

Сучасні медичні технології



№ 4(59), жовтень – грудень 2023 р.

<https://zmapo-journal.com>

Науково-практичний журнал
Запорізького державного медико-фармацевтичного університету
ISSN (print): 2072-9367

Заснований у 2008 році. Виходить один раз на 3 місяці.
Ідентифікатор медіа R30-01093, згідно з рішенням Національної ради
України з питань телебачення і радіомовлення від 27.07.2023 № 598

Атестований як наукове фахове видання України категорії «А»,
в якому можуть публікуватися результати дисертаційних робіт
на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук
та ступеня доктора філософії.

Галузь знань – охорона здоров'я (22); спеціальності: медицина – 222;
технології медичної діагностики та лікування – 224; педіатрія – 228 (наказ
МОН України від 09.02.2021 № 157 зі змінами від 25.10.2023 № 1309);
стоматологія – 221; фармація, промислова фармація – 226; терапія та
реабілітація – 227 (наказ МОН України від 25.10.2023 № 1309)

Журнал включений до міжнародних наукометричних баз даних:
Scopus, Google Scholar, DOAJ (Directory of Open Access Journals),
CrossRef, Index Copernicus.

Електронні копії опублікованих статей передаються до Національної
бібліотеки імені В. І. Вернадського для вільного доступу в режимі online

Статті рецензуються за процедурою Double-blind.

Ліцензія Creative Commons

Рекомендовано до друку Вченою радою ЗДМФУ,
протокол від 28.11.2023 № 4. Схвалено до друку 30.11.2023 р.

Редакція:

Начальник редакційно-видавничого відділу О. С. Савеленко.
Технічний редактор Ю. В. Полупан
Літературний редактор С. А. Козиряцька

Адреса редакції та видавця:



Запорізький державний медико-фармацевтичний університет,
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035



journals.zsmu@gmail.com



<https://zmapo-journal.com>

Головний редактор – О. С. Никоненко (Запоріжжя)

Заступник головного редактора – О. В. Ганчева (Запоріжжя)

Відповідальний секретар – М. А. Кубрак (Запоріжжя)

Редакційна колегія

А. В. Абрамов (Запоріжжя)
О. Є. Алипова (Запоріжжя)
Я. С. Березницький (Дніпро)
Л. С. Білянський (Київ)
В. В. Бойко (Харків)
С. Д. Варжапетян (Запоріжжя)
Л. Л. Воронцова (Запоріжжя)
М. Л. Головаха (Запоріжжя)
С. В. Горбачова (Запоріжжя)
І. І. Гук (Відень, Австрія)
Е. Ю. Дорошенко (Запоріжжя)
С. М. Завгородній (Запоріжжя)
Н. Г. Завгородня (Запоріжжя)
Марек Зентек (Вроцлав)
А. Г. Каплаушенко (Запоріжжя)
О. О. Ковальов (Запоріжжя)
І. І. Кополовець (Кошице, Словаччина)
Л. І. Кучеренко (Запоріжжя)
А. С. Лаврик (Київ)
В. В. Лазоришинець (Київ)
Г. О. Леженко (Запоріжжя)
О. Є. Лоскутов (Дніпро)
Н. С. Луценко (Запоріжжя)
Жауме Масія (Барселона, Іспанія)
Альмантас Малецкас (Каунас, Литва)
М. М. Милиця (Запоріжжя)
Є. Л. Михалюк (Запоріжжя)
О. М. Міщенко (Запоріжжя)
С. М. Недельська (Запоріжжя)
Л. С. Овчаренко (Запоріжжя)
В. М. Одинцова (Запоріжжя)
О. Б. Оспанов (Астана, Казахстан)
К. Є. Румянцев (Ужгород)
Д. Ю. Рязанов (Запоріжжя)
Іштван Такач (Мішкольц, Угорщина)
С. І. Тертишний (Запоріжжя)
С. М. Фуркало (Київ)
С. Д. Шаповал (Запоріжжя)
В. Г. Яreshko (Запоріжжя)

В умовах війни надруковано в Центрі видавничого забезпечення ЗДМФУ (пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035)
обмеженим накладом. Свідоцтво про внесення до Державного реєстру від 22.09.2005 ДК № 2298.
Формат 60x84/8. Папір офсетний. Умовн. друк. арк. 6. Замовлення № 9723

Modern medical technology


No. 4 October – December 2023

Scientific and Practical Journal. ISSN (print): 2072-9367

Modern medical technology (established in 2008) is the official journal of ZSMPHU and is published 4 times a year

The journal main purpose is to disseminate information about the results of scientific research that contains innovative ideas among doctors, researchers, medical professionals and teachers. By supporting and continuously deepening the knowledge and practical skills of specialists in the field of medicine, the journal promotes the quality of the provision of medical care and the preservation of the health of all age groups

Submit papers are peer-reviewed. Modern medical technology uses Double-Blind Peer Review

The journal is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license 

Modern medical technology adheres to open access policy. All articles are placed indefinitely immediately after the issue of the number. Full text access in real time to scientific articles of the journal is presented on the official website <https://zmapo-journal.com>

Indexing: Scopus, Google Scholar, DOAJ (Directory of Open Access Journals), CrossRef, Index Copernicus (Poland).

Journal's repository storage and presentation in the portal "Scientific Periodicals of Ukraine" by the Vernadsky National Library of Ukraine

Editorial office: Maiakovskiy Avenue, 26, Zaporizhzhia, 69035, UKRAINE.

E-mail: journals.zsmu@gmail.com

Editor-in-Chief

O. S. Nykonenko
(Zaporizhzhia, Ukraine)

Deputy Editor-in-Chief

O. V. Hancheva
(Zaporizhzhia, Ukraine)

Executive secretary

M. A. Kubrak
(Zaporizhzhia, Ukraine)

Editorial Board

A. V. Abramov (Zaporizhzhia, Ukraine)
O. Ye. Alypova (Zaporizhzhia, Ukraine)
Ya. S. Bereznytskyi (Dnipro, Ukraine)
L. S. Bilianskyi (Kyiv, Ukraine)
V. V. Boiko (Kharkiv, Ukraine)
E. Yu. Doroshenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
S. M. Furkalo (Kyiv, Ukraine)
M. L. Holovakha (Zaporizhzhia, Ukraine)
S. V. Horbachova (Zaporizhzhia, Ukraine)
I. I. Huk (Vienna, Austria)
A. H. Kaplaushenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
I. I. Kopolovets (Kosice, Slovakia)
O. O. Kovalov (Zaporizhzhia, Ukraine)
L. I. Kucherenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
A. S. Lavryk (Kyiv, Ukraine)
V. V. Lazoryshynets (Kyiv, Ukraine)
H. O. Lezhenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
O. Ye. Loskutov (Dnipro, Ukraine)
N. S. Lutsenko (Zaporizhzhia, Ukraine)

Almantas Maleckas (Kaunas, Lithuania)
Jaume Masià (Barcelona, Spain)
O. M. Mishchenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
Ye. L. Mykhaliuk (Zaporizhzhia, Ukraine)
M. M. Mylytsia (Zaporizhzhia, Ukraine)
S. M. Nedelska (Zaporizhzhia, Ukraine)
V. M. Odyntsova (Zaporizhzhia, Ukraine)
O. B. Ospanov (Astana, Kazakhstan)
L. S. Ovcharenko (Zaporizhzhia, Ukraine)
D. Yu. Riazanov (Zaporizhzhia, Ukraine)
K. Ye. Rumiantsev (Uzhhorod, Ukraine)
S. D. Shapoval (Zaporizhzhia, Ukraine)
István Takach (Miskolc, Hungary)
S. I. Tertyshnyi (Zaporizhzhia, Ukraine)
S. D. Varzhapetian (Zaporizhzhia, Ukraine)
L. L. Vorontsova (Zaporizhzhia, Ukraine)
V. H. Yaresko (Zaporizhzhia, Ukraine)
N. H. Zavhorodnia (Zaporizhzhia, Ukraine)
S. M. Zavhorodnii (Zaporizhzhia, Ukraine)
Marek Ziętek (Wrocław, Poland)

Оригінальні дослідження

- 5** Характеристики тромбоцитів у пацієнтів з ішемічною хворобою серця та фібриляцією передсердь
Мельничук І. О.
- 12** Комплексне лікування променевиx уражень слинних залоз після радіюотерапії на основі диференційованого підходу
Копчак А. В., Макаренко В. А.
- 21** Акушерські та перинатальні наслідки пологів у жінок з антенатально не діагностованою затримкою росту плода
Пучков В. А., Павлюченко М. І., Богомолова О. А.
- 27** Оцінювання факторів ризику формування остеопенії в недоношених дітей
Цимбал А. Ю., Котлова Ю. В.
- 37** Комплексне використання вело- і роуег-ергометрії у визначенні фізичної працездатності юних спортсменів
Хорошуха М. Ф., Філіппов М. М., Босенко А. І., Михалюк Є. Л., Буряк О. Ю.
- 45** Вплив стимуляції організму бактеріальним ліпополісахаридом на продукцію та метаболізм оксиду азоту в серці щурів за умов метаболічного синдрому
Акімов О. Є., Микитенко А. О., Костенко В. О.
- 51** Сучасні комплексні підходи до оцінювання ефективності експериментальної моделі нейродегенеративних порушень зі змінами когнітивного статусу
Данукало М. В., Колесник Ю. М., Ганчева О. В.
- 59** Поведінка пробіотичних видів *Bacillus* за умов співкультивування
Книш О. В., Мартинов А. В., Похил С. І., Скляр Н. І.

Клінічні випадки

- 70** Резонансно-частотний аналіз – індикатор постімплантаційної морфології кісткової тканини нижньої щелепи
Ошурко А. П., Олійник І. Ю., Кузняк Н. Б., Герасим Л. М.

Огляд літератури

- 76** Застосування метаболічних, метаболітотропних препаратів і харчових добавок у спорті та спортивній медицині: сучасний погляд на проблему
Бєленічев І. Ф., Горчакова Н. А., Дорошенко Е. Ю., Самура І. Б., Риженко В. П., Бухтіярова Н. В.

Original research

- 5** Platelets characteristics in patients with coronary artery disease and atrial fibrillation
Melnychuk I. O.
- 12** A differentiated approach to complex treatment of radioiodine-induced salivary gland lesions
Kopchak A. V., Makarenko V. A.
- 21** Obstetrical and perinatal consequences of childbirth in women with antenatally undiagnosed fetal growth restriction
Puchkov V. A., Pavliuchenko M. I., Bohomolova O. A.
- 27** Assessment of risk factors for osteopenia development in premature babies
Tsymbal A. Yu., Kotlova Yu. V.
- 37** Complex use of cycle- and power-ergometry in determining the physical working capacity of young athletes
Khoroshukha M. F., Filippov M. M., Bosenko A. I., Mykhaliuk Ye. L., Buriak O. Yu.
- 45** Influence of organism stimulation with bacterial lipopolysaccharide on nitric oxide production and metabolism in rat heart on the background of metabolic syndrome
Akimov O. Ye., Mykytenko A. O., Kostenko V. O.
- 51** Contemporary comprehensive approaches to assessing the effectiveness of experimental model of neurodegenerative disorders with cognitive status changes
Danukalo M. V., Kolesnyk Yu. M., Hancheva O. V.
- 59** The behavior of the *Bacillus* probiotic species under conditions of co-cultivation
Knysh O. V., Martynov A. V., Pokhyl S. I., Skliar N. I.

Clinical cases

- 70** Resonance frequency analysis – indicator of post-implantation morphology of mandibular bone tissue
Oshurko A. P., Oliinyk I. Yu., Kuzniak N. B., Herasym L. M.

Reviews of literature

- 76** Use of metabolites, metabolithotropic agents and nutritional supplements in sports and sports medicine: a modern view on the problem
Bielenichev I. F., Gorchakova N. A., Doroshenko E. Yu., Samura I. B., Ryzhenko V. P., Bukhtiarova N. V.

Platelets characteristics in patients with coronary artery disease and atrial fibrillation

I. O. Melnychuk *

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Key words:

coronary artery disease, atrial fibrillation, amino acids, blood platelets.

Ключові слова:

ішемічна хвороба серця, фібриляція передсердь, амінокислоти, тромбоцити.

Надійшла до редакції / Received: 28.09.2023

Після доопрацювання / Revised: 13.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 25.10.2023

Conflicts of interest:

authors have no conflict of interest to declare.

Конфлікт інтересів:

відсутній.

*E-mail:

ira.merkulova45@gmail.com

The aim. To estimate the connections between platelet morphological characteristics and amino acids (AA) profile in patients with coronary artery disease (CAD) and atrial fibrillation (AF).

Materials and methods. 300 patients were included in the study. They were divided into 3 groups: first (CAD) – 149 patients with CAD but without arrhythmias, second (CAD+AF) – 124 patients with CAD and AF paroxysm and control group – 27 patients without CAD and arrhythmias. Platelets AA level was detected by method of ion exchange liquid column chromatography. Total platelet count (PC), mean platelet volume (MPV), platelets distribution width (PDW), platelet-to-leukocyte (PLR) were obtained from common blood count.

Results. Significant decline of PC and rise of MPV and PLR ratio was found in CAD patients and AF paroxysm in comparison with group with CAD without arrhythmia, $p < 0.05$. Significant increase of isoleucine, leucine and decrease of threonine, serine, glycine, valine levels was found, changes in branched chain amino acids (rise of Isoleucine + Leucine / Valine ratio) and Glycine + Serine (decline Glycine + Serine sum) metabolism were revealed in CAD patients and AF paroxysm in comparison with group with CAD without arrhythmia, $p < 0.05$. Phenylalanine / Tyrosine ratio was significantly elevated in CAD patients with and without AF, $p < 0.05$.

Taurine, serine, and glycine correlated with platelets morphological characteristics: PC ($r = 0.714$, $r = 0.732$ and $r = 0.340$ consequently), MPV ($r = -0.724$, $r = -0.390$ and $r = -0.571$ consequently), PDW ($r = -0.666$ and $r = -0.364$ consequently) and PLR ($r = 0.586$ and $r = 0.648$ consequently), $p < 0.05$. Platelets glycine (AUC = 0.8760), valine (AUC = 0.8707), leucine (AUC = 0.8267) and threonine (AUC = 0.8213) levels are closely connected with AF paroxysm in CAD patients by ROC-analysis results, $p < 0.05$.

Platelets amino acids combinations: Glycine + 0.6 × Valine (AUC = 0.9987), Threonine – 3.6 × Leucine (AUC = 0.9040) were found in prediction AF paroxysm for CAD patients by ROC-analysis results, $p < 0.05$.

Conclusions. Connections between platelets morphology and AA profile violations in patients with CAD and AF paroxysm were found in our study.

Modern medical technology. 2023;(4):5-11

Характеристики тромбоцитів у пацієнтів з ішемічною хворобою серця та фібриляцією передсердь

I. O. Мельничук

Мета роботи – оцінити зв'язки між морфологічними характеристиками та амінокислотним (АК) профілем тромбоцитів у хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС) із фібриляцією передсердь (ФП).

Матеріали та методи. У дослідження залучили 300 пацієнтів, яких поділили на три групи: перша (ІХС) – 149 хворих на ІХС без аритмій; друга (ІХС + ФП) – 124 обстежених з ІХС і пароксизмом ФП; контрольна група – 27 осіб без ІХС та аритмій. Рівень АК тромбоцитів визначали методом іонообмінної рідинної колонкової хроматографії. Загальну кількість тромбоцитів (РС), середній об'єм тромбоцитів (МРВ), ширину розподілу тромбоцитів (РДВ), співвідношення тромбоцитів та лейкоцитів (ПЛР) визначили під час загального аналізу крові.

Результати. У пацієнтів з ІХС і пароксизмом ФП виявлено достовірне зниження РС і підвищення МРВ і ПЛР порівняно з групою з ІХС і без аритмії ($p < 0,05$). У пацієнтів з ІХС і пароксизмом ФП порівняно з групою хворих на ІХС без аритмії встановили значне підвищення рівнів ізолейцину, лейцину та зниження рівнів треоніну, серину, гліцину, валіну; зафіксовано зміни метаболізму амінокислот із розгалуженим ланцюгом (підвищення співвідношення ізолейцин + лейцин / валін) і гліцин + серин (зменшення суми гліцин + серин), $p < 0,05$. Співвідношення фенілаланін / тирозин істотно підвищене в пацієнтів з ІХС з ФП та без неї, $p < 0,05$.

Таурин, серин і гліцин корелюють із морфологічними характеристиками тромбоцитів: РС ($r = 0,714$, $r = 0,732$ і $r = 0,340$ відповідно), МРВ ($r = -0,724$, $r = -0,390$ і $r = -0,571$ відповідно), РДВ ($r = -0,666$ і $r = -0,364$ відповідно) і ПЛР ($r = 0,586$ і $r = 0,648$ відповідно), $p < 0,05$. За результатами ROC-аналізу, рівні гліцину (AUC = 0,8760), валіну (AUC = 0,8707), лейцину (AUC = 0,8267) і треоніну (AUC = 0,8213) тромбоцитів тісно пов'язані з пароксизмом ФП у пацієнтів з ІХС, $p < 0,05$.

У результаті ROC-аналізу комбінації амінокислот тромбоцитів, а саме гліцин + 0,6 × валін (AUC = 0,9987), треонін – 3,6 × лейцин (AUC = 0,9040), запропоновані для прогнозу пароксизму ФП у пацієнтів з ІХС, $p < 0,05$.

Висновки. Визначили зв'язки між змінами морфології та амінокислотного профілю тромбоцитів у пацієнтів з ІХС і пароксизмом ФП.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 5-11

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in adults, and it is associated with significant morbidity and mortality. Coronary artery disease (CAD) is a known AF risk factor. CAD and AF have most mutual risk factors and can worsen clinical picture and prognosis. Stroke is one of the most common AF complications. Ischemic stroke is a prevalent among AF patients. As well as thromboembolism is a common AF complication. Therefore, anticoagulant therapy is the basis in AF treatment [1,2].

Mechanisms of increased platelets activity in CAD patients are well known. But increased prothrombotic tendency pathogenesis in AF patients is still under study. AF is associated with platelets activation. Activated platelets have a lot of prothrombotic and vasoactive properties. Hemostatic balance is represented by platelets condition and its violations leads for supraventricular arrhythmias development [3]. Moreover, platelet-derived biomarkers are an attractive target for secondary prophylaxis in CAD patients, because CAD pathogenesis is directly related to thrombosis occurrence [4].

Recent studies have reported about association of platelets characteristics with AF occurrence. AF is characterized by decreasing platelets count (PC), increasing mean platelet volume (MPV) and platelets distribution width (PDW). MPV is the reliable marker of platelets activation [3]. Branched chain amino acids (BCAA) metabolism is deeply implicated in platelets activation in animal studies. Valine / α -ketoisovaleric acid catabolic pathway switching-on can facilitated platelets activation by increase of integrin expression α IIb β 3 and propionylation of tropomodulin-3 in platelets [5].

Plasma BCAA levels are directly connected with arterial thrombosis. Also, circulating BCAA positively correlates with cardiovascular risks, arterial hypertension, and insulin resistance. In vivo BCAA are capable to increase agonist-induced activation, granule release, aggregation and spreading of platelets [6].

On the other hand, glycine can reduce platelets activation by influencing glycine-gated chlorine channels in platelets [7]. In vitro taurine is also applicable to reduce platelets activations by tissue-type plasminogen activator and extent platelets shape exchange [8].

The role of platelets characteristics in the AF pathogenesis and AF paroxysm prediction remains completely unclear nowadays. Moreover, there is not enough studies about platelets AA profile in AF and CAD patients. Most data on the amino acids role in platelets activation are obtained from animal studies and in vivo experiments.

Aim

To estimate the connections between platelet morphological characteristics and amino acids profile in patients with coronary artery disease and atrial fibrillation.

Materials and methods

We examined 300 patients and divided them into 3 groups: first (I) – 149 patients with CAD and without arrhythmias, second (II) – 123 patients with CAD and AF paroxysm and control group (CG) – 28 patients without CAD and arrhythmias. CAD and AF diagnosis were based on latest ESC guidelines [1,2]. CAD diagnosis was confirmed by history of coronary arteries stenotic changes at invasive coronarography. AF paroxysm was checked by resting 12 leads electrocardiography (ECG).

Exclusion criteria were registered malignancies, chronic kidney disease (Glomerular Filtration Rate, GFR <60 mL/min), valvular AF, heart failure Class III to IV (by New York Heart Association), thyroid pathology, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, vegetarians and vegans, pregnancy, taking probiotics and antibiotics for a month before the study. There were no significant differences in risk factors at baseline between the study groups.

The study was based on and approved by the ethic commission of the Kyiv City Clinical Hospital No. 12. Informed consent was obtained from all subjects in accordance with the Declaration of Helsinki.

Baseline characteristics of study sample are shown in *Table 1*.

Characteristics such as PC, MPV, PDW, platelet-to-leukocyte ratio (PLR) and platelets AA profile were investigated. PC, MPV, PDW, PLR were obtained from common blood count. Platelets AA level was detected by method of ion exchange liquid column chromatography – such AA were identified: lysine, histidine, arginine, ornithine, taurine, asparagine acid, threonine, serine, glutamine acid, proline, glycine, alanine, cysteine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, glutamine, ammonia.

Blood sampling from patients was performed on an empty stomach from the cubital vein on the first day of hospitalization, before treatment. Citrated blood was centrifuged for 10 minutes at a speed of 1500 revolutions per minute. The middle layer was selected with a Pasteur pipette – the plasma is saturated with platelets. The obtained material was again centrifuged for 20 minutes at a speed of 3000 revolutions per minute. The upper supernatant liquid was collected with a Pasteur pipette, and the lower layer was washed with buffer (pH 6.2). Washed platelets were resuspended in buffer (pH 7.4).

Results were presented as mean \pm standard error or [95 % confidence interval (CI)] for continuous variables or as a number for categorical variables. Data were compared using Wilcoxon signed-rank test or Student t-test with two critical regions by the type of distribution; Spearman's rank correlation coefficient. ROC-curve analysis for lipid and inflammatory indexes and linear regression model were done. Area under ROC-curve (AUC) was calculated [8,9,10]. All calculations were done in MATLAB R2014a (License number 271828).

Table 1. Baseline characteristics of study sample, mean \pm standard error

Parameter, units of measurement	CAD	CAD + AF	CG	p1–2	p2–3	p1–3
Age, years	67.71 \pm 3.90	67.96 \pm 0.94	56.25 \pm 2.18	>0.05	>0.05	>0.05
Men, %	48.99	47.97	48.15	>0.05	>0.05	>0.05
BMI, kg/m ²	27.02 \pm 0.33	26.93 \pm 0.43	28.12 \pm 2.10	>0.05	>0.05	>0.05
Uric acid, mmol/L	380.5 \pm 28.16	404.90 \pm 36.11	310.20 \pm 29.12	>0.05	<0.05	<0.05
Total bilirubin, mmol/L	11.30 \pm 0.09	12.40 \pm 0.08	11.70 \pm 0.11	>0.05	>0.05	>0.05
GFR, ml/min	62.03 \pm 2.31	67.73 \pm 1.98	84.01 \pm 5.48	>0.05	<0.05	<0.05
Total cholesterol, mmol/L	5.73 \pm 0.37	6.18 \pm 0.31	4.32 \pm 0.21	>0.05	<0.05	<0.05

Table 2. Platelets characteristics in investigated groups, mean \pm standard error

Parameter	CAD	CAD + AF	CG	p1–2	p2–3	p1–3
PC	240.20 \pm 7.80	210.90 \pm 5.78	305.00 \pm 7.79	<0.05	<0.05	<0.05
MPV	10.86 \pm 0.09	11.87 \pm 0.08	8.13 \pm 0.14	<0.05	<0.05	<0.05
PDW	12.38 \pm 0.17	12.50 \pm 0.14	10.39 \pm 0.20	>0.05	<0.05	<0.05
PLR	34.07 \pm 1.23	48.08 \pm 3.19	30.32 \pm 1.01	<0.05	<0.05	<0.05

Results

Platelets morphological sings were investigated in the studied groups in our study. In the first group significant decrease in PC (21.25 %) and increase in MPV (33.58 %), PDW (20.31 %) and PLR (12.37 %) compared to CG were found. Also, in the second group significant decrease in PC (30.85 %) and increase in MPV (46.00 %), PDW (20.31 %) and PLR (58.58 %) compared to CG were obtained. Moreover, in the second group significant decrease in PC (12.20 %) and increase in MPV (9.30 %) and PLR (41.12 %) compared to the first group were observed.

Results are shown in *Table 2*.

Also, platelets amino acids profile was detected in studied groups in our investigation. In the first group significant increase in isoleucine (12.41 %) and decrease in taurine (20.26 %), serine (9.31 %) and glycine (19.73 %) levels were found in comparison with CG. In the second group we observed significant rise of isoleucine (24.47 %), leucine (10.20 %) and depletion of taurine (19.84 %), threonine (29.37 %), serine (13.90 %), glycine (45.59 %) and valine (27.87 %) levels in comparison with CG. Furthermore, in the second group significant increase of isoleucine (10.73 %), leucine (12.63 %) and decrease of threonine (23.05 %), serine (5.06 %), glycine (32.21 %), valine (30.83 %) levels were found in comparison with the first group.

Results are shown in *Table 3*.

