიკის დეპარტამენტი, საქართველო

სისხლის ერითროციტების მემბრანის ცილოვანი შემადგენლობა განისაზღვრა ელექტროფორეზის მეთოდის გამოყენებით.

ერითროციტების მემბრანული ცილების მობილობა,რომელიც დამოკიდებულია ცილის საერთო მუხტზე (ელექტრულად დამუხტული ამინომჟავების შემცველობაზე), გაცილებით მაღალი აღმოჩნდა ახალგაზრდა პირებში და მცირდებოდა ასაკთან ერთად. განსაკუთრებით ძლიერი იყო ეს ცვლილებები მენოპაუზის პერიოდში.

ასაკოვანი პირების პერიფერიული სისხლის ერითროციტულ მემბრანებში გამოვლინდა მაღალი მოლეკულური წონის (100-200 კდა) ცილების ხვედრითი წილის ზრდა.

ერითროციტების მემბრანის ცილების ელექტრული მობილობის მნიშვნელოვანი დაქვეითება

მენოპაუზის პერიოდის ქალებში მეტყველებს ერითროციტების მემბრანების ცილოვანი შემადგენლობის ესტროგენ-დამოკიდებული რეგულაციის მექანიზმის შესახებ. მოხუცებულ ასაკში ერითროციტის მემბრანაში მაღალი მოლეკულური მასის მქონე ცილების ხვედრითი წონის ზრდა, სავარაუდოდ, განპირებულია ცილების ურთიერთქმედების მექანიზმების დარღვევით,მათი ოლიგომერიზაციით, უბიქვიტინიზაციით და მაღალმოლეკულური კომპლექსების წარმოქმნით. ეს პროცესები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ერითროციტების ფორმისა და სტაბილობის რეგულაციაში.

ნაშრომში გამოვლენილია ერითროციტული მემბრანული ცილების შემადგენლობისა და სტრუქტურის ასაკობრივი და სქესობრივი (მენოპაუზის პერიოდში) ცვლილებები,რაც აისახება სისხლის რეოლოგიურ მაჩვენებლებში და შეიძლება განიხილებოდეს სხვადასხვა დაავადების ერთ-ერთი ეტიოლოგიურ და პათოგენეზურ მარკერად.

* * *