Different AA combinations were compared for deeper understanding their pathogenetic role. We have detected: branched chain AA (BCAA) – Isoleucine + Leucine / Valine ratio, aromatic amino acids (AAA) – Phenylalanine/ Tyrosine ratio, Glycine + Serine sum. Significant increase of Phenylalanine / Tyrosine ratio (10.34 %) and decrease of Glycine + Serine sum (15.73 %) was found in the first group compared to CG. Also, significant increase of Isoleucine + Leucine / Valine ratio (55.28 %) and decrease of

Glycine + Serine sum (33.37 %) was found in the second group compared to CG. Moreover, significant rise of Isoleucine + Leucine / Valine ratio (61.19 %) and depletion of Glycine + Serine sum (20.93 %) was revealed in the second group compared to the first one.

All results are shown in *Table 4*.

Correlation analysis between morphological characteristics of platelets and AA profile in the studied groups was performed. The largest number of correlations was observed between platelets AA profile and their morphological characteristics as PC (total number = 5), PLR (total number = 5) and MPV (total number = 6) levels. On the other hand, the highest number of correlations was found between taurine (total amount = 3), serine (total number = 3) and platelets morphological characteristics.

All correlations are shown in the *Fig. 1*.

ROC-analysis was performed individually for each platelet AA, for further validation of their diagnostic values AUC was established for each platelet AA. Seven acceptable results were found in our study: AUC more then 0.7 was detected for threonine, serine, glutamine acid, glycine, valine, isoleucine, and leucine – it is concern as acceptable result [11].

Results are shown in *Table 5*.

AUC more then 0.8 was found for threonine, glycine, valine, and leucine – we consider this as good result [11].

The best four of obtained ROC-curves are shown in *Fig. 2*.

Also, we tried to find the optimal platelets AA combination with the highest AUC through results of the first and second groups.

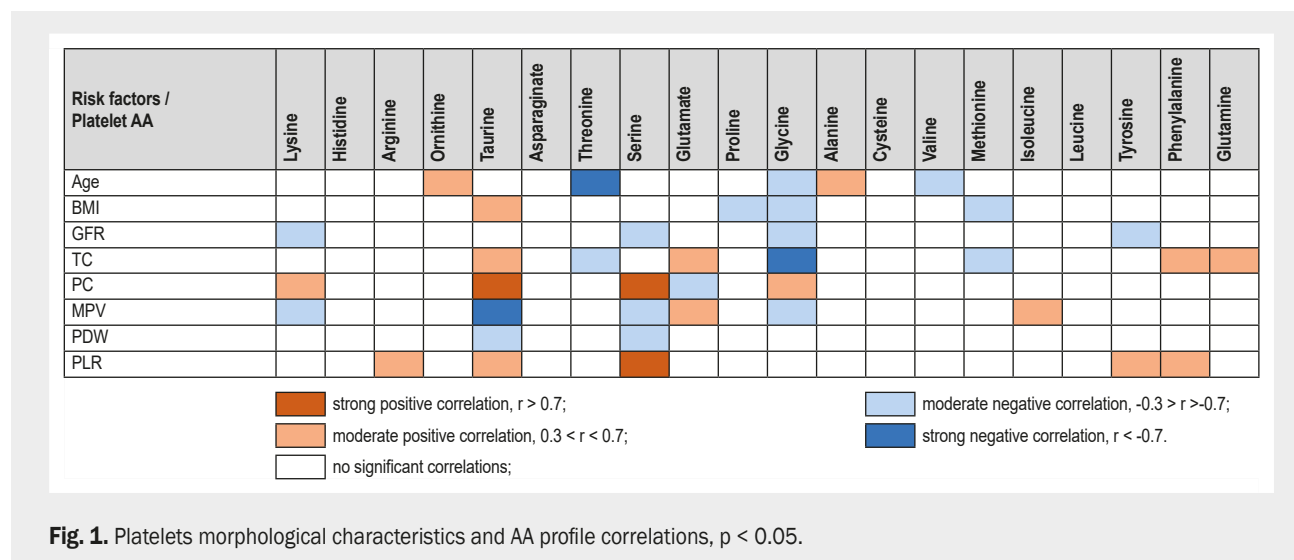
We got two excellent (AUC more then 0.9) [11] combinations: Glycine + 0.6 \times Valine, AUC = 0.9987, $p < 0.05$; Threonine – 3.6 \times Leucine, AUC = 0.9040, $p < 0.05$. ROC-curves are shown in *Fig. 3*.

Table 3. Platelets AA spectrum in investigated groups, mean ± standard error, mkmol/L

Parameter	CAD	CAD + AF	CG	p1-2	p2-3	p1-3
Lysine	100.30 ± 3.81	98.27 ± 3.05	105.60 ± 5.89	>0.05	>0.05	>0.05
Histidine	191.80 ± 5.37	194.20 ± 4.84	194.20 ± 11.26	>0.05	>0.05	>0.05
Arginine	103.50 ± 3.12	102.80 ± 1.86	102.90 ± 7.11	>0.05	>0.05	>0.05
Ornithine	59.64 ± 1.51	58.37 ± 1.82	57.10 ± 3.19	>0.05	>0.05	>0.05
Taurine	3066.00 ± 20.58	3082.00 ± 17.18	3845.00 ± 74.49	>0.05	<0.05	<0.05
Asparagine acid	237.80 ± 4.20	228.90 ± 1.99	234.30 ± 16.21	>0.05	>0.05	>0.05
Threonine	184.40 ± 7.18	141.90 ± 5.53	200.90 ± 7.62	<0.05	<0.05	>0.05
Serine	205.60 ± 2.16	195.20 ± 2.64	226.70 ± 6.35	<0.05	<0.05	<0.05
Glutamine acid	428.00 ± 5.46	415.80 ± 26.13	394.70 ± 18.90	>0.05	>0.05	>0.05
Proline	73.44 ± 1.59	70.90 ± 1.58	68.10 ± 6.18	>0.05	>0.05	>0.05
Glycine	290.00 ± 3.59	196.60 ± 2.19	361.30 ± 17.27	<0.05	<0.05	<0.05
Alanine	375.20 ± 2.76	369.80 ± 3.82	383.90 ± 5.85	>0.05	>0.05	>0.05
Cysteine	88.60 ± 1.71	81.57 ± 1.32	80.80 ± 7.69	>0.05	>0.05	>0.05
Valine	170.60 ± 2.24	118.00 ± 2.12	163.60 ± 11.88	<0.05	<0.05	>0.05
Methionine	75.12 ± 1.11	73.60 ± 0.93	80.40 ± 7.14	>0.05	>0.05	>0.05
Isoleucine	512.70 ± 4.34	567.70 ± 12.55	456.10 ± 16.63	<0.05	<0.05	<0.05
Leucine	199.60 ± 2.28	224.80 ± 4.58	204.00 ± 7.11	<0.05	<0.05	>0.05
Tyrosine	135.30 ± 1.43	147.30 ± 4.18	137.20 ± 8.11	>0.05	>0.05	>0.05
Phenylalanine	86.36 ± 2.24	82.53 ± 1.46	83.90 ± 3.38	>0.05	>0.05	>0.05
Glutamine	306.60 ± 2.90	308.90 ± 4.28	314.70 ± 8.35	>0.05	>0.05	>0.05

Table 4. Plasma AA spectrum combinations in CAD patient with or without AF compared to control group, mean [95 % CI], mkmol/L

Parameter	CAD	CAD + AF	CG	p1-2	p2-3	p1-3
Isoleucine + Leucine / Valine	4.20 ± 0.05	6.77 ± 0.15	4.36 ± 0.52	<0.05	<0.05	>0.05
Phenylalanine/ Tyrosine	0.64 ± 0.02	0.63 ± 0.05	0.58 ± 0.02	>0.05	>0.05	<0.05
Glycine + Serine	495.50 ± 2.82	391.80 ± 3.71	588.00 ± 18.45	<0.05	<0.05	<0.05



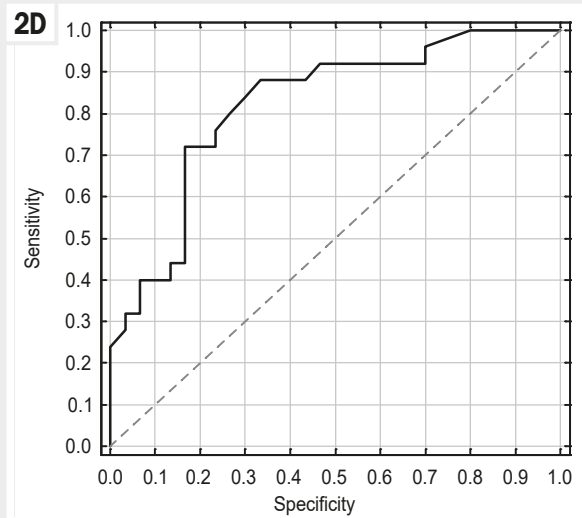
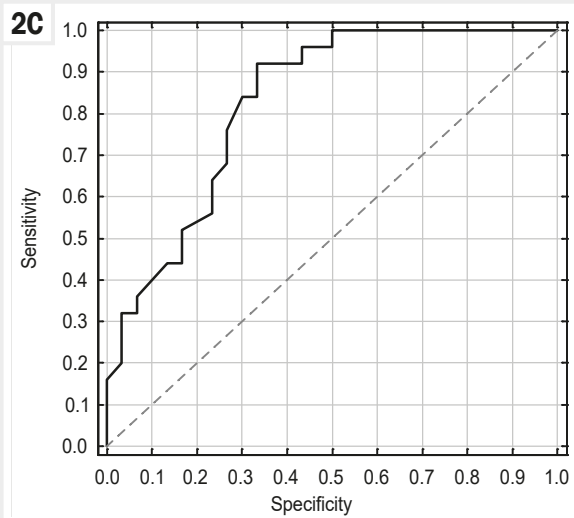
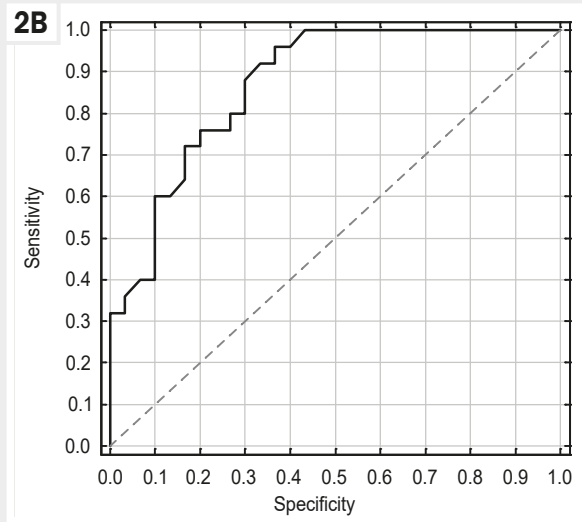
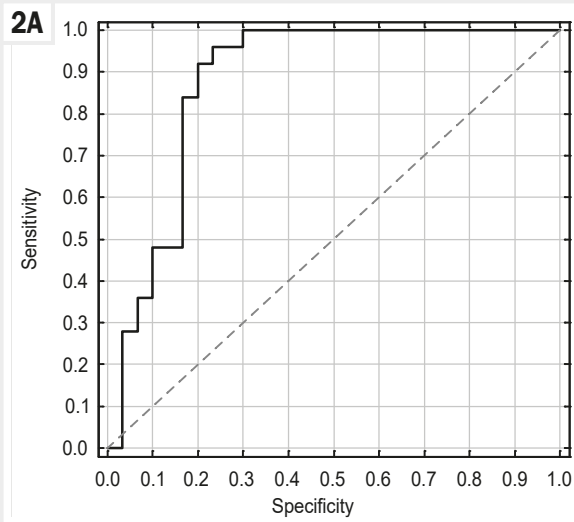


Fig. 2. ROC-analysis of platelets AA in the first and second groups, $p < 0.05$. **A:** Glycine, AUC = 0.8760; **B:** Valine, AUC = 0.8707; **C:** Leucine, AUC = 0.8267; **D:** Threonine, AUC = 0.8213.

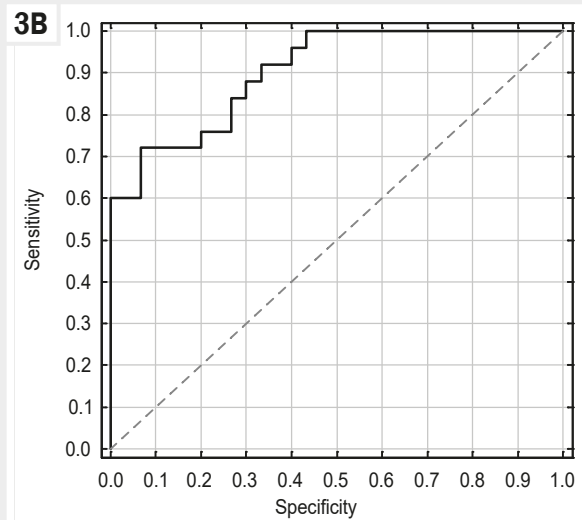
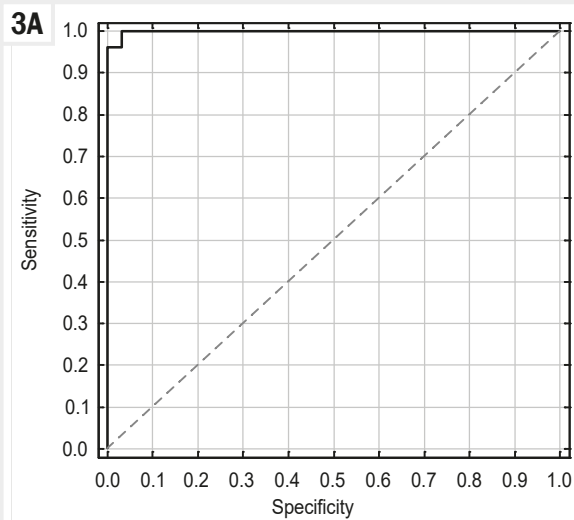


Fig. 3. ROC-analysis of platelets AA combinations in the first and second groups, $p < 0.05$. **A:** Glycine + $0.6 \times$ Valine, AUC = 0.9987; **B:** Threonine - $3.6 \times$ Leucine, AUC = 0.9040.

Table 5. ROC-curve analysis – area under ROC curve for each platelet AA in first and second groups, $p < 0.05$

Platelets AA	AUC
Lysine	0.5313
Histidine	0.5360
Arginine	0.5013
Ornithine	0.5513
Taurine	0.6480
Asparagine acid	0.6180
Threonine	0.8213
Serine	0.7080
Glutamine acid	0.7307
Proline	0.5920
Glycine	0.8760
Alanine	0.5767
Cysteine	0.7353
Valine	0.8707
Methionine	0.5693
Isoleucine	0.7527
Leucine	0.8267
Tyrosine	0.6700
Phenylalanine	0.6727
Glutamine	0.5147

Discussion

Platelets morphological changes during AF paroxysm in CAD patients were found in our study. They included decline of total PC and rise of MPV and PLR. These changes were predictable according to the recent literature data [3,4]. AF paroxysm pathogenesis is based on thrombosis and inflammation processes [3]. Platelet's role in coagulation now is already have proved. It is based on release of variety biological active factors from platelets granules during their activation. They include thrombin, adenosine diphosphate, thromboxane A₂, and the phosphorylation of various target proteins, resulting for high-affinity ligands binding and platelets aggregation. Moreover, platelets α -granules are composed of adhesion proteins (fibrinogen, fibronectin, thrombospondin, vitronectin, von Willebrand factor), chemokines (Platelet factor 4, β -Thromboglobulin, Macrophage inflammatory protein 1 α , etc.), coagulation proteins (factors V, VII, XI, XIII, kininogens, plasminogen, protein S) and growth factors (Angiopoietin-1 and 2, Endothelial cell growth factor, Interleukin-2, 3, 4, 6, 7, and 8, Interleukin- β , etc.), immunoglobulins, protease inhibitors, proteoglycans, etc. [12]. MPV is an important marker of platelets activity. Secretion from platelets granules is characteristic of large cells. By the latest data, MPV is correlated with major cardiovascular risk factors as hypercholesterolemia, dyslipidemia, hyperglycemia, etc. Increased MPV is closely associated with CAD and its compli-

cations. Thus, it can be used as a marker of the risk stratification in CAD patients. PDW is also known, but less sensitive factor of platelets activity. It is also increased for CAD and AF patients, but it also depends on different additional factors [3].

According to our data, PDW was not different in CAD and CAD with AF paroxysm groups. PLR is the possible marker of balance between thrombosis and inflammation: increased PLR can indicate the rise of risk platelets-rich thrombi formation. Also, it promotes inflammatory changes because increased PLR is associated with enhanced megakaryocytes proliferation [4]. However, connections between morphological and biochemical platelets structural changes have not yet been explored.

Platelets amino acids spectrum was investigated in our study: increase of isoleucine, leucine and decrease of threonine, serine, glycine, valine levels was found. Also, significant changes in BCAA (rise of Isoleucine + Leucine / Valine ratio) and Glycine + Serine metabolism were revealed in patients with CAD and AF in comparison with CAD patients without arrhythmias. BCAA metabolism violations directly takes part in thrombosis formation. Excessive plasma BCAA levels correlate closely with thrombosis. Isoleucine and leucine are metabolized in acetate and propionate consequently, valine is metabolized into butyrate. Valine / α -ketoisovaleric acid catabolic pathway has the strongest promotion effect on platelets activation [5]. Moreover, BCAA promote thrombopoiesis by activating mTOR signaling pathway and increasing tropomodulin-3 propionylation [5,13].

Glycine is able to hyperpolarize cellular membrane by increasing chloride conduction. Glycine binds anion channel receptor and chlorine influx increases. It is known that in hyperpolarized cell calcium channel are more difficult to open. So, glycine inhibits platelets aggregation by minimizing of intracellular calcium growth [7]. Serine / threonine protein kinases plays the crucial role in platelets membrane receptors stimulation and subsequent second messenger signaling. Their inhibition blocks multiple intraplatelet and membrane signaling pathways and lead for platelets activation [14]. Phenylalanine / Tyrosine ratio was significantly elevated in CAD patients with and without AF. Tyrosine protein kinases and phosphor-tyrosine signaling pathway also directly regulate platelets activation [15]. Taurine and serine had the largest number of correlations with platelets morphological characteristics in our study. Taurine has known anti-inflammatory and antilipidemic properties. Also, taurine inhibits platelet-derived growth factor BB, that can decline platelets activation [8].

Moreover, in our study we provided ROC-analysis, that showed an improved role of glycine, valine, leucine, and threonine metabolism in AF paroxysm pathogenesis in CAD patients.

Conclusions

Connections between platelets morphology and amino acids profile violations in patients with coronary artery disease and atrial fibrillation paroxysm were found in our study:

1. Significant decline of total platelet count and rise of mean platelet volume and platelet-to-leukocyte ratio was found in coronary artery disease patients and atrial fibrillation paroxysm in comparison to group with coronary artery disease and without arrhythmia, $p < 0.05$;

2. Significant increase of isoleucine, leucine and decrease of threonine, serine, glycine, valine levels were found, changes in branched chain amino acids (rise of Isoleucine + Leucine / Valine ratio) and Glycine + Serine (decline Glycine + Serine sum) metabolism were revealed in coronary artery disease patients and atrial fibrillation paroxysm in comparison with group with coronary artery disease and without arrhythmia, $p < 0.05$;

3. Phenylalanine / Tyrosine ratio was significantly elevated in coronary artery disease patients with and without atrial fibrillation, $p < 0.05$;

4. Taurine, serine and glycine correlated with platelets morphological characteristics: total platelets count ($r = 0.714$, $r = 0.732$ and $r = 0.340$ consequently), mean platelet volume ($r = -0.724$, $r = -0.390$ and $r = -0.571$ consequently), platelets distribution width ($r = -0.666$ and $r = -0.364$ consequently) and platelet-to-leukocyte ratio ($r = 0.586$ and $r = 0.648$ consequently), $p < 0.05$;

5. Platelets glycine (AUC = 0.8760), valine (AUC = 0.8707), leucine (AUC = 0.8267) and threonine (AUC = 0.8213) levels are closely connected with atrial fibrillation paroxysm in coronary artery disease patients by ROC-analysis results, $p < 0.05$;

6. Platelets amino acids combinations: Glycine + $0.6 \times$ Valine (AUC = 0.9987), Threonine – $3.6 \times$ Leucine (AUC = 0.9040) were found for prediction of atrial fibrillation paroxysm in coronary artery disease patients according to ROC-analysis results, $p < 0.05$.

Prospects for further research. Platelets amino acids profile correction will be interesting approach for further investigations.

Funding

The study was done according to the department scientific research work of Bogomolets National Medical University on topic "Changes in protein, carbohydrate and lipid metabolism in patients with coronary heart disease and arterial hypertension with cardiac arrhythmias, the possibility of drug correction", state registration No. 0121U108875 (2021–2023).

Information about author:

Melnychuk I. O., PhD, Associate Professor of the Department of Internal Medicine 4, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-0659-1476](https://orcid.org/0000-0002-0659-1476)



Відомості про автора:

Мельничук І. О., канд. мед. наук, доцент каф. внутрішньої медицини № 4, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

References

- Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2021;42(5):373-498. doi: [10.1093/eurheartj/ehaa612](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa612)
- Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-77. doi: [10.1093/eurheartj/ehz425](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz425)
- Weymann A, Ali-Hasan-Al-Saegh S, Sabashnikov A, Popov AF, Mirhosseini SJ, Nombela-Franco L, et al. Platelets Cellular and Functional Characteristics in Patients with Atrial Fibrillation: A Comprehensive Meta-Analysis and Systematic Review. *Med Sci Monit Basic Res*. 2017;23:58-86. doi: [10.12659/msmbr.902557](https://doi.org/10.12659/msmbr.902557)
- Pasalic L, Wang SS, Chen VM. Platelets as Biomarkers of Coronary Artery Disease. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(3):223-33. doi: [10.1055/s-0036-1572328](https://doi.org/10.1055/s-0036-1572328).
- Xu Y, Jiang H, Li L, Chen F, Liu Y, Zhou M, et al. Branched-Chain Amino Acid Catabolism Promotes Thrombosis Risk by Enhancing TROPOMODULIN-3 PROPIONYLATION in Platelets. *Circulation*. 2020;142(1):49-64. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043581](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043581)
- Hilt ZT, Morrell CN. Essential Amino Acids-Essential in Arterial Thrombosis. *Circulation*. 2020;142(1):65-7. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046817](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046817)
- Schemmer P, Zhong Z, Galli U, Wheeler MD, Xiangli L, Bradford BU, et al. Glycine reduces platelet aggregation. *Amino Acids*. 2013;44(3):925-31. doi: [10.1007/s00726-012-1422-8](https://doi.org/10.1007/s00726-012-1422-8)
- Roșca AE, Vlădăreanu AM, Mirica R, Anghel-Timaru CM, Mititelu A, Popescu BO, et al. Taurine and Its Derivatives: Analysis of the Inhibitory Effect on Platelet Function and Their Antithrombotic Potential. *J Clin Med*. 2022;11(3):666. doi: [10.3390/jcm11030666](https://doi.org/10.3390/jcm11030666)
- Faizi N, Alvi Y. *Biostatistics Manual for Health Research*. Elsevier; 2023.
- Scheff SW. *Fundamental statistical principles for the neurobiologist : a survival guide*. Amsterdam ; Boston: Academic Press is an imprint of Elsevier; 2016.
- Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*. 2010;5(9):1315-6. doi: [10.1097/JTO.0b013e-3181ec173d](https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e-3181ec173d)
- Repsold L, Joubert AM. Platelet Function, Role in Thrombosis, Inflammation, and Consequences in Chronic Myeloproliferative Disorders. *Cells*. 2021;10(11):3034. doi: [10.3390/cells10113034](https://doi.org/10.3390/cells10113034)
- Jiang H, Zhang L, Yang M, Li G, Ding C, Xin M, et al. Branched-chain amino acids promote thrombocytopenia by activating mTOR signaling. *J Thromb Haemost*. 2023;21(11):3224-35. doi: [10.1016/j.jtha.2023.06.039](https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.06.039)
- Shiravand Y, Walter U, Jurk K. Fine-Tuning of Platelet Responses by Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases-Just the Beginning. *Hamostaseologie*. 2021;41(3):206-16. doi: [10.1055/a-1476-7873](https://doi.org/10.1055/a-1476-7873)
- Faria AVS, Andrade SS, Peppelenbosch MP, Ferreira-Halder CV, Fuhler GM. The role of phospho-tyrosine signaling in platelet biology and hemostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021;1868(3):118927. doi: [10.1016/j.bbamcr.2020.118927](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118927)

Комплексне лікування променевиx уражень слинних залоз після радіоїодтерапії на основі диференційованого підходу

А. В. Копчак ^{1,A,D,E,F}, В. А. Макаренко ^{*2,A-E}

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка Національної академії медичних наук України», м. Київ

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

радіоїодтерапія, променеве ураження слинних залоз, диференційований рак щитоподібної залози, слинні залози, хронічний сіалоаденіт, патогенетичні методи лікування.

Key words:

iodine radioisotopes, radiotherapy, radiation-induced damage to the salivary glands, thyroid cancer, salivary glands, chronic sialoadenitis, pathogenetic methods of treatment.

Надійшла до редакції / Received: 18.09.2023

Після доопрацювання / Revised: 10.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 19.10.2023

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

***E-mail:** stom.kovalenko@gmail.com

Кількість пацієнтів із хронічними променевиx ураженнями слинних залоз внаслідок лікування високодиференційованих карцином щитоподібної залози радіоактивним йодом має сталу тенденцію до збільшення. Це зумовлює необхідність пошуку нових патогенетично орієнтованих підходів і методів їх лікування залежно від стадії процесу та факторів ризику.

Мета роботи – визначити клінічну ефективність нового методу патогенетичного лікування на основі диференційованого та персоналізованого підходу до променевиx уражень слинних залоз, спричинених радіоактивним йодом, порівняно з традиційними підходами.

Матеріали та методи. У проспективне дослідження залучили 60 пацієнтів (5 чоловіків і 55 жінок, середній вік становив $45,0 \pm 0,5$ року) із хронічним променевиx ураженням слинних залоз після лікування радіоактивним йодом. Обстежених поділили на дві групи залежно від застосовуваних методів лікування. Клінічну ефективність розроблених методів визначали на основі об'єктивних клінічних критеріїв у термін до 1 року після радіоїодтерапії.

Результати. Встановили, що запропонований підхід давав змогу вірогідно покращити результати лікування порівняно з традиційними методами. Зокрема, застосування розробленого комплексу лікувальних заходів із призначенням глюкокортикоїдів пролонгованої дії, інгібіторів протеолізу та сіалоендоскопічних методик дало змогу через рік після початку лікування досягнути зникнення чи принаймні мінімізації клінічних проявів захворювання у 73,3 % хворих (у контрольній групі – 33,3 % випадків). Лікувальний ефект не виявили лише у 6,7 % хворих порівняно з 20,0 % у контрольній групі.

Під час застосування розробленого підходу порушення відтоку слини та прояви запального процесу усувались ефективніше, а результати, досягнуті в основній групі, достовірно кращі, ніж у контрольній ($\chi^2 = 6,20$, $p < 0,05$ та $\chi^2 = 6,67$, $p < 0,05$ відповідно). Порушення секреторної функції корегувались гірше, особливо на пізніх стадіях захворювання, асоційованих із розвитком тяжких форм ксеростомії.

Висновки. Диференційоване застосування розробленого патогенетично орієнтованого лікувального комплексу дало змогу вірогідно покращити стан хворих із хронічними променевиx ураженнями слинних залоз у термін спостереження до 1 року, а також виявилось достовірно ефективнішим за традиційні способи симптоматичної корекції щодо усунення явищ ретенції слини ($\chi^2 = 6,67$, $p < 0,05$) та проявів запалення ($\chi^2 = 6,20$, $p < 0,05$). Застосування розробленого комплексу лікувальних заходів дало змогу в термін до 12 місяців після травми досягти повного зникнення або мінімізації клінічних проявів захворювання у 73,3 % хворих (у контрольній групі – 33,3 %) та часткового покращення у 20,0 % випадків (у контрольній групі – 46,0 %). Досягнення бажаного клінічного результату та стійкої ремісії клінічних проявів у пацієнтів із хронічними променевиx ураженнями слинних залоз потребувало призначення лікувальних заходів протягом тривалого часу і чіткого дотримання рекомендацій щодо способу життя і гігієни порожнини рота.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 12-20

A differentiated approach to complex treatment of radioiodine-induced salivary gland lesions

A. V. Kopychak, V. A. Makarenko

The number of patients treated with radioactive iodine for highly differentiated thyroid carcinomas who develop chronic radiation-induced salivary gland lesions is constantly rising, that necessitates the search for new pathogenetically focused approaches and methods of treatment considering the stage of the process and pre-existing risk factors.

Aim. The aim of the study was to determine the clinical effectiveness of a new pathogenetic therapy based on a differentiated and personalized approach compared to standard approaches for radioactive iodine-induced salivary glands lesions.

Materials and methods. The prospective study included 60 patients (5 men and 55 women, aged 45.0 ± 0.5 years) with chronic radioactive iodine-induced salivary gland lesions following radiation treatment. The patients were divided into 2 groups depending on the type of therapy they received. The clinical effectiveness of the developed methods was evaluated with the use of objective clinical criteria within a year after radioiodine therapy.

Results. Our approach demonstrated reliably improved treatment outcomes compared to standard techniques. Thus, the treatment we offered, which included long-acting glucocorticoids, proteolysis inhibitors, and sialendoscopic techniques, completely resolved or minimized the clinical manifestations of the disease in 73.3 % of patients (33.3 % in the control group) one year after the start of treatment. The therapeutic effect was not found only in 6.7 % of patients compared to 20.0 % in the control group.

The developed approach effectively eliminated saliva outflow disorders and inflammatory symptoms, with significantly better results of the treatment group compared to the control group ($\chi^2 = 6.20$; $p < 0.05$ and $\chi^2 = 6.67$; $p < 0.05$). The disorders of secretory function were more difficult to correct, especially in the later stages of the disease, associated with severe xerostomia development.

Conclusions. The differentiated use of the developed pathogenetically oriented complex treatment enabled us to significantly improve the condition of patients with chronic radiation-induced sialoadenitis during the observation period of up to 1 year. This treatment also outperformed traditional symptomatic correction in solving the problem of saliva retention ($\chi^2 = 6.67$; $p < 0.05$) and inflammation manifestations ($\chi^2 = 6.20$; $p < 0.05$). Clinical symptoms of the disease were fully resolved or reduced in 73.3 % of patients versus 33.3 % in control group and partially improved in 20.0 % versus 46.0 % of control group within 12 months after radiation exposure. Long-term treatment and strict adherence to lifestyle and oral hygiene recommendations were required to achieve the desired clinical result and stable remission of clinical symptoms in patients with chronic radiation sialoadenitis.

Modern medical technology. 2023;(4):12-20

Проблема діагностики і лікування променевих уражень слинних залоз (СЗ) набуває значної актуальності у зв'язку з широким використанням терапії радіоактивним йодом у пацієнтів із високодиференційованими формами раку щитоподібної залози, а саме з папілярною карциномою щитоподібної залози (ПКЩЗ). Застосування радіоактивного йоду вірогідно зменшує ймовірність рецидиву новоутворення та забезпечує десятирічну виживаність пацієнтів на рівні 80 % і більше [1]. Однак під час застосування цього фармпрепарату у хворих виникає низка побічних ефектів та ускладнень, ймовірність і виразність яких певною мірою залежать від поглинутої дози опромінення. Відомо, що крім тиреоїдної тканини здатність концентрувати радіоактивний йод мають і інші тканини й органи людини: слинні залози, слизова шлунково-кишкового тракту, гонади, молочна залоза під час лактації тощо. Особливо інтенсивно ізотопи радіоактивного йоду накопичуються в тканині слинних залоз [2]. У результаті поглинання значних доз радіоактивного випромінювання в залозах може виникати комплекс структурних і функціональних порушень, що виявляють за розвитком гострого або хронічного сіалоаденіту з виразними ознаками ретенції слини, наступним виснаженням функціональних резервів і появою ксеростомії [3].

Зважаючи на те, що очікувана тривалість життя хворих із високодиференційованими карциномами щитоподібної залози зростає і вірогідно не відрізняється від нормальної, а значна частина таких новоутворень потребує застосування високих доз радіоактивного йоду, кількість пацієнтів із хронічними променевими сіалоаденітами має сталу тенденцію до збільшення.

Зуважимо, що досі немає клінічних настанов і затверджених протоколів лікування високодиференційованих карцином щитоподібної залози, а рекомендації різних авторів нерідко є контрверсійними і не містять необхідного обґрунтування та підтвердження клінічної ефективності з погляду доказової медицини [4].

Лікування наслідків опромінення радіоактивним йодом здебільшого зводиться до симптоматичної терапії. Пацієнти мають дотримуватись відповідного режиму харчування, уникати дегідратації в будь-яких формах, вживати достатній добовий об'єм рідини та виконувати інтенсивний масаж слинних залоз для забезпечення сталого рівня слиновиділення, підтримки дренажної функції протокової системи, профілактики застою слини й утворення слизових пробок у вивідних протоках залоз. Щодо медикаментозної терапії гострого і хронічного променевого сіалоаденіту, то окремі дослідники рекомендують призначення нестероїдних протизапальних препаратів або високих доз дексаметазону (до 40 мг) [5]. У разі виникнення інфекції та розвитку гнійно-запальних процесів (гнійний сіалоаденіт) рекомендують призначення антибіотикотерапії. Коли є ознаки ретенції слини, основним методом лікування залишається інтенсивний зовнішній масаж [6]. Пацієнтам з ознаками функціонального дефіциту та ксеростомії призначають симптоматичне лікування, спрямоване передусім на усунення порушень і запобігання прогресуванню захворювань слизової, пародонта і твердих тканин зубів [7].

Останнім часом для лікування і профілактики станів, пов'язаних із ретенцією слини, запропоновано застосування сіалоендоскопічних технік. Сіалоендоскопію використовують у ранньому і пізньому постпроменевому періоді для ліквідації рубцевих стриктур протокової системи, видалення слизових пробок та інтрапротокового введення стероїдних протизапальних препаратів пацієнтам, які виявилися резистентними до медикаментозної терапії [8,9]. І хоча результати застосування цієї методики позитивні, дослідники вказують на необхідність детальнішого вивчення цього питання та визначення чітких показань до застосування методу [10].

Зазначимо, що ефективність описаного лікування променевих уражень слинних залоз, що має переважно симп-

томатичний характер, залишається вкрай низькою. Відтак проблема пошуку нових патогенетично орієнтованих підходів і методів лікування залежно від стадії процесу та факторів ризику набуває все більшої актуальності.

Мета роботи

Визначити клінічну ефективність нового методу патогенетичного лікування на основі диференційованого та персоналізованого підходу до променевого уражень слинних залоз, спричинених радіоактивним йодом, порівняно з традиційними підходами.

Матеріали і методи дослідження

У проспективне дослідження залучили 60 пацієнтів (5 чоловіків і 55 жінок, середній вік становив $45,0 \pm 0,5$ року) із хронічним променевим ураженням слинних залоз (променевий сіалоаденіт) після перенесеного лікування радіоактивним йодом з приводу ПКЩЗ. Усі пацієнти прооперовані й одержали курс аблятивної терапії радіоактивним йодом на базі ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка Національної академії медичних наук України» за період з 2017 до 2021 рр.

Критерії залучення в дослідження: морфологічно підтверджений діагноз ПКЩЗ, яку видаляли радикально; застосування щонайменше 1 курсу аблятивної терапії радіоактивним йодом; термін від першого курсу радіоїодтерапії більше ніж 1 рік; клінічні ознаки хронічного променевого ураження слинних залоз на час звернення.

Критерії виключення: вік хворих менше ніж 18 років; новоутворення слинних залоз в анамнезі; виявлені злоякісні новоутворення інших локалізацій, що потребували застосування променевої чи хімієтерапії; низький комплаєнс і недотримання пацієнтом лікарських рекомендацій; діагностовані психічні розлади та захворювання центральної нервової системи; період вагітності чи лактації; відмова пацієнта від участі в дослідженні.

Режими радіоїодтерапії. Первинна доза радіоїоду в обстежених варіювала від 100 мСі до 150 мСі (залежно від поширеності та форми пухлинного процесу щитоподібної залози, характеристик TNM, наявності метастазів, інвазивності й агресивності морфологічної форми) [11,12].

Через 6–12 місяців після видалення пухлини та ад'ювантної радіоїодтерапії здійснили діагностичне обстеження радіоактивним йодом. Продовження радіоїодтерапії емпіричними рівнями (100–200 мСі) призначали пацієнтам із достовірно підвищеним рівнем тиреоглобуліну або антитіл до тиреоглобуліну, а також якщо виявлено мікрометастази в легені (в цьому разі радіоїодтерапію повторювали кожні 6–12 місяців, поки метастази продовжували накопичувати радіоїод і давати клінічну відповідь).

Усіх пацієнтів поділили на 2 групи (по 30 осіб у кожній), зіставні за віком, статтю і тяжкістю клінічних проявів променевого уражень слинних залоз. В основній групі хворі отримували традиційне лікування, що передбачало застосування слиногінних засобів, рекомендації щодо режиму харчування

та прийому рідини, масаж слинних залоз, симптоматичне призначення нестероїдних протизапальних засобів, а також антибіотики широкого спектра дії в разі появи інфекції та розвитку гнійного сіалоаденіту. У другій групі для лікування променевого уражень слинних залоз застосували розроблений нами алгоритм диференційованого призначення лікувальних засобів, що ґрунтується на даних комплексного клінічного оцінювання виразності порушень секреції, слиновідведення та виразності запального процесу в ураженій залозі.

Диференційований алгоритм лікування променевого уражень слинних залоз. Запропонована концепція лікування хронічних променевого сіалоаденітів у пацієнтів, які отримували терапію радіоактивним йодом (основна група), ґрунтувалася на визначенні характеру і виразності трьох основних ланок патогенезу цього захворювання, як-от ретенція слини (Р), зниження секреторної функції (С) залози, інтенсивність запального процесу (З). Надалі здійснювали корекцію виявлених порушень відповідними засобами. Для цього на основі клінічного обстеження оцінювали критерії РСЗ та їхню виразність (табл. 1). Якщо клінічні ознаки ураження виявляли не в усіх великих слинних залозах та/або їхня виразність у залозах різна, критерій визначали за найбільш ураженою залозою.

Призначена терапія спрямована на всі наведені ланки патогенезу, передбачала застосування різних лікувальних засобів залежно від тяжкості клінічних проявів (табл. 2).

Методика сіалоендоскопії. Для лікування пацієнтів із вираженими ознаками ретенції слини застосовували бужування вивідної протоки та сіалоендоскопію, спрямовану на усунення стриктур та очищення просвіту протоки. Для цього ділянку устя вивідної протоки ураженої залози анестезували 4 % Артикаїном. Вхідний отвір поступово розширювали за допомогою тупих зондів і бужів діаметром, що збільшувався від 0 до 5, після чого в протоку вводили одноканальний сіалоендоскоп KarlStorz (KarlStorzEndoscopy, ElSegundo, CA) діаметром 1,3 мм. Процедура поєднували з інтенсивним промиванням для видалення слизових пробок і запального ексудату. В більшості хворих процедуру виконали одноразово, лише у 2 випадках, коли не спостерігали очікуваний клінічний ефект, через 3 місяці здійснили повторну сіалоендоскопію.

Клінічне обстеження. Для обстеження пацієнтів обох груп застосовували стандартний діагностичний алгоритм, заснований на загальноклінічних методах. Він передбачав збір анамнезу, оцінювання загального та локального статусу з визначенням стану слинних залоз та їхніх вивідних протоків, слизової оболонки порожнини рота, зубів і пародонта. У всіх пацієнтів враховували особливості основного захворювання (клінічну стадію тиреоїдної карциноми, її класифікацію за TNM, гормональний статус) та ефективність вжитих лікувальних заходів. Стан слинних залоз оцінювали за ступенем їх збільшення, болючості, за наявністю ущільнень, станом вивідних протоків і характером слини, що виділяється. Також дослідили секреторну активність великих слинних залоз під час мануальної, вербальної та харчової стимуляції.

Стан слизової оболонки ротової порожнини оцінювали на підставі огляду, звертали увагу на ступінь її зволоження, наявність гіперемії, нальотів, а також інших елементів ураження. Враховували наявність таких клінічних симптомів:

Таблиця 1. Визначення виразності патогенетичних змін слинних залоз у пацієнтів із променевими ураженнями, що спричинені дією радіоактивного йоду (¹³¹I)

Критерій	Помірна (1 бал)	Середня (2 бали)	Виражена (3 бали)
Ретенція (Р)	Періодична поява припухлості і болю / дискомфорту на ділянці залози під час їди з тривалими «світлими» проміжками (тижні, місяці), збільшення слиновиділення під час масажу залози.	Часті епізоди припухлості та болю під час їди, зменшене слиновиділення, зокрема під час масажу залози, виділення густого слизу з вивідних протоків, утворення «слизових пробок».	Постійна припухлість та/або болісність залози, що посилюється під час їди, різке зменшення слиновиділення, наявність структурних змін вивідних протоків (стриктури, дилатація, перидуктальний фіброз тощо).
Секреція (С)	Періодичне відчуття сухості, зокрема при зменшеному споживанні рідини, під час тривалої розмови, приймання сухої їжі. Під час вербальної та харчової стимуляції слиновиділення збільшується.	Часте відчуття сухості, що може з'являтися мимоволі, незалежно від їди, виділення слизу з вивідної протоки під час масажу, слабо-виражене слиновиділення при вербальній чи харчовій стимуляції або його зовсім немає. Поява солонуватого та/або металевого присмаку.	Постійне відчуття сухості, вторинні зміни слизової оболонки порожнини рота, що характерні для ксеростомії, зниження або спотворення смакових відчуттів.
Запалення (З)	Незначний біль / дискомфорт і припухлість, що тривають менше ніж годину після виникнення, а потім повністю зникають. Симптоми не заважають звичайній щоденній активності, їх можна легко усунути шляхом прийому нестероїдних анальгетиків.	Помірний біль / дискомфорт і припухлість / інфільтрація залози, що тривають більше ніж годину, біль під час пальпації, постійне / тривале відчуття дискомфорту в залозі, що знижує якість життя, потреба в частому прийманні анальгетиків. Виділення з протоку – мутна слина з домішками пластівців, слизу тощо.	Виразний біль / дискомфорт, що суттєво знижує якість життя і працездатність, інфільтрація та ущільнення залози. Слина з протоки майже не виділяється або є гнійні виділення.

*: відсутність ознак – 0 балів.

Таблиця 2. Алгоритм комплексного лікування променевих уражень слинних залоз на основі критеріїв РСЗ

Критерій	Помірна	Середня	Виражена
Ретенція (Р)	Масаж залози, слиногінна дієта.	Слиногінна дієта, стимуляція слиновиділення харчовими кислотами.	Лімфотропне або введення інгібіторів протеолізу в залозу (апротинін 20 000 КЮД через день № 5), симптоматичне застосування нестероїдних анальгетиків.
Секреція (С)	Промивання вивідних протоків уражених залоз розчинами ферментів (трипсин, хімотрипсин).	Медикаментозна стимуляція аскорбіновою кислотою (по 100 мг 2–3 рази на добу, повільно розжовувати) або розчином пілокарпіну (1 % розчин по 5–10 крапель під язик тричі на день).	Введення глюкокортикостероїдів пролонгованої дії в залозу (Дипроспан по 1 мл № 1–3, інтервал між ін'єкціями – 1,0–1,5 міс.).
Запалення (З)	Бужування вивідних протоків. Сіалоендоскопія.	Симптоматична та замісна терапія (DentaidXeros, BioXtra гель або спрей, Xerostom тощо), регулярне зволоження слизової оболонки, полоскання розчином антисептика (Декасан, Діоксидин, Мірамістин тощо), Лісобакт по 1 т 4 рази на день або штучний лізоцим.	Призначення антибактеріальних препаратів за результатами бакпосіву з визначенням чутливості мікрофлори.

сухість у роті, складність пережовування та ковтання сухої їжі, утруднення вимови окремих звуків через сухість у порожнині рота, спотворення та/або зниження смаку.

Структурні зміни паренхіми привушних і підщелепних слинних залоз оцінювали за результатами застосування додаткових методів обстеження: УЗД, сіалосцинтиграфії, сіалографії, МРТ, – які призначали за потреби.

Визначення ефективності лікування в обох клінічних групах ґрунтувалося на зменшенні виразності клінічних

симптомів і динаміці критеріїв РСЗ. Пацієнтів обстежили перед призначенням терапії, а також у термін 3, 6 і 12 місяців після її початку. У разі несподіваного погіршення стану, виникнення нових симптомів чи проявів побічної дії призначених лікувальних засобів пацієнтів обстежували додатково. За результатами контрольних оглядів терапію корегували. Бажаним результатом вважали зникнення клінічних проявів і досягнення сталої ремісії або зменшення цих ознак до помірного рівня (за всіма критеріями). Тривалість ремісії забез-

Таблиця 3. Розподіл обстежених за віком і статтю

Вік, роки	Основна група		Контрольна група		Всього	
	Чоловіки	Жінки	Чоловіки	Жінки	Чоловіки	Жінки
Менше ніж 30	0	5	1	3	1	8
30–39	1	5	0	7	1	12
40–49	0	7	1	9	1	16
50 і більше	1	11	1	8	2	19
Всього	2	28	3	27	5	55

Таблиця 4. Виразність критеріїв РСЗ у групах порівняння залежно від способу лікування, n (%)

Критерій	Ретенція (Р)		Секреція (С)		Запалення (З)	
	До лікування	Через 12 міс.	До лікування	Через 12 міс.	До лікування	Через 12 міс.
Контрольна група						
Немає / помірна	4 (13,3 %)	24 (80,0 %)	14 (46,7 %)	14 (46,7 %)	3 (10,0 %)	21 (70,0 %)
Середня	14 (46,7 %)	5 (16,7 %)	7 (23,3 %)	10 (33,3 %)	13 (43,3 %)	9 (30,0 %)
Виразна	12 (40,0 %)	1 (3,3 %)	9 (30,0 %)	6 (20,0 %)	14 (46,7 %)	0 (0,0 %)
Основна група						
Немає / помірна	3 (10,0 %)	30 (100,0 %)	7 (23,3 %)	22 (73,3 %)	2 (6,7 %)	27 (90,0 %)
Середня	13 (43,3 %)	0 (0,0 %)	9 (30,0 %)	6 (20,0 %)	10 (33,3 %)	2 (6,7 %)
Виразна	14 (46,7 %)	0 (0,0 %)	14 (46,7 %)	2 (6,7 %)	18 (60,0 %)	1 (3,3 %)
Загалом						
Немає / помірна	7 (11,7 %)	54 (90,0 %)	21 (35,0 %)	36 (60,0 %)	5 (8,3 %)	48 (80,0 %)
Середня	27 (45,0 %)	5 (8,3 %)	16 (26,7 %)	16 (26,7 %)	23 (38,3 %)	11 (18,3 %)
Виразна	26 (43,3 %)	1 (1,7 %)	23 (38,3 %)	8 (13,3 %)	32 (53,4 %)	1 (1,7 %)

печували відповідною дієтою, масажами залози та контролем гормонального фону в ендокринолога.

Для визначення характеру розподілу вибірки застосували критерій перевірки нормальності Колмогорова–Смирнова. Статистичний аналіз результатів передбачав розрахунок середніх величин, середньоквадратичного відхилення, похибки середньої, медіани та перцентилів (для параметрів, що не відповідали закону нормального розподілу). Вірогідність розбіжностей між показниками оцінювали з використанням непараметричного критерію Манна–Вітні та критерію χ^2 Пірсона (для якісних показників). Статистичні розрахунки виконали в програмному середовищі SPSS Statistics (IBM SPSS, США).

Дослідження схвалені комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та здійснені за письмовою згодою учасників і відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальної декларації про біоетику та права людини» (ЮНЕСКО). Експертизу матеріалів роботи проведено комісією з біоетики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол від 21.12.2018 р. №117).

Результати

Розподіл хворих за віком і статтю в групах порівняння наведено в таблиці 3.

Середня кількість курсів ад'ювантної радіоїодтерапії та загальні дози радіоактивного йоду становили в основній групі $1,70 \pm 0,84$ мСі та $156,0 \pm 61,4$ мСі відповідно, в контрольній – $1,60 \pm 0,62$ мСі та $148,0 \pm 61,2$ мСі відповідно. Розбіжності за цими показниками в групах порівняння не достовірні ($p > 0,05$). Розподіл хворих за виразністю патогенетичних критеріїв РСЗ, що визначали тяжкість променевого сіалоаденіту, у групах порівняння наведено в таблиці 4.

До початку лікування не виявили достовірних відмінностей за тяжкістю клінічних проявів (за наведеними критеріями) у групах порівняння. У процесі лікування в обох групах встановили позитивну тенденцію, що спостерігали за зменшенням виразності клінічних проявів ретенції слини та запального процесу, дещо меншою мірою – секреторної активності слинних залоз.

В основній групі суттєве зниження індексів РСЗ визначили вже через 3 місяці від початку лікування, однак позитивна динаміка зберігалась до 12 місяця (рис. 1). Бажаний результат (0–1 бал за всіма показниками) лікування через 1 рік після

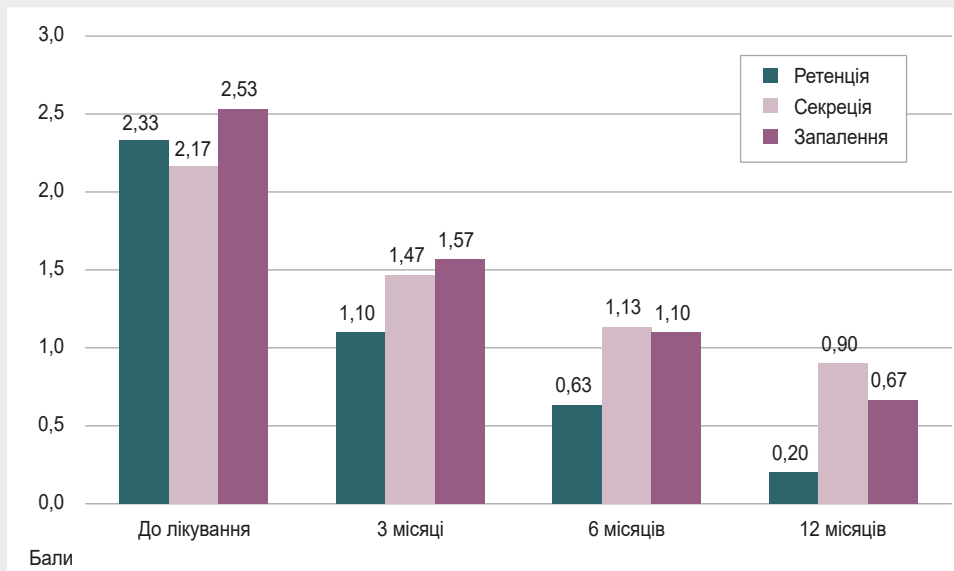


Рис. 1. Зміни середніх значень індексів РСЗ в основній групі хворих.

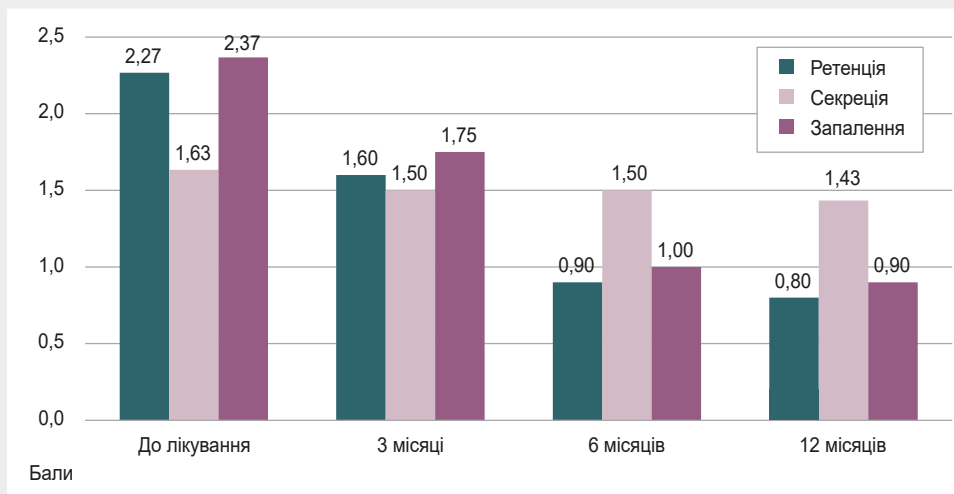


Рис. 2. Зміни середніх значень індексів РСЗ в контрольній групі.

його початку досягнуто у 22 (73,3 %) хворих, часткове покращення – у 6 (20 %). Позитивний ефект не зафіксований у 2 (6,7 %) пацієнтів, що пов'язано з неможливістю скорегувати тяжкі прояви ксеростомії на тлі повної втрати функціональної здатності слинної залози, а отже й неможливістю контролювати рецидивний перебіг запального процесу в ній. У термін 12 місяців стан хворих за всіма індексами РСЗ вірогідно кращий: частота виявлення виразних форм ретенції слини зменшувалась на 47 %, запалення – на 57 %, секреторних порушень – на 40 % від загальної кількості хворих.

У контрольній групі, де застосовували традиційні підходи, протягом 12 місяців також спостерігали позитивну динаміку (рис. 2), проте менш виразну, ніж в основній групі. У пацієнтів контрольної групи встановили достовірне зниження індексів Р (ретенція) та З (запалення), однак покращення щодо секреції слини не було вірогідним. Через рік від початку лікування бажаного результату (0–1 бал за всіма критеріями) досягнуто

лише у 10 (33,3 %) хворих, частково досягнуто – у 14 (46,6 %); позитивний ефект не зареєстрували в 6 (20,0 %) випадках. Зауважимо, що виразність клінічних проявів ретенції слини та запалення залишалась вірогідно нижчою, ніж в основній групі. Встановили також гірші параметри секреції, ніж в основній групі (частота виразних форм ксеростомії вища на 13 %); втім, зважаючи на кількість спостережень, ці відмінності не достовірні ($p > 0,05$) (табл. 5).

Обговорення

Хронічний променевий сіалоаденіт, що виникає як ускладнення радіоїодтерапії у пацієнтів із високодиференційованими формами раку щитоподібної залози, за даними наукової літератури, виявляють у 11–43 % осіб, які одержували лікувальні дози радіоактивного йоду [4]. Розвиток хронічного променевого сіалоаденіту супроводжується зниженням

Таблиця 5. Вірогідність розбіжностей показників РСЗ у групах порівняння за критерієм χ^2 Пірсона

Критерій	Ретенція (P)	Секреція (C)	Запалення (З)
Основна група			
До лікування vs після лікування	$\chi^2 = 49,1$ $p < 0,01$	$\chi^2 = 17,4$ $p < 0,01$	$\chi^2 = 42,1$ $p < 0,01$
Контрольна група			
До лікування vs після лікування	$\chi^2 = 27,9$ $p < 0,01$	$\chi^2 = 1,13$ $p = 0,57$	$\chi^2 = 28,2$ $p < 0,01$
До лікування			
Основна група vs контрольна група	$\chi^2 = 0,33$ $p = 0,85$	$\chi^2 = 3,67$ $p = 0,16$	$\chi^2 = 1,09$ $p = 0,58$
Після лікування			
Основна група vs контрольна група	$\chi^2 = 6,67$ $p < 0,05$	$\chi^2 = 4,78$ $p = 0,09$	$\chi^2 = 6,2$ $p < 0,05$

слиновидільної функції, формуванням ксеростомії та інших патологічних станів слинних залоз, слизової оболонки порожнини рота, зубів та пародонта; ці стани тривають роками та суттєво знижують якість життя у багатьох хворих [13].

Традиційні підходи ґрунтуються на корекції слиновидільної функції шляхом дотримання відповідної дієти, контролю балансу рідини та систематичного масажування великих слинних залоз на тлі призначення препаратів симптоматичної та замісної дії (контрольна група). За нашими даними, з часом це сприяє певному покращенню стану у 80 % хворих. Зауважимо, що цей ефект реалізується повільно (протягом місяців) і лише у 33,3 % хворих досягає рівня, який можна вважати бажаним (зникнення або мінімізація клінічних проявів). У 20,0 % пацієнтів стан залишається незмінним або погіршується, а в 46 % покращення не зумовлює зникнення клінічних симптомів, які продовжують негативно позначатись на якості життя. Ці дані узгоджуються з результатами, наведеними в працях інших дослідників щодо недостатньої ефективності традиційних засобів [5,10].

Зважаючи на наведені факти, здійснили дослідження з розроблення й обґрунтування комплексу лікувальних заходів патогенетичного спрямування для пацієнтів із променевими сіалоаденітами на тлі приймання радіоактивного йоду, а також вивчення його ефективності в термін спостереження до 1 року.

Згідно з сучасними уявленнями, у патогенезі хронічного променевого сіалоаденіту розрізняють такі компоненти [14]:

- гостра чи хронічна ретенція слини, спричинена в ранньому постпроменевому періоді звуженням вивідних протоків запальним інфільтратом і трансудатом, утворенням у протоках слизових пробок, що, крім муцину, містять сироваткові протеїни, злушений епітелій і лейкоцити. Згодом більшого значення набувають явища інтерстиціального фіброзу та морфологічні зміни протокової системи (злушення епітелію, формування стриктур і дилатація протоків на окремих ділянках);

- зниження або повна втрата секреторної здатності однієї чи кількох великих слинних залоз, зумовлена склеротичними змінами в паренхімі залози, порушенням секреторної функції ацинарних клітин, зниженням капілярного кровотоку, глибоким виснаженням функціональних резервів і невідповідністю компенсаторно-приспосувальних механізмів;

- запальний процес, що виникає в тканинах слинної залози, внаслідок первинної та вторинної альтерації, спричиненої дією іонізуючого опромінення. До нього в пізніші періоди додається бактеріальний компонент, що зумовлений зменшенням об'єму виділеної слини, зміною її фізико-хімічних, імунологічних властивостей та знижує резистентність тканини залози до інфекції [15,16].

Для об'єктивного оцінювання виразності клінічних проявів порушень функції слинних залоз, що пов'язані з кожною з ланок патогенезу, розроблено індексну шкалу, що визначала тяжкість хронічного променевого сіалоаденіту в пацієнтів, які отримували терапію радіоактивним йодом; цю шкалу застосовували також для інтегрального оцінювання динаміки клінічних проявів під час лікування. Результати клінічного дослідження при цьому можна було підтвердити даними об'єктивних і більш точних методів дослідження (сіалоцинтиграфія, сіалометрія, сіалографія та/або МРТ слинних залоз). Зауважимо, що в основу запропонованого алгоритму покладено саме клінічну діагностику, яка є доступною для переважної більшості стоматологів-практиків, та оцінювання основних клінічних симптомів, що можуть бути легко виявлені та однозначно визначені за типами, характеризують відповідні критерії з необхідною точністю.

Особливістю розробленого комплексу лікувальних заходів – використання (за відповідними показаннями) препаратів групи пролонгованих глюкокортикоїдів, інгібіторів протеолізу, внутрішньопотокового введення протеолітичних ферментів та застосування сіалоендоскопії для усунення рубцевих змін і стійкої стриктури вивідних протоків привушних та/або підщелепних залоз. Ці методи окремо описані в фаховій літературі, і їх визначають як перспективні напрями патогенетичного впливу в пацієнтів із променевими ураженнями слинних залоз [17,18,19,20]. Принципово новим є їх поєднане застосування та диференційований підхід до вибору показань, що ґрунтується на оцінюванні вираженості функціональних порушень за шкалою РСЗ.

Дослідження засвідчили, що запропонований підхід дав змогу вірогідно покращити результати лікування порівняно з традиційними методами. Так, застосування розробленого

комплексу лікувальних заходів дало змогу в термін до 12 місяців після травми досягнути повного зникнення або мінімізації клінічних проявів захворювання у 73,3 % хворих (у контрольній групі – 33,3 %), часткового покращення – у 20,0 % випадків (у контрольній групі – 46,0 %).

Хоча в обох групах зниження індексів РСЗ визначали вже через 3 місяці від початку лікування, позитивна динаміка зберігалася до 12 місяця, а клінічний ефект розвивався поступово. Це свідчило про необхідність тривалого застосування обраної лікувальної стратегії та підтримувальної терапії для досягнення бажаного результату. Особливого значення для цього контингенту хворих набувало диспансерне спостереження та вжиття профілактичних заходів, спрямованих на запобігання розвитку та прогресування захворювань слизової оболонки порожнини рота, зубів і пародонта.

Під час лікування порушені функції відновлювались нерівномірно. Найефективніше протягом застосування розробленого підходу корегувались порушення відтоку слини та прояви запального процесу. Щодо усунення явищ ретенції слини та проявів запалення, то результати, досягнуті в основній групі, вірогідно кращі, ніж у контрольній ($\chi^2 = 6,20$, $p < 0,05$ та $\chi^2 = 6,67$, $p < 0,05$). Порушення секреторної функції корегувались гірше, особливо на пізніх стадіях захворювання, що асоційовані з рубцюванням паренхіми, зменшенням кількості ацинарних клітин і втратою функціональних резервів. Під час дослідження лікувальний ефект не зафіксували в 6,7 % хворих з основної групи та 20,0 % пацієнтів контрольної групи, що встановили переважно за різким пригніченням або втратою секреторної функції, розвитком ксеростомії II–III ступенів; це визначало найбільшу резистентність до призначеної терапії.

Подібні результати одержали X. Li et al. та G. Sunavala-Dossabhoj et al. [8,10]. За результатами їхніх досліджень, застосування сіалоендоскопії та протизапальних препаратів є перспективним у лікуванні ранніх ускладнень радіоїодтерапії. Втім, якщо діагностують виражену ксеростомію, їхня ефективність низька, а доцільність використання сумнівна. Це свідчить про пріоритетність призначення замісної терапії та профілактики інфекційних процесів у цих випадках. Крім того, автори зробили висновок, що раннє виявлення та лікування ксеростомії (бажано в субклінічних формах) суттєво покращує результати і віддалений прогноз [13].

Висновки

1. Розроблений метод індексного оцінювання тяжкості клінічних проявів хронічного променевого сіалоаденіту, що ґрунтується на визначенні характеру та виразності основних ланок патогенезу цього захворювання: ретенції слини (Р), зниження секреторної функції (С) залози та виразності запального процесу (З), – основа для диференційованого призначення лікувальних засобів патогенетичного спрямування та об'єктивного визначення ефективності комплексної терапії в пацієнтів, які отримували терапію радіоактивним йодом.

2. Диференційоване застосування розробленого патогенетично орієнтованого лікувального комплексу на основі використання пролонгованих глюкокортикоїдів, інгібіторів

протеолізу, внутрішньопротокового введення протеолітичних ферментів та сіалоендоскопії дало змогу вірогідно покращити стан хворих із хронічними променевими сіалоаденітами в термін спостереження до 1 року, а також виявилось достовірно ефективнішим за традиційні засоби симптоматичної корекції щодо усунення явищ ретенції слини ($\chi^2 = 6,67$, $p < 0,05$) і проявів запалення ($\chi^2 = 6,20$, $p < 0,05$).

3. У термін до 12 місяців після травми завдяки застосуванню комплексу лікувальних заходів досягли повного зникнення або мінімізації клінічних проявів захворювання у 73,3 % хворих (у контрольній групі – у 33,3 %), часткового покращення – у 20,0 % випадків (у контрольній групі – 46,0 %). У 6,7 % хворих основної групи і 20,0 % пацієнтів контрольної групи не спостерігали лікувального ефекту, що встановили передусім за різким пригніченням або втратою секреторної функції, розвитком ксеростомії II–III ступенів; це визначало найбільшу резистентність до одержаної терапії.

4. Досягнення бажаного клінічного результату та стійкої ремісії клінічних проявів у пацієнтів із хронічними променевими сіалоаденітами потребувало призначення лікувальних заходів протягом тривалого часу (до 1 року). Після цього пацієнти мали чітко дотримуватись рекомендацій щодо використання слиногінних засобів, режиму харчування та прийому рідини, масажу слинних залоз, та підтримки гігієни порожнини рота.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані свідчать про можливість ефективного застосування патогенетично орієнтованого лікувального комплексу в пацієнтів із хронічними променевими сіалоаденітами на тлі застосування терапії радіоактивним йодом. Необхідне підтвердження виявлених закономірностей у проспективних багатоцентрових дослідженнях із залученням великої кількості пацієнтів, вивчення впливу застосованих методів лікування на стан стоматологічного здоров'я хворих та оцінювання стабільності отриманих результатів у термін спостереження більше ніж 1 рік. Крім того, необхідно продовжувати пошук ефективніших засобів відновлення секреторної функції слинних залоз і замісної терапії (у разі повної втрати секреторної здатності).

Відомості про авторів:

Копчак А. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. щелепно-лицевої хірургії та сучасних стоматологічних технологій, Інститут післядипломної освіти, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-3272-4658

Макаренко В. А., лікар-стоматолог поліклінічного відділення, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В. П. Комісаренка НАМН України», м. Київ.

ORCID ID: 0000-0001-6632-9106

Information about authors:

Kopchak A. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Maxillofacial Surgery and Modern Dental Technologies, Institute of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Makarenko V. A., MD, Dentist of the Polyclinic Department, State Institution "V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv.

References

1. Vardarli I, Weidemann F, Aboukoura M, Herrmann K, Binse I, Gorges R. Longer-term recurrence rate after low versus high dose radioiodine ablation for differentiated thyroid Cancer in low and intermediate risk patients: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1):550. doi: [10.1186/s12885-020-07029-3](https://doi.org/10.1186/s12885-020-07029-3)
2. Sánchez Barrueco A, González Galán F, Alcalá Rueda I, Santillán Coello JM, Barrio Dorado MP, Villacampa Aubá JM, et al. Incidence and risk factors for radioactive iodine-induced sialadenitis. *Acta Otolaryngol*. 2020;140(11):959-62. doi: [10.1080/00016489.2020.1802507](https://doi.org/10.1080/00016489.2020.1802507)
3. Upadhyaya A, Meng Z, Wang P, Zhang G, Jia Q, Tan J, et al. Effects of first radioiodine ablation on functions of salivary glands in patients with differentiated thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(25):e7164. doi: [10.1097/MD.00000000000007164](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007164)
4. Auttara-Atthakorn A, Sungmala J, Anothaisintawee T, Reutrakul S, Sriphrapradang C. Prevention of salivary gland dysfunction in patients treated with radioiodine for differentiated thyroid cancer: A systematic review of randomized controlled trials. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:960265. doi: [10.3389/fendo.2022.960265](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.960265)
5. Adramerinas M, Andreadis D, Vahtsevanos K, Pouloupoulos A, Pazaitou-Panayiotou K. Sialadenitis as a complication of radioiodine therapy in patients with thyroid cancer: where do we stand? *Hormones (Athens)*. 2021;20(4):669-78. doi: [10.1007/s42000-021-00304-3](https://doi.org/10.1007/s42000-021-00304-3)
6. Zeng Q, Mandel L. Radioactive Iodine-Induced Hyposalivation: Case Report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2019;77(9):1837-40. doi: [10.1016/j.joms.2019.03.032](https://doi.org/10.1016/j.joms.2019.03.032)
7. Mester A, Piciu A, Lucaciu O, Apostu D, Piciu D, Voinea-Tonea A. Assessment and Care of Oral Lesions for Patients Who Undergo Radioiodine Treatment for Thyroid Cancer. *Am J Med Sci*. 2021;361(1):8-13. doi: [10.1016/j.amjms.2020.07.035](https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.07.035)
8. Li X, Su JZ, Zhang YY, Zhang LQ, Zhang YQ, Liu DG, et al. [Inflammation grading and sialoendoscopic treatment of ¹³¹I radioiodine-induced sialadenitis]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2020;52(3):586-590. Chinese. doi: [10.19723/j.issn.1671-167X.2020.03.029](https://doi.org/10.19723/j.issn.1671-167X.2020.03.029)
9. Gilat H, Vainer I, Avishai G, Maymon SL, Alkan U, Hod R, et al. Radioiodine therapy induced sialadenitis versus chronic idiopathic sialadenitis-Presentation and outcomes. *Head Neck*. 2021;43(9):2724-30. doi: [10.1002/hed.26741](https://doi.org/10.1002/hed.26741)
10. Sunavala-Dossabhoy G. Radioactive iodine: An unappreciated threat to salivary gland function. *Oral Dis*. 2018;24(1-2):198-201. doi: [10.1111/odi.12774](https://doi.org/10.1111/odi.12774)
11. Ciarallo A, Rivera J. Radioactive Iodine Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: 2020 Update. *AJR Am J Roentgenol*. 2020;215(2):285-91. doi: [10.2214/AJR.19.22626](https://doi.org/10.2214/AJR.19.22626)
12. Luster M, Aktolun C, Amendoeira I, Barczyński M, Bible KC, Duntas LH, et al. European Perspective on 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: Proceedings of an Interactive International Symposium. *Thyroid*. 2019;29(1):7-26. doi: [10.1089/thy.2017.0129](https://doi.org/10.1089/thy.2017.0129)
13. Baudin C, Bressand A, Buffet C, Menegaux F, Soret M, Lê AT, et al. Dysfunction of the Salivary and Lacrimal Glands After Radioiodine Therapy for Thyroid Cancer: Results of the START Study After 6-Months of Follow-Up. *Thyroid*. 2023;33(9):1100-9. doi: [10.1089/thy.2023.0090](https://doi.org/10.1089/thy.2023.0090)
14. Le Roux MK, Graillon N, Guyot L, Taieb D, Galli P, Godio-Raboutet Y, et al. Salivary side effects after radioiodine treatment for differentiated papillary thyroid carcinoma: Long-term study. *Head Neck*. 2020;42(11):3133-40. doi: [10.1002/hed.26359](https://doi.org/10.1002/hed.26359)
15. Meeks L, De Oliveira Pessoa D, Martinez JA, Limesand KH, Padi M. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals convergent pathways driving radiation-induced salivary gland dysfunction. *Physiol Genomics*. 2021;53(3):85-98. doi: [10.1152/physiolgenomics.00127.2020](https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00127.2020)
16. Lv X, Yin L, Wu W, Li N, Zhang R, Li X, et al. Quantitative Scintigraphy Evaluated the Relationship between ¹³¹I Therapy and Salivary Glands Function in DTC Patients: A Retrospective Analysis. *J Healthc Eng*. 2022;2022:7640405. doi: [10.1155/2022/7640405](https://doi.org/10.1155/2022/7640405)
17. Cung TD, Lai W, Svider PF, Hanba C, Samantray J, Folbe AJ, et al. Sialendoscopy in the Management of Radioiodine Induced Sialadenitis: A Systematic Review. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2017;126(11):768-73. doi: [10.1177/0003489417732795](https://doi.org/10.1177/0003489417732795)
18. Canzi P, Cacciola S, Capaccio P, Pagella F, Occhini A, Pignataro L, et al. Interventional sialendoscopy for radioiodine-induced sialadenitis: quo vadis? *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2017;37(2):155-9. doi: [10.14639/0392-100X-1606](https://doi.org/10.14639/0392-100X-1606)
19. Upadhyaya A, Zhou P, Meng Z, Wang P, Zhang G, Jia Q, et al. Radio-protective effect of vitamin E on salivary glands after radioiodine therapy for differentiated thyroid cancer: a randomized-controlled trial. *Nucl Med Commun*. 2017;38(11):891-903. doi: [10.1097/MNM.0000000000000727](https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000727)
20. Son SH, Lee CH, Jung JH, Kim DH, Hong CM, Jeong JH, et al. The Preventive Effect of Parotid Gland Massage on Salivary Gland Dysfunction During High-Dose Radioactive Iodine Therapy for Differentiated Thyroid Cancer: A Randomized Clinical Trial. *Clin Nucl Med*. 2019;44(8):625-33. doi: [10.1097/RLU.0000000000002602](https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002602)

Obstetrical and perinatal consequences of childbirth in women with antenatally undiagnosed fetal growth restriction

V. A. Puchkov^{ID}*A-F, M. I. Pavliuchenko^{ID}D,E, O. A. Bohomolova^{ID}D,E

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

fetal growth restriction, prenatal diagnosis, perinatal consequences.

Ключові слова:

затримка росту плода, пренатальна діагностика, перинатальні наслідки.

Надійшла до редакції /
Received: 16.10.2023

Після доопрацювання /
Revised: 31.10.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 15.11.2023

Конфлікт інтересів:
відсутній.

Conflicts of interest:
authors have no conflict
of interest to declare.

*E-mail:
docpva1972@gmail.com

Fetal growth restriction (FGR) is one of the most studied topics in the medicine of the mother and fetus. However, not identified antenatally FGR can have an increased risk of both perinatal morbidity and mortality, as well as adverse long-term consequences. The identification of FGR during pregnancy will contribute to the reduction of both perinatal morbidity and perinatal mortality.

Aim. Based on a retrospective analysis, assess the obstetric and perinatal consequences of childbirth in women with antenatally undiagnosed fetal growth restriction.

Materials and methods. An analysis of 488 cases of childbirth in women with singleton pregnancy, who gave birth to a live child, was conducted. In all cases, the gestational age was ≥ 22 weeks with a fetal weight less than the 10th percentile for the corresponding gestational age. Depending on the antenatally established diagnosis of FGR, two study groups were formed: group I consisted of 204 (41.8 %) cases with antenatally diagnosed FGR, group II – 284 (58.2 %) cases in which signs of FGR were identified after the birth of the child. Maternal characteristics, neonatal outcomes, and evaluation of short-term infant outcomes were analyzed.

Results. Both groups were dominated by women with first births, the number of which was almost the same. Somatic pathology was almost 2 times more common in women of group I, 17.2 %, compared to 9.2 % of women in group II ($p < 0.01$), this indicates that the majority of women who were not diagnosed with FGR during pregnancy belong to the low-risk group. Fetuses with impaired blood flow in the umbilical cord arteries were twice as common in group I, 49.5 % versus 23.9 % in group II ($p < 0.0001$), and the frequency of absent/reversible end flow in the umbilical arteries in group I compared to group II, prevailed 3 times ($p < 0.0001$), indicating more serious lesions of the placenta and, as a result, early manifestation of the fetal condition disorder. The frequency of premature abdominal delivery was 3.75 times higher in group I compared to group II. The most frequent indication for cesarean delivery in both groups was signs of fetal distress syndrome. Analysis of neonatal outcomes showed that the average birth weight was significantly lower in group I and was 2180 ± 55 g against 2420 ± 61 g in group II ($p < 0.0001$). The need for hospitalization of newborns in the intensive care unit had no statistical difference between the groups ($p > 0.05$). However, the complications of the early neonatal period and the total length of stay in the hospital were greater in children of the I group, compared to the II group ($p < 0.0001$).

Conclusions. The results of the conducted research indicate a low level of prenatal diagnosis of fetal growth restriction. Most pregnant women with antenatally undiagnosed fetal growth restriction belong to the group of low perinatal risk. The most frequent indication for cesarean section operation, regardless of the date of delivery, in both groups were signs of fetal distress, the frequency of which was 1.5 times higher in the antenatally diagnosed fetal growth retardation group. Newborns with an undetected growth anomaly before delivery have an increased risk of fetal distress, the severity of which is determined by the degree of deterioration of fetal oxygenation, and not by weight percentile, which requires more careful observation of fetuses with signs of growth restriction.

Modern medical technology. 2023;(4):21-26

Акушерські та перинатальні наслідки пологів у жінок з антенатально не діагностованою затримкою росту плода

В. А. Пучков, М. І. Павлюченко, О. А. Богомолова

Затримка росту плода (ЗРП) – одна з найкраще вивчених тем у медицині матері та плода. Але не ідентифікована антенатально ЗРП спричиняє підвищений ризик перинатальної захворюваності та смертності, а також несприятливі віддалені наслідки. Виявлення ЗРП під час вагітності сприятиме зниженню перинатальної і захворюваності, й смертності.

Мета роботи – на підставі ретроспективного аналізу здійснити оцінювання акушерських і перинатальних наслідків розродження жінок з антенатально не діагностованою затримкою росту плода.

Матеріали та методи. Проаналізували 488 випадків пологів у жінок з одноплідною вагітністю, які народили живу дитину. В усіх випадках термін вагітності становив ≥ 22 тижні з масою плода, що менша за 10

перцентиль для відповідного терміну гестації. Залежно від антенатально встановленого діагнозу ЗРП, сформували дві групи дослідження: I – 204 (41,8 %) випадки з антенатально діагностованою ЗРП; II – 284 (58,2 %) випадки, коли ознаки ЗРП ідентифіковано після народження дитини. Вивчили материнські характеристики, неонатальні результати, оцінили короткострокові результати лікування немовлят.

Результати. В обох групах переважали жінки з першими пологами, кількість яких в групах зіставна. Соматичну патологію майже вдвічі частіше діагностували в жінок I групи (17,2 %) порівняно з II (9,2 %) ($p < 0,01$). Це свідчить, що більшість жінок, у яких під час вагітності не було діагностовано ЗРП, належать до групи низького ризику. Порушення кровотоку в артеріях пуповини вдвічі частіше фіксували в плодів I групи (49,5 %) щодо II (23,9 %) ($p < 0,0001$). Частота нульового / реверсивного кровотоку в артеріях пуповини втричі переважала в I групі порівняно з II ($p < 0,0001$). Це свідчило про складніші ураження плаценти, а отже й ранню маніфестацію порушення стану плода. Частота дострокового абдомінального розродження в 3,75 раза вища в I групі. Найчастіше показання до кесаревого розтину в обох групах – ознаки дистрес синдрому плода. Аналіз неонатальних наслідків показав: середня маса при народженні вірогідно менша в I групі, становить 2180 ± 55 г, у II – 2420 ± 61 г ($p < 0,0001$). Не виявили статистично значущої різниці між групами за необхідністю госпіталізації новонароджених у відділення інтенсивної терапії ($p > 0,05$). Втім, частота ускладнень раннього неонатального періоду та загальна тривалість перебування в стаціонарі більші в дітей I групи порівняно II ($p < 0,0001$).

Висновки. Результати дослідження свідчать про низький рівень допологової діагностики затримки росту плода. Більшість вагітних з антенатально не діагностованою затримкою росту плода належать до групи низького перинатального ризику. Найчастіше показання до операції кесаревого розтину (незалежно від терміну розродження) в обох групах – ознаки дистресу плода, частота якого в 1,5 раза більша в групі антенатально діагностованої затримки росту плода. Новонароджені з не виявленою перед пологами аномалією росту мають підвищений ризик дистресу плода, тяжкість якого визначається ступенем погіршення оксигенації, а не процентилем маси. Це зумовлює необхідність ретельнішого спостереження за плодами з ознаками затримки росту.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 21-26

Fetal growth restriction (FGR) is one of the most studied topics in the medicine of the mother and fetus. This is due not only to the relationship between the FGR and the postnatal consequences for the newborn but also to unresolved issues concerning the diagnosis and treatment of this pathology [1,2]. Over the past 40 years, a considerable amount of evidence has been obtained to clarify the clinical condition of the fetus with a suspected FGR and the role of fetal care parameters, both for predicting the clinical course and evaluating its condition during observation. However, there are significant differences in the recommended guidelines for fetus management with suspected FGR [3,4,5]. Today, there are still some differences both in diagnostic criteria and in the tactics of management. FGR is a complex problem of modern obstetrics that the American College of Obstetricians and Gynaecologists (ACOG 2021) considers “the most relevant and difficult problem of modern obstetrics” [6]. Despite the various causes of FGR, it is a pathological condition that occurs because of placental vascular disorders, namely chronic oxygen deficiency and nutrients for the fetus due to impaired fetal-mother circulation [7,8,9].

Despite extensive studies, and public health policy aimed at reducing the number of infants with low body weight, the prevalence of FGR remains unacceptably high [10]. At the same time, not identified antenatally FGR can have an increased risk of both perinatal morbidity and mortality, as well as adverse long-term consequences of the cardiovascular system, and cognitive disorders in adulthood [11,12]. Also, the FGR is associated with 12 % mortality in antenatal and 8 % in neonatal periods [13].

One of the attempts to improve the prevention of stillbirth is the best detection of FGR during pregnancy. However, the monitoring of fetal growth is an insurmountable obstacle to

prenatal observation [4,5,6]. Despite the consensus on the importance of screening, the current practice of pregnancy monitoring is heterogeneous and antenatally from 10 % to 36 % of infants with weight at birth <10 percentile [14,15]. Therefore, the diagnosis of FGR during pregnancy and the optimization of delivery dates contribute to the reduction of both perinatal morbidity and perinatal mortality [16,17].

Aim

Based on a retrospective analysis, assess the obstetric and perinatal consequences of childbirth in women with antenatally undiagnosed fetal growth restriction.

Materials and methods

An analysis of 488 cases of childbirth in women with a singleton pregnancy who gave birth to a living baby from 2018 to 2021 in Zaporizhzhia was done. In all cases, pregnancy was ≥ 22 weeks with a fetus weight less than the 10th percentile for the appropriate gestation period. FGR was determined by the criteria for diagnosis of according to the current order of the Ministry of Health of Ukraine dated 02.10.2023 No. 1718 and guidelines of the European Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG) [18,19]. The estimated weight of the fetus was designed by the formula of the Hodlock (HC-AC-FL). For interpretation of the percentage of newborn weight, reference data from the INTERGROWTH-21st was used [20].

Growth restriction in newborns was defined according to the criteria of the Consensus Definition (2018), which includes: birth weight of the child <3rd percentile, or a combination of

Table 1. Maternal characteristics in the studied groups

Indexes	I group, n = 204	II group, n = 284	p
Average pre-pregnancy weight, kg	61.1 ± 9.7	58.2 ± 11.0	0.0310
BMI	21.9 ± 2.8	20.6 ± 2.7	<0.0001
Parity			
1 childbirth	51.9 %	59.2 %	0.1144
Extragenital pathology	17.2 %	9.2 %	0.0083

three criteria: birth weight <10th percentile; head circumference <10th percentile; prenatal diagnosis of FGR; prenatal risk factors associated with FGR [21].

Following the aim of the study, depending on the antenatally established diagnosis of FGR, two study groups were formed: group I consisted of 204 (41.8 %) cases with antenatally diagnosed FGR, II group – 284 (58.2 %) cases with signs of FGR identified after the birth of the child. The average age of pregnant women was 28.1 ± 3.1 in group I and 29.5 ± 2.4 years in group II. The study analyzed maternal characteristics, weight gain during pregnancy, and the onset of any obstetric complications. Dates and method of delivery, birth weight of infants, and Apgar score at 1 and 5 minutes after birth were collected and recorded [22]. Also, an evaluation of the short-term results of the treatment of infants was carried out, namely: the need for hospitalization in the neonatal intensive care unit, artificial ventilation of the lungs for more than 24 hours, and the main neonatal complications (respiratory distress syndrome (RDS) of the newborn, necrotizing enterocolitis (NEC), intraventricular hemorrhage (IVH)), sepsis, accesses, and days of hospitalization in neonatal intensive care unit).

The research was conducted by the modern requirements of moral and ethical norms regarding the rules of ICH/GCP, the Declaration of Helsinki (1964), the Conference of the Council of Europe on Human Rights and Biomedicine, as well as the provisions of legislative acts of Ukraine.

Statistical processing of the results was conducted using licensed standard packages of multivariate statistical analysis application programs Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., No. JPZ804I382130ARCN10-J). Data are presented as M ± SD (mean ± standard deviation) or n (%). Testing of the hypothesis about the presence of discrepancies was conducted using the Student's test. Differences were considered statistically significant at p < 0.05. The correlation between the term of pregnancy and manifestations of distress of fetuses of different groups was evaluated by the Pearson correlation coefficient.

Results

The analysis of maternal characteristics showed that the average pregnancy weight and body mass index (BMI) of women of group I were significantly higher compared to women of group II (p < 0.001) (Table 1).

The number of women with their first birth in both groups was almost the same: 51.9 % (106/204) in group I, against 59.2 % (168/284) in group II (p > 0.05). Somatic pathology was almost

2 times more common in women of group I, 17.2 % (35/204), compared to 9.2 % (26/284) of women in group II (p < 0.01). Hypertensive disorders during pregnancy predominated among somatic pathologies, the frequency of which was 3.5 times higher in group I, 19.6 % (40/204) compared to 5.6 % (16/284) in group II.

Characterizing the condition of the fetus during pregnancy (Fig. 1), it should be noted that in both groups there was a predominance of fetuses with a late form of FGR, however, in group I the frequency in the early form of FGR was 3.5 times higher compared to group II (p < 0.0001). Fetuses with impaired blood flow in the arteries of the umbilical cord (pulsatility index (PI) > 95 %) were twice as common in group I versus in group II (p < 0.0001), and the frequency of absent end-diastolic flow in the umbilical arteries in group I compared to group II prevailed 3 times (p < 0.0001).

Peculiarities of the course of labour in the study groups showed that the average term of labour was significantly shorter in group I and was 37.4 ± 2.6 weeks against 38.2 ± 2.1 weeks in group II (p = 0.0004). The frequency of premature birth in both groups had no statistical difference, and in group I was 5.9 % (12/204) against 6.0 % (17/284) in group II (p = 0.1376). However, the frequency of preterm abdominal delivery was 3.75 times higher in group I compared to group II, 22.5 % (46/204) and 6.0 % (17/284), respectively (p < 0.0001). The percentage of cesarean sections prevailed in women of the I group, 52.0 % (106/204) compared to group II, 38.4 % (109/284) (p = 0.0029).

The most frequent indication for cesarean section in both groups were signs of fetal distress syndrome, however, in women of the I group, this indicator was 43.6 % (89/204), and in group II, respectively, 23.2 % (66/284) (p = 0.0014). It should be noted that a positive correlation of moderate strength was established between the term of pregnancy and manifestations of fetal distress in group I (r = 0.318) (p < 0.001), in contrast to group II, where the corresponding correlation was absent (r = 0.125) (p > 0.05). The frequency of vacuum extraction of the fetus was higher in women of group II, 4.9 % (14/284), against 1.5 % (3/204), respectively, in group I (p = 0.041). The frequency of placental abruption was not significantly different between the groups and was 0.5 % (1/204) in the I and 2.1 % (6/284) in group II (p = 0.1422).

Analysis of neonatal outcomes showed that the average birth weight was significantly lower in group I and was 2180 ± 55 g against 2420 ± 61 g in group II (p < 0.0001). It should be noted that the proportion of newborns weighing up to 1000.0 and 1000–2000.0 prevailed in group I compared to group II (p = 0.011). The number of newborns with weight from 2000.0 to 2500.0 did not

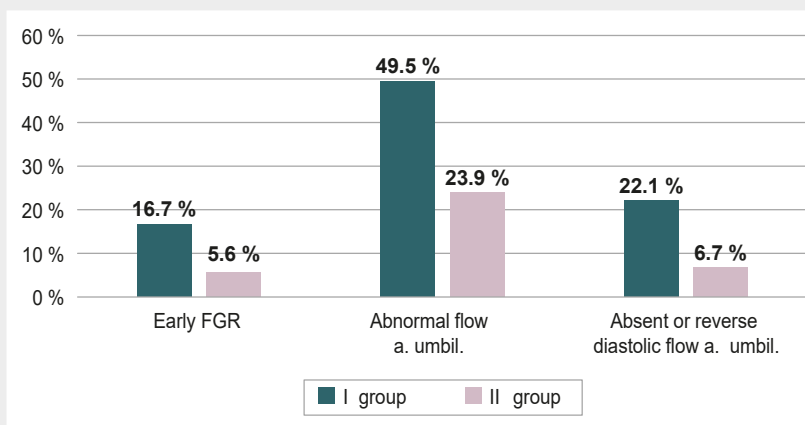


Fig. 1. The condition of the fetus during pregnancy in the study groups.

statistically differ in groups and was 47.6 % (97/204) in group I and 44.0 % (125/284) in group II, respectively ($p = 0.4373$). However, the percentage of children weighing more than 2500 g prevailed in group II, 46.5 % (132/284), compared to 27.5 % (56/204) in group I ($p < 0.0001$). Such features were also reflected in the average percentile of the weight of the newborn, which was also significantly lower in the children of the I group, 2.8 ± 0.9 compared to 3.7 ± 1.2 in the children of group II ($p < 0.0001$).

There was no statistical difference in the gender of newborns between the groups: 45.1 % (92/204) in group I, against 41.9 % (119/284) in group II ($p = 0.4816$).

The number of children with an Apgar score <7 points at 1 minute in group I was greater and amounted to 18.8 % (38/204) in comparison with group II where this indicator was equal to 8.1 % (23/284) ($p < 0.0001$). At 5 minutes, the score on the Apgar scale was <7 points in children in group I in 2.9 % (6/204), and no case in the children in group II.

The need for hospitalization of newborns in the neonatal intensive care unit was 15.7 % (32/204) in group I and 10.2 % (29/284) in group II and had no statistical difference ($p = 0.1084$). The analysis of complications of the early neonatal period showed that their frequency (RDS 10.8 % and 1.8 %; IVH III–IV grade, 2.0 % and 0.0 %; NEC 2.5 % and 0.4 %; sepsis 3.4 % and 0.4 %; the need for inotropic support 3.4 %; and 0.0 %, respectively, in groups I and II) was greater in children of group I compared to group II ($p < 0.0001$). Intranatal death of the fetus was only in 1 case, 0.5 % (1/204) in the group I ($p = 0.0386$). The duration of hospitalization in the intensive care unit was statistically longer in the children of the I group, 10.7 ± 2.3 days, against 5.2 ± 1.9 days in group II ($p < 0.0001$). The total duration of hospitalization in the hospital was also significantly longer in children of the I group compared to group II (19.5 ± 4.8 days vs. 9.7 ± 3.1 days, respectively) ($p < 0.0001$).

Discussion

Abnormal fetal growth, the clinical manifestation of FGR, increases the risk of adverse perinatal outcomes, therefore correct prenatal identification of these fetuses is important [14,15,23]. Although there is an agreement among the specialists

of international associations regarding the clinical observation of early and late forms of FGR [1,3], diagnosis of FGR remains an unsolved problem.

Even though in our country, ultrasound examination in the third trimester of pregnancy is a common practice – the result of the conducted study found that before delivery, the diagnosis of FGR was established in 41.8 % of cases, which coincides with the data obtained in France 36.2 % [15], but significantly lower than the results of a recent study in Italy of 75.3 % [16]. Analysis of maternal characteristics did not reveal a significant difference in mean age between the groups, but the mean pregnancy weight and BMI in women of group I was greater compared to group II, in contrast to the data of the European study, where women in the group with FGR identified during pregnancy were more deficient body weight [16]. In the conducted study, both groups were dominated by women giving birth for the first time, but there was no statistical difference between the groups ($p > 0.05$). Extragenital pathology in women of group II was found in only every tenth woman. As for hypertensive disorders, in pregnant women diagnosed with FGR during pregnancy, attention is drawn to a lower frequency of their occurrence (19.6 %), compared to 33.0 % in a European study [16]. These data indicate that the majority of women who were not diagnosed with FGR during pregnancy belong to the low-risk group.

The analysis of the distribution by the period of onset of FGR by group showed a higher percentage of the early form in group I compared to the fetuses of group II ($p < 0.0001$). Similarly, in group I, the proportion of blood flow disorders in the umbilical cord arteries prevailed more than twice (49.5 %) (RI > 95 %), compared to group II ($p < 0.0001$). At the same time, critical blood flow in the arteries of the umbilical cord in group I was detected 3 times more often compared to group II. Such data may indicate more serious damage to the placenta and, as a result, an early manifestation of fetal impairment.

As expected, cesarean section prevailed in women of group I, and in most cases, the indications for operative delivery were precisely signs of fetal distress. Regarding the average birth weight, it was lower in group I compared to group II, which is consistent with the data of European studies [15,16], but the average weight percentile, according to these researchers, was

higher and was 5.0 percentiles, against 2.8 and 3.7 percentiles in the I and II group, respectively. Although the number of children with an Apgar score <7 at 1 and 5 minutes prevailed in children of the I group, the need for hospitalization in the intensive care unit was not significantly different between the groups.

The frequency of early neonatal complications, the length of stay in the intensive care unit, and the total duration of hospitalization were statistically higher in women with antenatally diagnosed FGR ($p < 0.0001$).

Conclusions

1. The results of the conducted research indicate a low level of prenatal diagnosis of fetal growth restriction (41.8 %). It should be noted that among pregnant women with antenatally undiagnosed fetal growth restriction, a low percentage of somatic pathology (9.2 %) and hypertensive disorders during pregnancy (5.6 %) was established, compared to the group of women with antenatally identified fetal growth restriction (17.2 % and 19.6 %, respectively).

2. Based on the results of childbirth, it was established that among pregnant women with antenatally diagnosed fetal growth restriction, the frequency of its early form was 16.7 %, which was 3.5 times higher than the corresponding indicator in the group with antenatally undiagnosed fetal growth restriction.

3. The most frequent indication for cesarean section operation, regardless of the date of delivery, in both groups were signs of fetal distress, the frequency of which was 1.5 times higher in the antenatally diagnosed fetal growth restriction group.

4. Analysis of the frequency of premature births in the study groups had no statistical difference, however, the increase in the percentage of premature babies in the group with antenatally diagnosed fetal growth restriction (22.5 % compared to 6.0 % in the group with antenatally undiagnosed fetal growth restriction) is due to premature birth due to signs of fetal distress.

5. Perinatal consequences after delivery in the group with antenatally diagnosed fetal growth restriction are characterized by a significantly higher percentage of neonatal complications ($p < 0.0001$), in contrast to the group with antenatally undiagnosed fetal growth restriction, where the gestational age at delivery and birth weight have affected the frequency of early neonatal complications and duration of hospitalization in the neonatal intensive care unit and the hospital.

6. Newborns with undetected growth restriction before delivery have an increased risk of fetal distress, the severity of which is determined by the degree of deterioration of fetal oxygenation, and not by weight percentile, which requires more careful monitoring of fetuses with signs of impaired growth rates in the third trimester of pregnancy.

Funding

The study is a fragment of scientific research work of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University on the topic "Prediction and prevention of gestation complications in women with comorbid states", state registration No. 0121U112325 (2021–2025).

Information about the authors:

Puchkov V. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-4393-5079](https://orcid.org/0000-0003-4393-5079)

Pavliuchenko M. I., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-9235-0205](https://orcid.org/0000-0002-9235-0205)

Bohomolova O. A., MD, Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-6577-5574](https://orcid.org/0000-0002-6577-5574)

Відомості про авторів:

Пучков В. А., канд. мед. наук, доцент каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Павлюченко М. І., канд. мед. наук, доцент каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Богомолова О. А., асистент каф. акушерства і гінекології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- Lees C, Stampalija T, Hecher K. Diagnosis and management of fetal growth restriction: the ISUOG guideline and comparison with the SMFM guideline. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2021;57(6):884-887. doi: [10.1002/uog.23664](https://doi.org/10.1002/uog.23664)
- Hromova AM, Berezna VA. [Obstetric and antenatal risk factors for intra-uterine growth restriction]. *Zaporozhye Medical Journal.* 2020;22(3):395-401. Ukrainian. doi: [10.14739/2310-1210.2020.3.204949](https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.3.204949)
- Lees CC, Romero R, Stampalija T, Dall'Asta A, DeVore GA, Prefumo F, et al. Clinical Opinion: The diagnosis and management of suspected fetal growth restriction: an evidence-based approach. *Am J Obstet Gynecol.* 2022;226(3):366-78. doi: [10.1016/j.ajog.2021.11.1357](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.11.1357)
- Melamed N, Baschat A, Yinon Y, Athanasiadis A, Mecacci F, Figueras F, et al. FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) initiative on fetal growth: best practice advice for screening, diagnosis, and management of fetal growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet.* 2021;152 Suppl 1 (Suppl 1):3-57. doi: [10.1002/ijgo.13522](https://doi.org/10.1002/ijgo.13522)
- Martins JG, Biggio JR, Abuhamad A. Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #52: Diagnosis and management of fetal growth restriction: (Replaces Clinical Guideline Number 3, April 2012). *Am J Obstet Gynecol.* 2020;223(4):B2-B17. doi: [10.1016/j.ajog.2020.05.010](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.05.010)
- Fetal Growth Restriction: ACOG Practice Bulletin, Number 227. *Obstetrics and gynecology.* 2021;137(2):e16-e28. doi: [10.1097/AOG.0000000000004251](https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004251)
- Damhuis SE, Ganzevoort W, Gordijn SJ. Abnormal Fetal Growth: Small for Gestational Age, Fetal Growth Restriction, Large for Gestational Age: Definitions and Epidemiology. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2021;48(2):267-79. doi: [10.1016/j.ogc.2021.02.002](https://doi.org/10.1016/j.ogc.2021.02.002)
- Malhotra A, Allison BJ, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Polglase GR, Miller SL. Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:55. doi: [10.3389/fendo.2019.00055](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00055)
- Cetin I, Taricco E, Mandò C, Radaelli T, Boito S, Nuzzo AM, Giussani DA. Fetal Oxygen and Glucose Consumption in Human Pregnancy Complicated by Fetal Growth Restriction. *Hypertension.* 2020;75(3):748-54. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13727](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13727)
- Ratnasiri AWG, Parry SS, Arief VN, DeLacy IH, Halliday LA, DiLibero RJ, et al. Recent trends, risk factors, and disparities in low birth weight in California, 2005-2014: a retrospective study. *Matern Health Neonatol Perinatol.* 2018;4:15. doi: [10.1186/s40748-018-0084-2](https://doi.org/10.1186/s40748-018-0084-2)
- Sacchi C, Marino C, Nosarti C, Vieno A, Visentin S, Simonelli A. Association of Intrauterine Growth Restriction and Small for Gestational Age Status With Childhood Cognitive Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2020;174(8):772-81. doi: [10.1001/jamapediatrics.2020.1097](https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.1097)

12. Henrichs J, de Jonge A, Westermeng M, Verfaillie V, Franx A, van der Horst HE, et al. Cost-Effectiveness of Routine Third Trimester Ultrasound Screening for Fetal Growth Restriction Compared to Care as Usual in Low-Risk Pregnancies: A Pragmatic Nationwide Stepped-Wedge Cluster-Randomized Trial in The Netherlands (the IRIS Study). *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(6):3312. doi: [10.3390/ijerph19063312](https://doi.org/10.3390/ijerph19063312)
13. Pels A, Beune IM, van Wassenaer-Leemhuis AG, Limpens J, Ganzevoort W. Early-onset fetal growth restriction: A systematic review on mortality and morbidity. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020;99(2):153-66. doi: [10.1111/aogs.13702](https://doi.org/10.1111/aogs.13702)
14. Nohuz E, Rivière O, Coste K, Vendittelli F. Prenatal identification of small-for-gestational age and risk of neonatal morbidity and stillbirth. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020;55(5):621-628. doi: [10.1002/uog.20282](https://doi.org/10.1002/uog.20282)
15. Ego A, Monier I, Skaare K, Zeitlin J. Antenatal detection of fetal growth restriction and risk of stillbirth: population-based case-control study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020;55(5):613-620. doi: [10.1002/uog.20414](https://doi.org/10.1002/uog.20414)
16. Lubrano C, Taricco E, Coco C, Di Domenico F, Mandò C, Cetin I. Perinatal and Neonatal Outcomes in Fetal Growth Restriction and Small for Gestational Age. *J. Clin. Med*. 2022;11(10):2729. doi: [10.3390/jcm11102729](https://doi.org/10.3390/jcm11102729)
17. Kolokot NG. [Improvement of fetus growth restriction diagnostics in pregnant women by means of biochemical markers that characterize the disorder of stress-adaptation]. *Zaporozhye Medical Journal*. 2018;20(2):231-5. Ukrainian. doi: [10.14739/2310-1210.2018.02.125275](https://doi.org/10.14739/2310-1210.2018.02.125275)
18. [On approval of the standard of medical care "Fetal growth retardation". Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 1718 on 2023 Oct 2] [Internet]. 2023 [cited 2023 Nov 21]. Ukrainian. Available from: <https://moz.gov.ua/article/ministry-mandates/nakaz-moz-ukraini-vid-02102023--1718-pr-o-zatverdzhennja-standartu-medichnoi-dopomogi-zatrimka-rostu-ploda>
19. Lees CC, Stampalija T, Baschat A, da Silva Costa F, Ferrazzi E, Figueras F, et al. ISUOG Practice Guidelines: diagnosis and management of small-for-gestational-age fetus and fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020;56(2):298-312. doi: [10.1002/uog.22134](https://doi.org/10.1002/uog.22134)
20. Pritchard N, Lindquist A, Siqueira IDA, Walker SP, Permezel M. INTER-GROWTH-21st compared with GROW customized centiles in the detection of adverse perinatal outcomes at term. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;33(6):961-966. doi: [10.1080/14767058.2018.1511696](https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1511696)
21. Beune IM, Bloomfield FH, Ganzevoort W, Embleton ND, Rozance PJ, van Wassenaer-Leemhuis AG, et al. Consensus Based Definition of Growth Restriction in the Newborn. *J Pediatr*. 2018;196:71-76.e1. doi: [10.1016/j.jpeds.2017.12.059](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.12.059)
22. Simon LV, Hashmi MF, Bragg BN. APGAR Score. 2023 May 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023
23. Farsetti D, Pometti F, Tiralongo GM, Lo Presti D, Pisani I, Gagliardi G, et al. (2022). Distinction between SGA and FGR by means of fetal umbilical vein flow and maternal hemodynamics. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022;35(25):6593-6599. doi: [10.1080/14767058.2021.1918091](https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1918091)

Оцінювання факторів ризику формування остеопенії в недоношених дітей

А. Ю. Цимбал¹*, В. С. Д., Ю. В. Котлова¹ А. Е. Ф.

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

А – концепція та дизайн дослідження; В – збір даних; С – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; Е – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

діти, недоношеність, денситометрія, остеопенія, фактори ризику.

Key words:

babies, neonatal prematurity, densitometry, osteopenia, risk factors.

Надійшла до редакції / Received: 07.08.2023

Після доопрацювання / Revised: 27.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 15.11.2023

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

*E-mail: annatsimbal26@gmail.com

Неонатальна остеопенія (KB 61.3 за МКХ-11) – поширене порушення мінерального обміну кісткової тканини (КТ) в недоношених дітей (НД). Прогнозування та виявлення остеопенії – ключ до її успішного контролювання.

Мета роботи – визначити фактори ризику, що впливають на формування неонатальної остеопенії в НД при народженні та протягом терміну інтенсивного лікування / постінтенсивного виходжування.

Матеріали та методи. Ультразвуковим денситометром Sunlight Omnisense 9000 вимірювали швидкість поширення ультразвуку в КТ (SOS, м/с) з оцінюванням Z-score (SD) відповідно до гестаційного віку в 56 НД і 20 доношених новонароджених (контрольна група) в ранньому неонатальному віці. Остеопенію верифікували згідно з настановами ВООЗ для променевих методів за показником Z-score, що менший за -1,0 SD. Оцінку Z-score, що становила -2,0 SD і нижче, визначили як наднизькі показники. Вивчили характеристики акушерсько-гінекологічного, соматичного анамнезу та перебігу вагітності матерів недоношених дітей, фактори їхнього постнатального виходжування, що впливають на формування КТ.

Результати. Діти, народжені в 33 тижні та раніше, мають у 3,23 раза вищі шанси виникнення недостатньої мінералізації КТ до відповідного терміну народження (OR = 3,23; ДІ 95 % [1,08; 9,70]), ніж інші НД. Шанси наднизьких показників SOS за Z-score у 14,22 раза вищі (OR = 14,22; ДІ 95 % [3,29; 61,57]) у НД, які народжені в 32 тижні гестації та раніше. Екстрагенітальні захворювання, клінічні ознаки дефіциту кальцію в матерів, споживання жінками кальцію та вітаміну D₃ під час вагітності не мали статистично значущої різниці (p > 0,05) у групах НД і контролю. Шанси недостатньої мінералізації КТ підвищує наявність прееклампсії в матері – у 5,47 раза (OR = 5,47; ДІ 95 % [1,07; 27,93]), друга за паритетом вагітність (і наступні) – у 4,51 раза (OR = 4,51; ДІ 95 % [1,38; 14,80]). Співвідношення тривалості штучної вентиляції легень (ШВЛ) та загальної тривалості лікування НД, тривалість парентерального вигодовування мають зворотний кореляційний зв'язок (помірний (r = -0,42, p < 0,05) і помітний (r = -0,51, p < 0,05) відповідно) зі зниженням SOS до низьких за Z-score.

Висновки. У НД, народжених у 32 тижні гестації та раніше, шанси наднизьких показників SOS за Z-score в 14,22 раза вищі (OR = 14,22; ДІ 95 % [3,29; 61,57]). Недостатню мінералізацію КТ за показниками SOS (за оцінкою Z-score) прогнозує народження НД від другої за паритетом вагітності (та наступних), наявність прееклампсії в матері, парентеральне вигодовування НД тривалістю понад 8 діб (Se = 75,00 %, Sp = 71,87 %, p < 0,0001), тривалість ШВЛ, більша за 6,48 % від загального часу лікування НД (Se = 86,67 %, Sp = 59,38 %, p < 0,046).

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 27-36

Assessment of risk factors for osteopenia development in premature babies

A. Yu. Tsybal, Yu. V. Kotlova

Neonatal osteopenia (KB 61.3 (ICD-11)) – violation of mineral exchange of bone tissue (BT) of premature babies (PB). Predicting and detection of osteopenia is the key to its successful control.

Aim. The aim of the article was to determine risk factors influencing the formation of neonatal osteopenia of PB and during the term of intensive care / postintensive nursing.

Materials and methods. Ultrasound densitometer Sunlight Omnisense 9000 was used to measure the ultrasound speed in BT (SOS, m/s) with estimation Z-score (SD) according to gestational age of 56 PB and 20 mature babies (control group) in the early neonatal age. Verification of osteopenia was carried out under the WHO guidelines for radiation methods by Z-score indicator less than SD by -1.0. Estimation of Z-score -2.0 SD and less was attributed to ultra-low indicators. The characteristics of obstetric and gynecological, somatic anamnesis and pregnancy course of premature babies' mothers, factors of PB postnatal development that influence the formation of BT were studied.

Results. Children born at 33 weeks or earlier are 3.23 times more likely (OR = 3.23; CI 95 % [1.08; 9.70]) to develop BT demineralization by the corresponding term of birth than other PB. The chances of ultra-low SOS by Z-score are 14.22 times higher (OR = 14.22; CI 95 % [3.29; 61.57]) in PB born at 32 weeks of gestation and earlier. Extragenital diseases, clinical signs of calcium deficiency in mothers, and women's intake of calcium and vitamin D3 during pregnancy did not have a statistically significant difference ($p > 0.05$) in the studied PB and control group. The mother's preeclampsia increases the chances of insufficient BT mineralization by 5.47 times (OR = 5.47; CI 95 % [1.07; 27.93]), second parity pregnancy (and subsequent ones) – by 4.51 times (OR = 4.51, CI 95 % [1.38; 14.80]). The factors of the ratio of the duration of mechanical ventilation relative to the total time of PB treatment, the duration of parenteral feeding have an inverse correlation (moderate ($r = -0.42$, $p < 0.05$) and significant ($r = -0.51$, $p < 0.05$) respectively) with a decrease in SOS to low Z-score.

Conclusions. In PB born at 32 weeks of gestation and earlier, the chances of ultra-low SOS indicators by Z-score are 14.22 times higher (OR = 14.22; CI 95 % [3.29; 61.57]). The following factors predicts insufficient mineralization of BT according to SOS indicators according to the Z-score: mother's second parity pregnancy (and subsequent ones), preeclampsia, parenteral feeding of PB for more than 8 days (Se = 75.00 %, Sp = 71.87 %, $p < 0.0001$), duration of mechanical ventilation, which is more than 6.48 % of the total time of PB treatment (Se = 86.67 %, Sp = 59.38 %, $p < 0.046$).

Modern medical technology. 2023;(4):27-36

Перші повідомлення та наукові звіти про особливі зміни кісткової тканини людини, що верифіковані як остеопенія, з'явилися на початку та в середині ХХ століття [1]. Нині цей патологічний стан включено до Міжнародної класифікації хвороб 11 перегляду, в якій враховано сучасні медичні проблеми ХХІ століття та наведено найважливіші досягнення науки та практики.

Останніми десятиріччями спостерігаємо зацікавленість науковців у вивченні причин формування, особливостей діагностики, спостереження за новонародженими з неонатальною остеопенією (КВ 61.3 за МКХ-11), однак залишається багато дискусійних питань, оскільки загальноприйнятих критеріїв визначення цього стану досі немає, а частота виявлення захворювання значно різниться [2].

Неонатальну остеопенію (синонім – метаболічна хвороба кісток (МХК)), згідно з чинним наказом МОЗ України від 16.04.2022 р. № 650 та відповідною «Клінічною настановою, заснованою на доказах», визначають за неповною мінералізацією остеоїда. Патологія може мати легкий перебіг без клінічних ознак, і тоді її діагностують лише за наявністю остеопенії; тяжкий перебіг супроводжується переломами кісток під час росту новонароджених [3]. Еволюція клінічних проявів і тяжкість ураження кісток залежать від міри демінералізації кісток [4]. До групи ризику належать насамперед недоношені діти, які позбавлені періоду найбільш ефективного включення поживних речовин до кісткового матриксу; це спричиняє часткову або повну втрату оптимального етапу формування мінеральних резервів [5]. Тому такі діти більш схильні до порушення мінералізації кісток, яку визначають як неонатальну остеопенію [2,6,7].

У всьому світі визначають тенденцію до народження дітей раніше за передбачувані терміни гестації, а також їх ефективного виходжування. В Україні з-поміж новонароджених майже 5,24 % – недоношені діти. Вживання немовлят із масою тіла при народженні 500–999 г збільшилося в 2,6 раза, з масою тіла 1000–1999 г – на 4,85 % [8]. Захворюваність на неонатальну остеопенію коливається від 20–30 % до 50–60 % залежно від маси тіла та гестаційного віку народження дітей [5,7]. Багато дослідників підтверджують загальну зворотну

закономірність: чим менший гестаційний вік при народженні, тим більша поширеність неонатальної остеопенії [9].

Вивчають вплив інших факторів ризику розвитку МХК у новонароджених: синдрому мальабсорбції, некротизуючого ентероколіту (НЕК), захворювань печінки, нирок, бронхолегеневої дисплазії (БЛД), повного парентерального харчування, – а також впливу медикаментозного лікування діуретичними, глюкокортикостероїдними препаратами та тривалої нерухомості недоношених немовлят тощо [7,9,10].

Через відсутність уваги до стану мінеральної щільності кісток у недоношених дітей, відсутність своєчасного динамічного спостереження за характеристиками міцності кісткової тканини під час росту малюків та корекції цих порушень імовірно прояви ускладнень, зокрема спонтанних переломів, не лише впродовж перших 2 років, але й протягом усього життя [3,6,7].

Вимірювання кісткової маси у дітей має чимало обмежень, на відміну від дорослих [11]. Провідними засобами оцінювання стану кісткової тканини у новонароджених дітей є променеві – рентгенологічні, ультразвукові. Результати досліджень засвідчили, що пристрої для кількісного ультразвукового дослідження кісткової тканини з довідковою базою для новонароджених дітей так само надійні, як і двоенергетична рентгенівська абсорбціометрія [12].

Згідно з рекомендацією Міжнародного товариства з клінічної денситометрії (ISCD) (2019), для скринінгу та динамічного спостереження саме недоношених дітей більш безпечним та універсальним є використання кількісних ультразвукових методів дослідження. Для ультразвукових денситометрів складено еталонні педіатричні бази даних поширення швидкості ультразвуку в стандартизованих локусах кісткової тканини недоношених дітей різних гестаційних термінів при народженні, створено калібрувальні фантоми, програмне забезпечення. Це дає змогу надійно визначати у недоношених новонароджених дітей характеристики дефіциту кісткової тканини [1,9,10,13].

Важливо розуміти фактори ризику, що впливають на міцність кісток у недоношених новонароджених як своєрідний маркер, який актуалізує створення профілактичних стратегій

проти остеопоротичних переломів для майбутніх поколінь, адже такі переломи є серйозним соціальним і фінансовим тягарем для суспільства [14, 15].

Мета роботи

Визначити фактори ризику, що впливають на формування неонатальної остеопенії в недоношених дітей при народженні та протягом терміну інтенсивного лікування / постінтенсивного виходжування.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження сплановано як аналітичне, когортне, погоджено комісією з біоетики Запорізького державного медичного університету. Спостереження за дітьми здійснили з 01.12.2019 до 31.12.2021 р. у відділенні реанімації та інтенсивної терапії новонароджених і відділенні постінтенсивного догляду та виходжування недоношених і хворих новонароджених в КНП «Обласний перинатальний центр» ЗОР, м. Запоріжжя (директор – О. Д. Кирилюк).

До групи дослідження залучено недоношених народжених дітей у гестаційному віці (ГВ) від 28 тижнів 0/7 днів до 36 тижнів 6/7 днів за письмової згоди на участь у дослідженні батьків пацієнтів. До дослідження не залучали дітей із патологією ендокринних залоз, вадами розвитку органів, асфіксією при народженні та за наявності судомного синдрому, некротизуючого ентероколіту, синдрому мальабсорбції, захворювань печінки, гіпербілірубінемії (200 мкмоль/л та більше); якщо діагностовано затримку внутрішньоутробного розвитку плода, а в анамнезі матерів є автоімунні захворювання, ендокринопатії, захворювання опорно-кісткового апарату; при незгоді батьків пацієнта брати участь у дослідженні з будь-якої причини. До групи контролю залучено соматично здорових дітей, які народилися в ГВ 37–40 тижнів. Отже, до дослідження залучено 56 (100 %) недоношених дітей: 29 (51,8 %) немовлят із ГВ народження, що менший за 34 тижні, та 27 (48,2 %) пізні передчасно народжених немовлят.

Надання допомоги недоношеним новонародженим здійснили за чинними наказами МОЗ України від 29.08.2006 р. № 584, від 16.04.2022 р. № 650. Згідно з наказами, ентеральне годування починали з першого дня життя молоком матері та/або адаптованою сумішшю для недоношених дітей в об'ємах, що збільшувалися; за потреби призначали повне / часткове парентеральне харчування в регламентованих вікових дозах для забезпечення щоденних потреб немовлят у макро-, мікронутрієнтах, корекції добових доз калію, натрію, кальцію. У відділенні інтенсивної терапії організовано надання неінвазивної / інвазивної (ШВЛ) респіраторної підтримки, розпочинали повне парентеральне вигодовування новонароджених за участі матерів у догляді за дітьми. Після стабілізації стану лікування спостереження за новонародженими, у тому числі часткове парентеральне вигодовування (ЧПВ), продовжено у відділенні постінтенсивного спостереження при спільному перебуванні з матерями.

Дослідження виконали ультразвуковим денситометром Sunlight Omnisense 9000 (Тель-Авів, Ізраїль), який затвер-

джений FDA США та сертифікований для використання в Україні (UA 1.001.020758-19). Програмне забезпечення апарата включає довідкову базу даних для певних ділянок скелета дітей із різних етнічних і вікових груп, у тому числі новонароджених дітей із терміном народження від 25 до 43 тижнів. Результат вимірювали на медіальному боці середньої частини діафіза великогомілкової кістки. Визначили показник швидкості поширення ультразвуку в кістковій тканині (SOS, м/с) разом із Z-критерієм (Z-score) – середньоквадратичним відхиленням (standard deviation (SD)) показника SOS від контрольної популяції, враховуючи вік, стать та етнічну належність.

Згідно з настановою BOO3 (1994), нормальні показники стану мінеральної щільності кісткової тканини відповідають значенню Z-score від -1,0 та більше, остеопенію верифікують, якщо Z-score становить від -1,1 до -2,5 SD, остеопороз – нижче за -2,5 SD [16]. У сучасних настановах ISCD (2019) для педіатрів акцент зроблено на показнику Z-score -2,0 SD та менше, який визначають як «діапазон, нижчий за очікуваний для відповідного віку», і лише за наявності декількох неенергетичних переломів рекомендовано вживання терміна «остеопороз» у дитячому віці. Разом із тим, фахівці ISCD не виключають наявності змін мінеральної щільності кісток при значеннях Z-score більших за -2,0 [17, 27].

Відповідно, у нашому дослідженні Z-score SOS оцінювали як середній (нормальний) при значенні понад -1,0 SD, низький – від -1,1 SD до -2,0 SD, наднизький, – коли значення менше чи дорівнювало -2,0 SD.

Перше дослідження швидкості ультразвуку кісткової тканини (SOS₁) у новонароджених здійснили в найближчий термін після народження (3,7 ± 1,8 доби життя) для характеристики внутрішньоутробного формування кісткової маси. Наступні дослідження (SOS₂, Z₂) здійснили на четвертому тижні життя (24,6 ± 3,1 доби життя) малюків.

У результаті оцінювання швидкості ультразвуку кісткової тканини дітей при народженні поділили на групи відповідно до показників Z-score. Група спостереження А – 25 малюків зі Z-score від -1,0 SD і більше; діти з недостатньою мінералізацією кісткової тканини залучені до групи В – 16 пацієнтів зі Z-score від -1,1 до -2,0 SD; до групи С – 15 малюків, які мали SOS зі Z-score від -2,0 SD та менше.

Проаналізували анамнестичні дані антенатального періоду розвитку (табл. 1), технологій постнатального виходжування та лікування, включаючи співвідношення тривалості ШВЛ щодо загальної тривалості лікування (ЗТЛ), курсових доз глюкокортикостероїдних (мг/кг), діуретичних препаратів (мг/кг). Вивчали види вигодовування, тривалість парентерального вигодовування (ТПВ), добове введення та споживання кальцію, фосфору ентерально і парентерально.

Статистично результати опрацювали, застосувавши програмне забезпечення Statistica 13.0 (Stat Soft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J) непараметричними методами: описовим (чисельні дані наведено як медіана (Me), межі квартильних відрізків [Q25 %; Q75 %]; категоріальні змінні – як абсолютна кількість випадків (n) у групі та частота у відсотках (%)); порівнянням кількісних ознак у незв'язаних вибірках за допомогою критерію Mann–Whitney U Test; пе-

Таблиця 1. Характеристика акушерсько-гінекологічного, соматичного анамнезу та перебігу вагітності матерів недоношених і доношених новонароджених

Пренатальні фактори	Гестаційний вік, тижні					
	28–33 (n = 29)		34–36 (n = 27)		37–40 (n = 20)	
	n	%	n	%	n	%
Вік матері більше ніж 30 років	22 ^{*^}	75,9	12 [*]	44,4	5 [^]	25,0
Інтервал між вагітностями не більше ніж 2 роки	13	44,8	8	29,6	5	25,0
Вагітність друга та більше	22	75,9	15	55,6	12	60,0
Фетоплацентарна недостатність	9 [^]	31,0	10 [^]	37,0	1 [^]	5,0
Прееклампсія	10 [^]	34,5	3	11,1	1 [^]	5,0
Карієс	7	24,1	4	14,8	10	50,0
Кіфо-сколіотичні порушення постави (1–2 ступенів)	4	13,8	5	18,5	1	5,0
Судоми в литкових м'язах під час вагітності	10	34,5	10	37,0	9	45,0
Екстрагенітальні захворювання матерів:	14	48,3	12	44,4	6	30,0
1. Хронічні захворювання ШКТ	2	6,9	4	14,8	1	5,0
2. Серцево-судинні захворювання	4	13,8	3	11,1	2	10,0
3. Анемія	5	17,2	6	22,2	2	10,0
Приймання матерями вітаміну D ₃	15	51,7	20	74,1	15	75,0
Приймання матерями препаратів кальцію	19	65,5	21	77,8	14	70,0

*: достовірна різниця між показниками недоношених, $p < 0,05$;

[^]: вірогідна різниця між показниками недоношених і доношених дітей (37–40 тижнів), $p < 0,05$.

ревіркою статистичних гіпотез (непараметричним критерієм Pearson's chi-squared test (χ^2) та точним критерієм Fisher); оцінюванням взаємозв'язків між показниками (рангова кореляція Spearman Rank Order Correlations (ρ)). За шкалою Cheddocke силу зв'язку між двома параметрами оцінювали як високу при R/ρ , що перевищувала 0,7, помітну – 0,5–0,7, помірну – 0,3–0,5, слабку – 0,1–0,3. Для оцінювання діагностичного значення кількісних факторів формування остеопенії використано ROC-аналіз із побудовою ROC-кривих для розрахунку показника площі під ROC-кривою (Area Under Curve (AUC)) зі стандартною похибкою ($S \pm SE$), 95 % довірчим інтервалом. Інтерпретацію ROC-AUC здійснили відповідно до рекомендацій: 0,9–1,0 – відмінна модель; 0,8–0,9 – дуже добра; 0,7–0,8 – добра; 0,6–0,7 – задовільна; 0,5–0,6 – незадовільна [18]. Визначено «граничну точку відсікання» (значення cut-off) кількісних ознак у недоношених дітей із/без остеопенії зі Z-score показника SOS більше ніж -1,0 SD, менше ніж -1,0 SD та менше ніж -2,0 SD; розраховано чутливість (Sensitivity (Se)) та специфічність (Specificity (Sp)) показників. У всіх розрахунках статистично достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати

Аналіз анамнестичних даних щодо особливостей перебігу вагітностей у матерів дітей із груп обстеження не показав наявності статистично значущої різниці ($p > 0,05$) між опосередкованими симптомами можливого дефіциту кальцію

у жінок під час вагітності та зміною мінеральної щільності кісток їхніх новонароджених дітей (табл. 2). Екстрагенітальні захворювання (найчастіше діагностували серцево-судинні захворювання, хронічні захворювання травного тракту та анемію) не мали статистично значущої різниці ($p > 0,05$) за частотою виявлення в матерів дітей із різних груп. У результаті вивчення споживання жінками кальцію, вітаміну D₃ не виявили статистично достовірної різниці ($p > 0,05$) у групах, не визначили впливу на різницю SOS у дітей з усіх груп, які порівнювали.

Аналіз груп дослідження засвідчує, що матері недоношених дітей статистично вірогідно ($p < 0,05$) частіше були старші за 30 років. Вік матерів недоношених дітей статистично достовірно ($p < 0,05$) більший, ніж вік матерів, які народили дітей у терміні доношеної вагітності (31,0 [27,0; 34,0] та 28,0 [25,0; 29,0] відповідно).

Матері недоношених дітей із низькими та наднизькими показниками Z-score частіше мали ускладнення вагітності (пreeклампсію, фетоплацентарну недостатність) порівняно з матерями доношених дітей (табл. 2).

У всіх дітей з недостатньою мінералізацією кісткової тканини до гестаційного віку народження (групи В + С разом із $Z < -1,0$ SD) такі фактори, як народження дитини від другої за паритетом вагітності (чи наступних) та наявність ускладнення вагітності (пreeклампсії), виявляли статистично достовірно ($p < 0,05$) частіше (табл. 2). Статистично вірогідно ($p < 0,05$) частіше ці фактори пов'язані з наднизькими показниками SOS за Z-критерієм $< -2,0$ SD.

Таблиця 2. Характеристика акушерсько-гінекологічного, соматичного анамнезу та перебігу вагітності матерів у групах дітей

Пренатальні фактори	Група А, Z > -1,0 SD, n = 25		Групи В + С, Z < -1,0 SD, n = 31		Група В, Z від < -1,0 до > -2,0 SD, n = 16		Група С, Z < -2,0 SD, n = 15		Доношені діти, Z > -1,0 SD, n = 20	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Вік матері більше ніж 30 років	12	48,0	22 [^]	71,0	12 [^]	75,0	10 [^]	66,7	5 [^]	25,0
Інтервал між вагітностями не понад 2 роки	7	28,0	14	45,2	6	37,5	8	53,3	5	25,0
Друга за паритетом вагітність (та наступні)	12 ^{^, #}	48,0	25 [#]	80,6	12	75,0	13 [*]	86,7	12	60,0
Гестаційний термін народження 33 тижні та менше	9 ^{*, #}	36,0	20 [#]	64,5	8	50,0	12 [*]	80,0	0	0
Фетоплацентарна недостатність	8 [^]	32,0	11 [^]	35,5	4	25,0	7	46,7	1 [^]	5,0
Прееклампсія	2 ^{*, *}	8,0	11 ^{#, ^}	35,5	5	31,3	6 ^{*, ^}	40,0	1 [^]	5,0
Карієс у матері	4	16,0	7	22,6	1	6,3	6	40,0	10	50,0
Кіфо-сколіотичні порушення постави (1–2 ступеня) в матері	2	8,0	7	22,6	3	18,8	4	26,7	1	5,0
Судоми в литкових м'язах під час вагітності	7	28,0	13	41,9	4	25,0	9	60,0	9	45,0
Екстрагенітальні захворювання матерів:	15	60,0	11	35,4	6	37,5	5	33,3	6	30,0
1. Хронічні захворювання ШКТ	4	16,0	2	6,4	1	6,3	1	6,7	1	5,0
2. Серцево-судинні захворювання	5	20,0	2	6,4	1	6,3	1	6,7	2	10,0
3. Анемія	4	16,0	7	22,6	4	25,0	3	20,0	2	10,0
Приймання вітаміну D ₃	16	64,0	19	61,2	12	75,0	7	46,7	15	75,0
Приймання препаратів кальцію	19	76,0	21	67,7	13	81,3	8	53,3	14	70,0

[#]: статистично достовірна різниця між групами дослідження В + С порівняно з групою А, $p < 0,05$;

^{*}: статистично вірогідна різниця між групою дослідження С порівняно з групою А, $p < 0,05$;

[^]: статистично достовірна різниця між групами дослідження А, В, С, В + С і доношеними дітьми, $p < 0,05$.

Таблиця 3. Аналіз залежності Z-score SOS від гестаційного віку народження за ROC-аналізом

Фактори постнатального догляду	Характеристика ROC-кривої	Z-score < -1,0	Z-score < -2,0
Гестаційний вік народження	AUC (S ± SE), 95 % [довірчий інтервал]	0,7900 ± 0,0590 [0,661; 0,888]	0,8720 ± 0,0555 [0,755; 0,946]
	p	<0,0001	<0,0001
	Індекс Юдена	0,477	0,672
	Гранична точка відсікання за гестаційним віком (%)	≤33	≤32
	Se (%)	67,74	86,67
	Sp (%)	80,00	80,49

При передчасному народженні дитини від другої за паритетом вагітності (чи наступних) шанси мати недостатню мінералізацію кісткової тканини до відповідного терміну народження в 4,51 раза вищі; відмінність шансів статистично значуща (OR = 4,51; ДІ 95 % [1,38; 14,80]). Якщо у матері виявляли ускладнення вагітності (прееклампсію), то шанси мати недостатню мінералізацію кісткової тканини до відповідного терміну народження в 5,47 раза вищі; відмінність шансів статистично вірогідна (OR = 5,47; ДІ 95 % [1,07; 27,93]).

Зміни SOS за оцінкою Z-score зафіксували у 31 (55,4 %) із 56 недоношених дітей різного гестаційного віку. За допомогою ROC-аналізу визначили залежність Z-score від гестаційного терміну народження (табл. 3).

Найкращі класифікаційні характеристики ROC-кривої визначили у недоношених дітей із наднизькими Z-score SOS (рис. 1).

Порогове значення логістичної функції P у точці cut-off (найвище значення індексу Юдена) дорівнює 0,672, відпо-

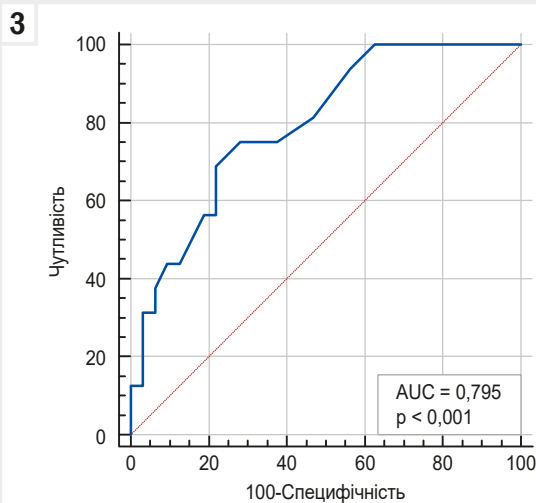
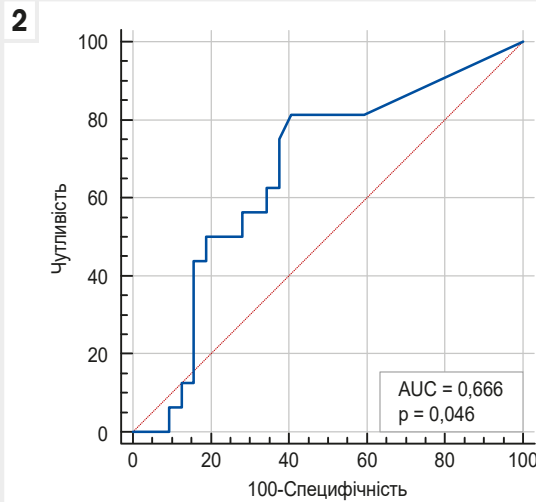
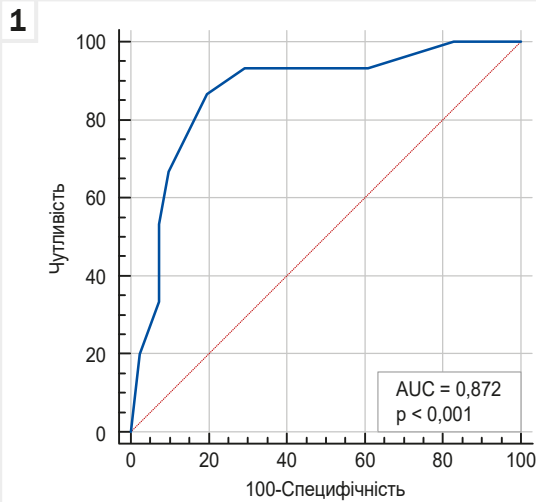


Рис. 1. ROC-крива залежності наднизьких показників Z-score SOS від гестаційного віку народження.

Рис. 2. ROC-крива залежності наднизьких показників Z-score SOS від показника ІТ/ПІВ (%).

Рис. 3. ROC-крива залежності наднизьких показників Z-score SOS від показника ТПВ (доба).

відає віку 32 та менше тижнів гестації при народженні, коли достовірніше прогнозуємо наднизькі показники SOS. Чутливість методу – 86,67 %, специфічність – 80,49 %.

У групах недоношених дітей з недостатньою мінералізацією кісткової тканини (групи В + С разом із Z < -1,0 SD; група С із Z < -2,0 SD) статистично достовірно (p < 0,05) частіше термін народження становив 33 тижні та менше. При передчасному народженні дитини в 33 тижні та раніше шанси мати недостатню мінералізацію кісткової тканини до відповідного терміну народження в 3,23 раза вищі, ніж в інших недоношених дітей – наднизькі показники SOS за Z-критерієм у 32 тижні гестації в 14,22 раза вищі; відмінність шансів статистично значуща (OR = 3,23; ДІ 95 % [1,08; 9,70] та OR = 14,22; ДІ 95 % [3,29; 61,57] відповідно).

Проаналізували технології постнатального виходжування недоношених дітей, які мали вірогідний вплив на мінеральну щільність кісткової тканини новонароджених (табл. 4).

Статистично значущу різницю (p < 0,05) між групами визначили за співвідношенням тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування (%), а також між тривалістю повного / часткового парентерального вигодовування немовлят і

характеристиками, що пов'язані з тривалістю лікування, як-от загальною дозою кальцію у складі часткового ентерального вигодовування.

Під час аналізу даних менеджменту постнатального догляду передчасно народжених дітей виявили статистично значущі від'ємні кореляційні зв'язки зі змінами за Z-критерієм SOS показників немовлят (табл. 5).

За допомогою ROC-аналізу визначили залежність Z-score різних ступенів (<-1,0, <-2,0) від факторів постнатального догляду за недоношеними дітьми (табл. 6, рис. 2, 3).

ROC-аналіз дав змогу порівняти та визначити більш передбачувальну здатність моделей. Співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування недоношених дітей більше за 6,48 % прогнозувало наявність SOS, меншого за -2,0 Z-score; за показниками AUC (S ± SE) модель є задовільною. «Гранична точка відсікання» для тривалості парентерального повного / часткового вигодовування дорівнювала терміну, що більший за 8 діб, для показників SOS, менших за -2,0 Z-score; за показниками AUC (S ± SE) модель є доброю.

Таблиця 4. Характеристика постнатального виходжування у недоношених дітей із груп дослідження

Показник, одиниці вимірювання	Група А	Група В	Група С
Співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування, %	13,1 [11,5; 33,3]*	13,6 [5,6; 35,8]~	22,4 [10,8; 28,0]*~
Тривалість ШВЛ, доби	3,0 [2,0; 9,0]	5,0 [1,0; 9,0]	6,0 [4,0; 7,0]
Курсова доза глюкокортикостероїдних препаратів (в/в), мг/кг	3,0 [3,0; 3,0]	2,2 [1,5; 2,5]	2,8 [2,5; 4,0]
Курсова доза кофеїну цитрату, мг/кг	74,5 [70,0; 87,0]	77,5 [69,5; 82,5]	77,0 [75,0; 100,0]
Курсова доза діуретичних препаратів, мг/кг	0,4 [0,2; 1,3] [§]	1,3 [1,0; 1,5] [§]	1,2 [0,6; 1,5]
Тривалість повного / часткового парентерального вигодовування, доби	5,0 [1,0; 9,0]	5,0 [4,0; 11,0]	11,0 [5,5; 18,5]*
Курсова доза кальцію у складі глюконату кальцію довенного, г/кг	0,41 [0,29; 0,58]	0,42 [0,33; 0,76]	0,51 [0,42; 0,62]
Курсова доза кальцію в складі часткового ентерального вигодовування, г/кг	0,5 [0,3; 0,8]	0,4 [0,2; 0,9]	1,0 [0,6; 1,9]*
Курсова доза фосфору у складі часткового ентерального вигодовування, г/кг	0,3 [0,1; 0,6]	0,3 [0,1; 0,5]	0,6 [0,3; 1,0]
Курсова доза кальцію у складі ентерального вигодовування, г/кг	3,6 [2,7; 4,9]	4,3 [1,9; 6,8]	4,9 [4,0; 6,6]
Курсова доза фосфору у складі ентерального вигодовування, г/кг	2,0 [1,5; 2,9]	2,4 [1,1; 3,9]	2,78 [2,2; 3,8]

[§]: достовірна різниця між показниками дітей груп В та А $p < 0,05$;

*: достовірна різниця між показниками дітей груп С та А $p < 0,05$;

~: достовірна різниця між показниками дітей груп В та С $p < 0,05$.

Таблиця 5. Результати кореляційного аналізу факторів постнатального догляду за недоношеними дітьми та Z-критерію показників SOS

Показник, одиниці вимірювання	Характеристика кореляційного зв'язку		
	ρ	Сила зв'язку	p
Співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування, %	-0,42	помірна	<0,05
Тривалість повного / часткового парентерального вигодовування, доби	-0,51	помітна	<0,05

Таблиця 6. Аналіз залежності Z-score SOS від факторів постнатального догляду за недоношеними дітьми за ROC-аналізом

Фактори постнатального догляду	Характеристика ROC-кривої	Z-score <-1,0	Z -score <-2,0
Співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування	AUC (S \pm SE), 95 % [довірчий інтервал]	0,677 \pm 0,082 [0,527; 0,805]	0,666 \pm 0,083 [0,515; 0,795]
	p	<0,031	<0,046
	Індекс Юдена	0,406	0,672
	Гранична точка відсікання за показником ШВЛ/ЗТЛ, %	>0,1	>6,48
	Se (%)	85,19	86,67
	Sp (%)	57,14	59,38
Тривалість повного / часткового парентерального вигодовування	AUC (S \pm SE), 95% [довірчий інтервал]	0,710 \pm 0,074 [0,561; 0,832]	0,795 \pm 0,066 [0,654; 0,898]
	p	<0,0048	<0,0001
	Індекс Юдена	0,3280	0,469
	Гранична точка відсікання за тривалістю ЧПВ, %	>9	>8
	Se (%)	51,85	75,00
	Sp (%)	80,95	71,87

Обговорення

Удосконалення знань у сфері інтенсивної терапії недоношених дітей забезпечило зниження їхньої смертності, однак ризик підвищення захворюваності у віддалені терміни залишився. Метаболічна хвороба кісток є одним із таких захворювань.

МХК у недоношених дітей залежить від багатьох факторів. Переважна більшість дітей не має явних клінічних симптомів. Діагностика захворювання залежить передусім від раннього клінічного скринінгу та моніторингу, тому складним завданням є вибір оптимального методу скринінгу у відповідний час [19].

За допомогою надійного, безпечного, безболісного методу дослідження недоношених новонароджених – кількісної ультразвукової денситометрії (денситометр Sunlight Omnisense 9000) – визначили стан кісткової тканини за показником SOS (м/с). Його оцінили за середньоквадратичним відхиленням від відповідної вікової норми завдяки наявності еталонної педіатричної бази даних SOS (м/с) у стандартизованих локсах кісткової тканини недоношених дітей. Зміни SOS за оцінкою Z-score менше за -1,0 SD спостерігали у 31 (55,4 %) випадку з 56 (100 %) недоношених дітей різного гестаційного віку; у майже половини з них (15 (48,4 %) із 31) показник Z-score наднизький, становив -2,0 SD та менше.

У попередніх дослідженнях встановлено, що поширеність МХК обернено пропорційна до гестаційного віку [20]. За допомогою ROC-аналізу підтверджено ці висновки та встановлено, що діти, народжені в 33 тижні та раніше, мають шанси розвитку недостатньої мінералізації кісткової тканини до відповідного терміну народження в 3,23 раза вищі (OR = 3,23; ДІ 95 % [1,08; 9,70]), ніж інші недоношені діти. Шанси наднизьких показників SOS за Z-score в 14,22 раза вищі (OR = 14,22; ДІ 95 % [3,29; 61,57]) в немовлят, народжених у 32 тижні гестації та раніше.

За даними дослідників, будь-який стан, що порушує функцію плаценти та передачу нутрієнтів, може призвести до підвищеного ризику остеопенії [20]. Chin L. K. et al. довели, що прееклампсія та хоріоамніоніт спричиняють зміни плаценти та порушують внутрішньоутробний мінеральний обмін; тому ці фактори оцінили як значущі для виникнення остеопенії у передчасно народжених дітей [5]. За нашими даними, як статистично значущі фактори, що зумовлюють розвиток недостатньої мінералізації кісткової тканини в недоношених дітей при народженні, можна визначити ускладнення вагітності (пreeклампсію) та наявність у матері попередніх вагітностей (однієї чи більше).

Сучасні технології виходжування недоношених новонароджених протекують функціонування багатьох систем організму для забезпечення потреб немовлят та адаптують їх до позаутробного життя. Інвазивна та неінвазивна респіраторна підтримка, повне та часткове парентеральне вигодовування, волемічна та симпатикотонічна терапія залежать від індивідуальних потреб немовлят відповідно до їхнього гестаційного віку, захворювань і коморбідних станів. Доведено, що співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування

недоношених і тривалість парентерального вигодовування є факторами ризику недостатньої мінералізації кісткової тканини передчасно народжених дітей [21,22,23].

У нашому дослідженні визначено помірний ($r = -0,42$, $p < 0,05$) і помітний ($r = -0,51$, $p < 0,05$) зворотні кореляційні зв'язки цих факторів із низькими показниками Z-критерію SOS. За результатами ROC-аналізу створено задовільну модель прогнозування змін SOS до Z-score -2,0 і менше за цим фактором. Співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування недоношених, що дорівнює 6,48 %, – показник, асоційований із недостатньою мінералізацією кісткової тканини дітей (Se = 86,67 %, Sp = 59,38 %, $p < 0,046$).

Лікування недоношених дітей в умовах відділення інтенсивної терапії асоціюється з інвазивними технологіями, які не тільки своєчасно діагностують, здійснюють моніторинг і корегують метаболічні зміни немовлят, але й тривало утримують дітей у пасивній мобілізації. За спостереженнями G. Torgó-Ferreiro et al., це призводить до зниження мінеральної щільності кісткової тканини [24,25].

Організація повного та часткового парентерального вигодовування асоційована з труднощами моделювання внутрішньоутробних темпів надходження нутрієнтів та електролітів. Внутрішньоутробно швидкість приросту кальцію у плода протягом останнього триместру становить 140 мг/кг/добу, фосфатів – 75 мг/кг/добу. Високу метаболічну потребу складно відтворити та забезпечити від народження недоношеної дитини і при повному, і при частковому парентеральному вигодовуванні. Порушення балансу формування кісткової тканини у недоношених немовлят спричинені незрілістю їхнього кишківника, обмеженою кількістю нутрієнтів і мінералів, що можна надавати при ентеральному харчуванні, доступністю в Україні лише ентерального споживання фосфатів у складі спеціальних молочних сумішей і посилювачів грудного молока [3,6].

За даними ROC-аналізу створили модель, за якою визначили тривалість парентерального вигодовування (більше ніж 8 діб), що асоційований із наднизькими показниками Z-score (Se = 75,00 %, Sp = 71,87 %, $p < 0,0001$) [26].

Отже, за даними ультразвукової денситометрії встановлено, хто з недоношених дітей має недостатню мінералізацію кісткової тканини при народженні та в динаміці інтенсивної терапії, постінтенсивного догляду, визначено провідні фактори її формування.

Висновки

1. Діти, народжені в 33 тижні та раніше, мають шанси розвитку недостатньої мінералізації кісткової тканини до відповідного терміну народження, що в 3,23 раза вищі (OR = 3,23; ДІ 95 % [1,08; 9,70]), ніж інші недоношені діти. Шанси наднизьких показників SOS за Z-score в 14,22 раза вищі (OR = 14,22; ДІ 95 % [3,29; 61,57]) у немовлят, народжених у 32 тижні гестації та раніше.

2. Визначили статистично значущі фактори, що спричиняють розвиток недостатньої мінералізації кісткової тканини в недоношених дітей при народженні: наявність у

матері прееклампації підвищує шанси в 5,47 рази (OR = 5,47; ДІ 95 % [1,07; 27,93]), народження від другої за паритетом вагітності (чи наступних) – у 4,51 рази (OR = 4,51; ДІ 95 % [1,38; 14,80]).

3. Співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування недоношених, тривалість їхнього парентерального вигодовування – фактори ризику зниження SOS до низьких за Z-score зі зворотним кореляційним зв'язком показників (помірним ($r = -0,42$, $p < 0,05$) та помітним ($r = -0,51$, $p < 0,05$) відповідно).

4. На формування SOS, меншого за $-2,0$ Z-score, у недоношених дітей має вплив співвідношення тривалості ШВЛ та загальної тривалості лікування, що більший за 6,48 % (Se = 86,67 %, Sp = 59,38 %, $p < 0,046$), а також парентеральне вигодовування тривалістю понад 8 дб (Se = 75,00 %, Sp = 71,87 %, $p < 0,0001$).

Перспективи подальших досліджень передбачають аналіз біохімічних змін при остеопенії з низькими та наднизькими показниками Z-score SOS, що встановлені під час кількісної ультразвукової денситометрії, для розроблення алгоритмів діагностики, лікування та профілактики метаболічних порушень кісткової тканини цих дітей.

Фінансування

Дослідження виконано в рамках НДР Запорізького державного медико-фармацевтичного університету: «Наукове обґрунтування діагностичних стратегій, оптимізація лікувальних заходів, удосконалення реабілітаційних та профілактичних алгоритмів при спостереженні хворих дітей різного віку», держреєстрація № 0120U101143 (2019–2024).

Відомості про авторів:

Цимбал А. Ю., аспірант каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6125-2776

Котлова Ю. В., канд. мед. наук, доцент каф. дитячих хвороб, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-2202-0873

Information about authors:

Tsymbal A. Yu., PhD student of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kotlova Yu. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Diseases, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

- Backström MC, Kuusela AL, Mäki R. Metabolic bone disease of prematurity. *Ann Med*. 1996;28(4):275-82. doi: 10.3109/07853899608999080
- Dursun M, Ozcabi B, Sariaydin M. Factors Affecting Metabolic Bone Disease of Prematurity: Is Hypothyroxinemia Included? *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*. 2022;56(1):84-90. doi: 10.14744/SEMB.2021.99076
- [Unified clinical protocol of primary, secondary (specialized), tertiary (highly specialized) medical care "Parenteral Nutrition Newborn Children". Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 650 on 2022 Apr 18] [Internet]. 2022. [cited 2023 Nov 21]. Ukrainian. Available from: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2022/04/2022_650_ykpmnd_pex_novonar.pdf
- Montaner Ramón A. Risk factors of bone mineral metabolic disorders. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2020;25(1):101068. doi: 10.1016/j.siny.2019.101068
- Chen W, Yang C, Chen H, Zhang B. Risk factors analysis and prevention of metabolic bone disease of prematurity. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(42):e12861. doi: 10.1097/MD.00000000000012861
- Angelika D, Ugrasena IDG, Etika R, Rahardjo P, Bos AF, Sauer PJJ. The incidence of osteopenia of prematurity in preterm infants without phosphate supplementation: A prospective, observational study. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(18):e25758. doi: 10.1097/MD.00000000000025758
- Rayannavar A, Calabria AC. Screening for Metabolic Bone Disease of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2020;25(1):101086. doi: 10.1016/j.siny.2020.101086
- Antipkin YG, Znamenska ET, Marushko1RV, Dudina EA, Lapshin VF, Vlasov AA. [Status of medical care for newborns in Ukraine]. *Neonatal Surg Perinat Med*. 2020;10(4):5-24. Ukrainian. doi: 10.24061/2413-4260.x.4.38.2020.1
- Faienza MF, D'Amato E, Natale MP, Grano M, Chiarito M, Brunetti G, et al. Metabolic Bone Disease of Prematurity: Diagnosis and Management. *Front Pediatr*. 2019;7:143. doi: 10.3389/fped.2019.00143
- Ukarapong S, Venkatarayappa SKB, Navarrete C, Berkovitz G. Risk factors of metabolic bone disease of prematurity. *Early Hum Dev*. 2017;112:29-34. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2017.06.010
- Ramot R, Kachhawa G, Kulshreshtha V, Varshney S, Sankar MJ, Devasenathipathy K, et al. Bone Mass in Newborns Assessed by DXA – A Systematic Review and Meta-analysis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2019;23(2):198-205. doi: 10.4103/ijem.IJEM_681_18
- Tong L, Gopal-Kothandapani JS, Offiah AC. Feasibility of quantitative ultrasonography for the detection of metabolic bone disease in preterm infants – systematic review. *Pediatr Radiol*. 2018;48(11):1537-49. doi: 10.1007/s00247-018-4161-5
- Shuhart CR, Yeap SS, Anderson PA, Jankowski LG, Lewiecki EM, Morse LR, et al. Executive Summary of the 2019 ISCD Position Development Conference on Monitoring Treatment, DXA Cross-calibration and Least Significant Change, Spinal Cord Injury, Peri-prosthetic and Orthopedic Bone Health, Transgender Medicine, and Pediatrics. *J Clin Densitom*. 2019;22(4):453-71. doi: 10.1016/j.jocd.2019.07.001
- Krithika MV, Balakrishnan U, Amboiram P, Shaik MSJ, Chandrasekaran A, Ninan B. Early calcium and phosphorus supplementation in VLBW infants to reduce metabolic bone disease of prematurity: a quality improvement initiative. *BMJ Open Qual*. 2022;11(Suppl 1):e001841. doi: 10.1136/bmjopen-2022-001841
- Blanco E, Burrows R, Reyes M, Lozoff B, Gahagan S, Albala C. Breast-feeding as the sole source of milk for 6 months and adolescent bone mineral density. *Osteoporos Int*. 2017;28(10):2823-30. doi: 10.1007/s00198-017-4106-0
- World Health Organization. Assessment of Fracture Risk and Its Application to Screening and Postmenopausal Osteoporosis [Internet]. Geneva, Switzerland: WHO; 1994 [cited 2023 Nov 25]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39142/WHO_TRS_843_eng.pdf
- Skeletal Health Assessment in Children from Infancy to Adolescence. ISCD Official Pediatric Positions [Internet]. ISCD; 2019 [cited 2023 Nov 25]. Available from: <https://iscd.org/wp-content/uploads/2021/09/2019-Of-ficial-Positions-Pediatric-1.pdf>
- Nahm FS. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean J Anesthesiol*. 2022;75(1):25-36. doi: 10.4097/kja.21209
- Wang J, Zhao Q, Chen B, Sun J, Huang J, Meng J, et al. Risk factors for metabolic bone disease of prematurity: A meta-analysis. *PLoS One*. 2022;17(6):e0269180. doi: 10.1371/journal.pone.0269180
- Chen W, Zhang Z, Dai S, Xu L. Risk factors for metabolic bone disease among preterm infants less than 32 weeks gestation with Bronchopulmonary dysplasia. *BMC Pediatr*. 2021;21(1):235. doi: 10.1186/s12887-021-02705-0
- Jiang H, Guo J, Li J, Li C, Du W, Canavese F, et al. Artificial Neural Network Modeling to Predict Neonatal Metabolic Bone Disease in the Prenatal and Postnatal Periods. *JAMA Netw Open*. 2023;6(1):e2251849. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.51849
- Ritschl E, Wehmeier K, DE Terlizzi F, Wipfler E, Cadossi R, Douma D, et al. Assessment of skeletal development in preterm and term infants by quantitative ultrasound. *Pediatr Res*. 2005;58(2):341-6. doi: 10.1203/01.PDR.0000169996.25179.EC

23. Tansug N, Yildirim SA, Canda E, Ozalp D, Yilmaz O, Taneli F, et al. Changes in quantitative ultrasound in preterm and term infants during the first year of life. *Eur J Radiol.* 2011;79(3), 428-31. doi: [10.1016/j.ejrad.2010.03.001](https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2010.03.001)
24. Torró-Ferrero G, Fernández-Rego FJ, Gómez-Conesa A. Physical Therapy to Prevent Osteopenia in Preterm Infants: A Systematic Review. *Children (Basel).* 2021;8(8):664. doi: [10.3390/children8080664](https://doi.org/10.3390/children8080664)
25. Torró-Ferrero G, Fernández-Rego FJ, Agüera-Arenas JJ, Gomez-Conesa A. Effect of physiotherapy on the promotion of bone mineralization in preterm infants: a randomized controlled trial. *Sci Rep.* 2022;12(1):11680. doi: [10.1038/s41598-022-15810-6](https://doi.org/10.1038/s41598-022-15810-6)
26. Avila-Alvarez A, Urisarri A, Fuentes-Carballal J, Mandiá N, Sucasas-Alonso A, Couce ML. Metabolic Bone Disease of Prematurity: Risk Factors and Associated Short-Term Outcomes. *Nutrients.* 2020;12(12):3786. doi: [10.3390/nu12123786](https://doi.org/10.3390/nu12123786)
27. Cerar S, Paro-Panjan D, Soltirovska-Šalamon A. The role of quantitative ultrasound in diagnosing severe bone metabolic diseases in newborns. *Front Pediatr.* 2023;11:1109553. doi: [10.3389/fped.2023.1109553](https://doi.org/10.3389/fped.2023.1109553)

Complex use of cycle- and power-ergometry in determining the physical working capacity of young athletes

M. F. Khoroshukha¹, M. M. Filippov², A. I. Bosenko³, Ye. L. Mykhaliuk⁴, O. Yu. Buriak¹

¹Boris Grinchenko Kyiv University, Ukraine, ²National University of Ukraine on Physical Education and Sport, Kyiv,

³The State Institution "South Ukrainian National Pedagogical University named after K. D. Ushynsky", Odesa,

⁴Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

physical working capacity, diagnostics, cycle ergometry, power-ergometry, young athletes, adolescence.

Ключові слова:

фізична працездатність, діагностика, велоергометрія, power-ергометрія, юні спортсмени, підлітковий вік.

Надійшла до редакції /
Received: 11.09.2023

Після доопрацювання /
Revised: 10.11.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 15.11.2023

Конфлікт інтересів:
відсутній.

Conflicts of interest:
authors have no conflict
of interest to declare.

*E-mail:
bosenco@ukr.net

The aim of this study is to scientifically substantiate the possibilities of complex use of cycle- and power-ergometry in determining aerobic and anaerobic-aerobic performance of power nature.

Materials and methods. Young athletes (boys) aged 15–16 (n = 91) of the Brovary Higher School of Physical Education (Kyiv region) (experimental group), who participated in the study, were divided into two groups. Group A (n = 47) – speed-power sports (boxing, freestyle wrestling); group B (n = 44) – endurance sports (track and field athletics: 800, 1500, 3000 and 5000-meters race, bicycle racing 50 and 75 km). Sports experience was 3–5 years and more. The control group (group K) consisted of students aged 15–16, who did not play sports (n = 25). Physical working capacity was determined using two methods: submaximal cycle ergometric test PWC₁₇₀ and submaximal power ergometric test PWC₁₇₀. Method of power ergometry (patent of Ukraine No 49417) has no analogues in countries of near and far abroad.

Results. The fact of the specific influence of different kinds of dosed physical exercises (strength and power exercises) on PWC₁₇₀ indicators was established. Thus, no probable differences in aerobic performance indicators were found in wrestlers and boxers during the cycle ergometric test. And conversely, under the conditions of power ergometric testing, we find a significant increase in their PWC₁₇₀ indicators in relation to athletes of endurance sports. The opposite character of changes was observed when testing the track and field athletes and bike riders. According to the results of the conducted cycle ergometry, these athletes had a significant increase in aerobic performance indicators in comparison with the athletes of speed-power sports. However, the changes of anaerobic-aerobic performance were not significant. It was observed that the adolescents, who did not play sports, had statistically insignificant changes in PWC₁₇₀ indicators both in the conditions of cycle ergometric and power ergometric testing.

Conclusions. The fact of specific influence of different types of training exercises on the body functions of adolescents was confirmed. The possibility of introducing the methods of complex use of aerobic (cycle ergometry) and anaerobic-aerobic loads (power-ergometry) into the practice of medico-biological control of young athletes is shown. Diagnostics of various types of physical working capacity (PWC₁₇₀) will provide the coach with operational information about the functional state of the athletes' body, which will allow to effectively manage a training process.

Modern medical technology. 2023;(4):37-44

Комплексне використання вело- і power-ергометрії у визначенні фізичної працездатності юних спортсменів

М. Ф. Хорошуха, М. М. Філіппов, А. І. Босенко, Є. Л. Михалюк, О. Ю. Буряк

Мета роботи – науково обґрунтувати можливості комплексного використання вело- і power-ергометрії у визначенні аеробної та анаеробно-аеробної працездатності силового характеру.

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь юні спортсмени (хлопці) віком 15–16 років (n = 91) Броварського вищого училища фізичної культури (Київська область) (експериментальна група). Обстежених поділили на дві групи: А (n = 47) – швидкісно-силові види спорту (бокс, вільна боротьба); Б (n = 44) – види спорту на витривалість (легка атлетика: біг на 800 м, 1500 м, 3000 м і 5000 м, велоспорт 50 км і 75 км). Спортивний стаж становив 3–5 років і більше. У контрольну групу (К) залучили учнів віком 15–16 років, які не займалися спортом (n = 25). Фізичну працездатність визначали, використовуючи два методи: субмаксимальний велоергометричний тест PWC₁₇₀ і субмаксимальний power-ергометричний тест PWC₁₇₀. Метод power-ергометрії (патент України № 49417) не має аналогів у країнах близького та далекого зарубіжжя.

Результати. Виявили специфічний вплив дозованих фізичних навантажень різного характеру (на силу та витривалість) на показники PWC₁₇₀. Так, у борців і боксерів під час велоергометричного дослідження

не визначили вірогідних відмінностей за показниками аеробної працездатності. Разом із тим, під час power-ергометричного тестування встановили у них суттєве збільшення показників PWC_{170} порівняно зі спортсменами видів спорту на витривалість. Протилежний характер змін виявили впродовж тестування легкоатлетів і велосипедистів. За результатами велоергометрії, у цих спортсменів зареєстровано значний приріст показників аеробної працездатності (на відміну від спортсменів швидко-силових видів). Зміни анаеробно-аеробної працездатності не мали значущих відмінностей. У підлітків, які не займалися спортом, встановили статистично недостовірні зміни показників PWC_{170} під час і велоергометричних, і power-ергометричних тестувань.

Висновки. Підтверджено специфічний вплив тренувальних навантажень різної спрямованості на функції організму підлітків. Показана можливість впровадження в практику медико-біологічного контролю за юними спортсменами методики комплексного використання навантажень аеробного (велоергометрія) та анаеробно-аеробного характеру (power-ергометрія). Діагностика різних видів фізичної працездатності (PWC_{170}) надаватиме тренеру оперативну інформацію про функціональний стан організму спортсменів; це сприятиме ефективному управлінню навчально-тренувальним процесом.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 37-44

Determining the physical working capacity of people of different ages, sexes, professional employment, as an important component of somatic health, is an urgent problem and occupies the important place in the practice of physical education and sports, clinical and sports medicine, physical rehabilitation [1,2,3]. Despite the fact that a large number of scientific works and developments of leading specialists is devoted to this problem, the peculiarities of the specific influence of different types of training exercises in determining a physical working capacity are insufficiently taken into account until today [4,5]. All the above significantly complicates the work of a sports doctor, a rehabilitator, and a trainer in determining the functional state, creating a rehabilitation program and managing the educational and training process of young athletes.

It is well known that the physical working capacity, as a person's potential ability to exert maximum physical effort in a static, dynamic, or mixed work, is assessed using many functional tests, among them: cycle, treadmill, and step ergometric tests PWC_{170} . There are also many methodological approaches to determine both physical working capacity in terms of PWC_{170} and its components [6]. Physical loads of dynamic character are mainly used in the above-mentioned tests. Conducting the research of such kind allows receiving general information about the state of aerobic capabilities of athletes' body. However, for obtaining an objective information about the athlete's functional capabilities, it is expedient to use indicators of aerobic and anaerobic fitness in a complex manner. This will allow to separately describe the contribution of aerobic and anaerobic potential to the general system of energy supply, to identify strong and weak links in the functioning of athletes' body, etc.

For the determination of anaerobic performance in the practice of sports and rehabilitation, there are a number of functional tests: the Wingate test of anaerobic power on cycle ergometer [7,8,9], the Margaria test [10], speed-strength tests [11]. To measure anaerobic power according to the Wingate test, the cycle ergometers of both the old generation (Monark type) and the new one, such as Lode Excalibur Sport, are widely used. The last cycle ergometer correlates well with the previously known ergometer "Monark" [12].

The mentioned tests with high accuracy allow determining the maximum mechanical power of work that the subjects can

achieve during ergometric testing. However, they cannot diagnose physical working capacity by the value of PWC_{170} . Some of them, for example the Margaria test (it involves running up the stairs at maximum speed) requires certain practical skills from the subjects. Therefore, it cannot be used without a preliminary training of the subjects (especially children) for its implementation. In addition, in our opinion, it is not an absolutely atraumatic procedure.

In recent years, the methods of determining physical working capacity (PWC_{170}), carried out in the conditions of sports training or in the so called "field conditions", have been widely used in the practice of sports medicine and sports. These methods are based on the use of the loads specific to particular sports. These include tests using track and field running, cross country skiing, swimming, dosed sports walking, rowing, speed skating, cycling, as well as a barbell test. An example can be the research by Helmi Chaabene, et al. [13]. They developed the new tests and revised existing tests for scientific authenticity (stability, objectivity, validity) in the assessment of special physical performance of martial arts athletes. The physical working capacity (PWC_{170}) of athletes using cyclic loads is determined by the locomotive speed (m/s) upon reaching a heart rate of 170 bpm. Accordingly, when using acyclic loads – according to the indicator of the actually performed mechanical work per unit of time (Wt) and work power (W). These tests are a necessary condition for assessing special physical performance in the chosen sport as one of the components of athletes' training. We developed a power-ergometry method for determining the physical working capacity of athletes based on PWC_{170} [14]. However, in comparison with the above-mentioned methods, our development can be used both in «field» conditions, and in the laboratory. There are the data indicating the possibility of using the submaximal power-ergometry test in the educational process of students of the faculties of health, physical education and sports of higher educational institutions as one of the technical means in conducting a practical training in the course of medical and biological disciplines [15,16].

In the case of conducting functional tests to determine physical performance in laboratory conditions, the method of testing is of great importance. After all, it is known that the nature of training (for example, the predominant effect of physical exertion on the muscles of upper or lower extremities) is reflected in different ways on the indicators of the energy supply of body functions [17,18].

From the research of Mathew Hill, et al. [19] we find the following: cardiorespiratory support of ergometric work of equal power was different in men; it was less stressful when using a cycle ergometer, than a manual ergometer. In the opinion of the researchers, this is due to the fact that the participants performed more work with their lower extremities than with their upper extremities in everyday life. In our opinion, the information from those tests that involve a comprehensive evaluation of both aerobic and anaerobic-aerobic performance (PWC_{170}) [10] can also be important.

The above mentioned will make it possible to quantitatively (in W or $kgm \times min^{-1}$) assess the adaptive capabilities of the organism to work of different orientations (for strength, speed or endurance).

At the same time, we have not found any fundamental scientific works, in which when determining a physical working capacity of athletes, the physical loads of different orientation were harmoniously combined. In this regard there is a need to introduce into the practice of medical and biological control the testing for the diagnostics of aerobic (submaximal cycle ergometric test PWC_{170}) and anaerobic-aerobic (submaximal power ergometric test PWC_{170}) performance of athletes.

The complex use of aerobic and anaerobic loads in laboratory conditions will allow diagnosing various types of physical performance, determining strong and weak links in the functioning of the body, etc. And on this basis to objectively manage the educational and training process of young athletes.

Aim

The aim of this study is to scientifically substantiate the possibilities of complex use of cycle- and power-ergometry in determining aerobic and anaerobic-aerobic performance of power nature.

Materials and methods

Young athletes (boys) aged 15–16 ($n = 91$) of the Brovary Higher School of Physical Education (Kyiv region) participated in the study (experimental group). They were divided into two groups: group A ($n = 47$) – speed-power sports (boxing, freestyle wrestling) (average age – 15.50 ± 0.23 years); group B ($n = 44$) – endurance sports (track and field athletics: 800, 1500, 3000 and 5000-meters race, cycling: 50 and 75 km) (average age – 15.50 ± 0.29 years). Sports experience was 3–5 years and more. Control group of the subjects (group K) consisted of students aged 15–16, who did not play sports ($n = 25$) (average age – 15.50 ± 0.80 years). Physical working capacity was determined with the help of two methods: submaximal cycloergometric test PWC_{170} and submaximal power-ergometry test PWC_{170} .

Method of conducting cycle ergometry research. The subjects successively performed two loads of moderate intensity lasting 5 minutes with a rest interval of 3 minutes between them on a bicycle ergometer of the mechanical type “Monark” (Sweden). The power of the first load was 75 W, respectively, the second – 150 W. The frequency of pedaling was 50–55 revolutions per minute. The speed of pedaling in both cases was constant and made up 20 km/h. Before testing, the saddle height of the bicycle ergometer was adjusted individually for each subject. A saddle

height where the angle of knee bending with the position of leg in its lower point makes up 170–175 degrees is optimal.

In case of performing the first load, the force of mechanical brake (on scale) was 1.5 kg. One revolution corresponded to 6m of “path travelled”. Accordingly, the mechanical work (W) of one revolution is equal to 9 kgm (1.5×6). ~ 250 revolutions were made for 5 minutes of work. Similarly, the work done for 5 minutes was equal to 2250 kgm (9×250) or 22065 J (2250×9.8066), or 22.1 kJ. The power (\dot{W}) of the first load made up 450 kgm/min ($2250 / 5$) or 75 \dot{W} ($450 / 6$). Accordingly, when performing the second load, the force of the mechanical brake made up 3 kg, and the power of work – 900 kgm/min or 150 \dot{W} . The frequency of pedaling remained the same as in the first version. The relative power of the first load was on average $1.0\text{--}1.2 \dot{W} \times kg^{-1}$, the power of other one – $2.0\text{--}2.4 \dot{W} \times kg^{-1}$. At the end of each load (for the last 30 seconds) the heart rate was recorded with the help of a single-channel electrocardiograph. The tape speed was 25 mm/s. PWC_{170} was calculated using the formula of V. L. Karpman.

Method of conducting power-ergometry research.

Submaximal power-ergometry test PWC_{170} (power-ergometry method) is based on the use of static and dynamic loads of power nature – pulling up vertically on a crossbar with a straight medium grip. Quantitative determination (in J) of mechanical work actually performed was carried out using a power ergometer designed by M. F. Khoroshukha [14]. The method has no analogues in countries of near and far abroad.

The research methodology is relatively simple. A subject was offered (without initial warming up) to perform a physical work consisting of two series of loads lasting 4–5 minutes with a 5-minute rest interval between them. The first load consisted of 15 pull-ups, which were made in the mode of one pull-up during 20 s (3–4 s were given for ascent and descent, 16–17 s for rest, while standing on the floor). The second load included 25–30 pull-ups, which, respectively, were performed in the mode of one pull-up during 10 s (3–4 s were given for ascent and descent, 6–7 s for rest). The exercises were performed on a suspended crossbar, which was fixed to the gymnastic wall at the height of the subject's hands raised from the floor.

The power of the first load was $0.6\text{--}0.8 \dot{W} \times kg^{-1}$, respectively, the second one ~ $1.5 \dot{W} \times kg^{-1}$. At the end of each load (for the last 30 s) the heart rhythm was recorded using an electrocardiograph. Tachycardia at the end of the first load was $100\text{--}120 f_n$, at the end of the second one – $140\text{--}160 f_n$ (the average difference made up $40 f_n$). The work was performed under a sound metronome. A teenager was offered to pull himself up to such position that his chin was above the crossbar. In case of muscular fatigue, he could pull himself to a lower height.

The mechanical work was determined using the formula:

$$W = P \times S \times K,$$

where W – work performed for an hour t (J),

P – body weight (kg),

S – height of lifting (indicator of the electronic counter of the ergometer) (m),

K – a correction factor that considers the physical expenses (“negative work”), which are associated with the descent from the crossbar. According to the data of our research it is equal to 1.50.

The average work power was determined using the formula:

$$\dot{W} = W / t,$$

where \dot{W} – work power (W),

W – performed work (J),

t – time of performing work (min).

Physical working capacity PWC_{170} , as in the case of cycle ergometric studies, was calculated using the well-known formula of V. L. Karpman [7].

The evaluation of the research results was carried out according to the data of the comparative analysis of the first and second (after 6 months) stages of examination of athletes according to the following scheme:

- 1) separately for each athletic discipline;
- 2) separately for groups of athletes;
- 3) carrying out a comparative analysis with a control group.

Athletes were examined in the middle of the preparatory and pre-competition periods, students in October (the first study) and in April – for a second time (the second research). Altogether there were 227 human studies conducted.

Examinations were conducted in the first half of the day from 9:00 till 13:00, that corresponds to the periods of the increased efficiency of the human body. The day before the study the athletes did not train in the second half of the day. The air temperature during laboratory testing was in the range from +18 °C till +23 °C.

The results of the conducted research were statistically processed using the package of the standard computer program Statistica 10. Arithmetic mean (X), mean square deviation (SD) and error of the mean (m) were calculated. The significance of group differences between values (p) was assessed by the parametric Student's t-test. The difference was considered statistically significant at the 5 % level of significance (at $p < 0.05$).

Results

Table 1 shows the values of PWC_{170} estimating physical working capacity in adolescents who play speed-power sports (wrestlers, boxers). The research was conducted using two alternative methods of testing: cycle ergometry (in determining aerobic work capacity) and power-ergometry (respectively, anaerobic-aerobic work capacity of power nature).

The fact of the specific influence of training loads of different orientation (in this case, mainly on strength and speed) on the nature of changes (in dynamics) of physical performance values comes to the front. In wrestlers and boxers, during the cycle ergometry study, no significant differences were found in indicators of both absolute and relative aerobic capacity ($p > 0.05$ in both cases). While in the conditions of power-ergometry testing, a significant increase (at $p < 0.001$) in both above-mentioned indicators of static and dynamic work was found.

The opposite nature of changes was observed when testing representative of endurance sports (track and field athletes, cyclists) (Table 2).

Thus, a significant increase (in dynamics) of the absolute and relative values of the aerobic capacity was recorded in these athletes when conducting cycle ergometry (in all cases $p < 0.001$).

While the changes in their working capacity of power nature were insignificant ($p > 0.05$).

In adolescents who did not play sports (control group), statistically insignificant ($p > 0,05$) changes in absolute and relative indicators of PWC_{170} were predictably observed in conditions of cycle- and power-ergometry testing (Table 3).

The next stage of experimental research was to conduct a comparative analysis of the physical performance indicators in young athletes who, according to the classification of sports by A. G. Dembo, were united in two large groups: group A – sports that mainly developed speed and strength qualities (wrestlers, boxers) and group B – endurance sports (track and field athletes, cyclists) (Tables 4, 5).

From the materials of Table 4 we find the following:

– there was a statistically significant increase in absolute and relative values of PWC_{170} in athletes of group B noted under the conditions of conducting cycle ergometry studies in comparison with athletes of group A and representatives of the control group ($p < 0.001$ in all cases);

– significantly higher values of absolute and relative indicators of PWC_{170} were also observed in adolescents playing speed-power sports in comparison with the students who did not play sports ($p < 0.05$ in both cases).

The opposite nature of changes in the physical performance of young athletes was observed when conducting a power-ergometry test.

Thus, the representatives of group A had a significant increase (at $p < 0.001$) in both absolute and relative values of PWC_{170} in comparison with their peers-athletes who mainly developed the quality of endurance (Group B), and non-athlete students (Group K). Paradoxically, no statistically significant differences were found in the absolute and relative indicators of PWC_{170} , which were registered among athletes of group B and students of group K ($p > 0.05$ in both cases).

Repeated (after 6 months) dynamic examinations (Table 5) did not reveal any differences in the nature of changes in PWC_{170} indicators that had been registered in previous studies (Table 4). Thus, the indicators of relative and absolute values of physical working capacity in representatives of speed-power sports (Group A) were during conducting power-ergometry test, significantly higher compared to athletes of group B and non-athlete students ($p < 0.001$ in both cases). And conversely, the data of cycle ergometry studies show that the highest values of indicators of aerobic performance are registered in track and field athletes and cyclists compared to other subjects ($p < 0.001$ in all cases). It should be noted that the endurance is the dominant motor quality for athletes of group B, and for cyclists, among other things, the work on a bicycle ergometer is also a specific load.

From a practical point of view, it was interesting to determine the relationship between the results obtained and the success of the surveyed athletes at the Championships of Ukraine in the selected sports. By means of a survey, according to groups, young athletes who successfully performed at competitions and justified the forecasts of specialists (strong group) were identified. Similarly, athletes who, according to objective results and coaches' opinions, performed unsatisfactorily were identified (weak group) (Tables 6, 7).

Table 1. Dynamics of values of PWC_{170'} estimating physical working capacity in adolescents aged 15–16 who play speed-power sports (Group A), according to the data of cycle- and power-ergometry testing (n = 92), X ± m

Stages of research	n	Cycle ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
Wrestlers					
First	24	169.70 ± 3.28	2.60 ± 0.03	79.00 ± 2.25	1.20 ± 0.03
Second	22	174.80 ± 3.11	2.70 ± 0.04	97.30 ± 2.46	1.40 ± 0.04
Significance of difference		>0.05	>0.05	<0.001	<0.001
Boxers					
First	23	173.80 ± 3.13	2.65 ± 0.04	77.50 ± 2.02	1.10 ± 0.04
Second	23	177.20 ± 3.45	2.73 ± 0.05	96.40 ± 2.13	1.40 ± 0.04
Significance of difference		>0.05	>0.05	<0.001	<0.001

Table 2. Dynamics of values of PWC_{170'} estimating physical working capacity in adolescents aged 15–16 who played endurance sports (Group B), according to the data of cycle ergometry and power-ergometry test (n = 87), X ± m

Stages of research	n	Cycle ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
Track and field athletes					
First	23	194.20 ± 2.06	2.90 ± 0.03	51.90 ± 2.39	0.80 ± 0.03
Second	22	212.80 ± 3.18	3.10 ± 0.05	54.40 ± 2.80	0.80 ± 0.03
Significance of difference		<0.001	<0.001	>0.05	>0.05
Cyclists					
First	21	204.60 ± 2.34	3.00 ± 0.03	55.20 ± 2.03	0.80 ± 0.03
Second	21	221.60 ± 3.29	3.20 ± 0.04	57.10 ± 2.49	0.80 ± 0.03
Significance of difference		<0.001	<0.001	>0.05	>0.05

Table 3. Dynamics of values of PWC_{170'} test estimating physical working capacity in adolescents aged 15–16 who did not play sports (Group K), according to the data of cycle- and power-ergometry testing (n = 48), X ± m

Stages of research	n	Cycle ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
First	25	133.90 ± 3.04	2.30 ± 0.03	52.00 ± 3.53	0.70 ± 0.03
Second	23	136.70 ± 3.35	2.30 ± 0.03	54.20 ± 4.31	0.80 ± 0.04
Significance of difference		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Table 4. Comparative analysis of values of PWC_{170'} estimating physical working capacity in adolescents aged 15–16, according to the data of the first stage of research (n = 116), X ± m

Group	n	Cycle ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
Group A	47	171.70 ± 3.20	2.60 ± 0.04	78.30 ± 2.13	1.20 ± 0.04
Group B	44	199.40 ± 2.20	2.90 ± 0.03	53.60 ± 2.21	0.80 ± 0.03
Group K	25	133.90 ± 3.04	2.30 ± 0.03	52.00 ± 3.53	0.70 ± 0.03
Significance of difference	p1–p2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	p1–p3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	p2–p3	<0.001	<0.001	>0.05	>0.05

Table 5. Comparative analysis of values of PWC_{170'} estimating physical working capacity in adolescents aged 15–16 according to the data of the second stage of research (n = 111), X ± m

Group	n	Cycle ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
Group A	45	176.00 ± 3.28	2.70 ± 0.05	96.80 ± 2.30	1.40 ± 0.04
Group B	43	217.20 ± 3.23	3.20 ± 0.05	55.80 ± 2.65	0.80 ± 0.03
Group K	23	136.70 ± 3.35	2.30 ± 0.03	54.20 ± 4.31	0.80 ± 0.04
Significance of difference	p1–p2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	p1–p3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	p2–p3	<0.001	<0.001	>0.05	>0.05

Table 6. Indicators of physical performance of PWC_{170'} young sportsmen of 15–16 years old, representatives of high-speed and power sports who performed successfully (strong group) and unsuccessfully (weak group) at competitions (n = 47), X ± m

Group	n	Cycling ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
Strong	10	179.90 ± 3.24	2.80 ± 0.04	98.50 ± 2.24	1.40 ± 0.04
Weak	37	172.80 ± 3.42	2.70 ± 0.05	90.20 ± 2.33	1.30 ± 0.03
Significance of difference (p)		>0.05	>0.05	<0.01	<0.001

Table 7. Indicators of physical performance PWC_{170'} of young sportsmen of 15–16 years old, representatives of endurance sports, who performed successfully (strong group) and unsuccessfully (weak group) at competitions (n = 44), X ± m

Groups	n	Cycling ergometry method		Power-ergometry method	
		PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹	PWC _{170'} W	PWC _{170'} W × kg ⁻¹
Strong	10	226.70 ± 3.41	3.30 ± 0.04	56.70 ± 2.73	0.80 ± 0.03
Weak	34	207.80 ± 3.47	3.00 ± 0.05	54.20 ± 2.44	0.80 ± 0.03
Significance of difference (p)		<0.01	<0.001	>0.05	>0.05

The data of *Table 6* show that 10 sportsmen of group A (5 boxers and 5 wrestlers) who performed well at competitions and took prizes, according to the results of power-ergometric researches, had significantly better absolute ($p < 0.01$) and relative ($p < 0.001$) values of anaerobic-aerobic work capacity than those persons ($n = 37$) who did not take prizes. It should be noted that there were no significant differences in aerobic performance (cycling ergometry method) between PWC_{170'} athletes of strong and weak groups ($p > 0.05$).

Accordingly, *Table 7* presents the results of the comparative analysis of physical performance of 10 best sportsmen of 15–16 years old of group B (endurance sports) who got prize places at competitions (strong group) and their peers ($n = 34$) who performed unsuccessfully (weak group). The data of this table indicate that the athletes-winners of group B (4 runners and 6 cyclists) had significantly better absolute ($p < 0.01$) and relative ($p < 0.001$) values of aerobic performance (cycling ergometry method) in comparison with other ($n = 34$) athletes of this group who performed unsuccessfully at the competitions. However, in the values of anaerobic-aerobic performance by power-ergometry there were no statistically significant differences between representatives of strong and weak groups of endurance sports ($p > 0.05$).

Discussion

Assessment of physical performance occupies one of the leading places in functional diagnostics and is the basis for managing the educational and training process in both sports and recreational physical education. Despite the fact that a large number of scientific papers and developments by leading specialists are devoted to this problem, the specific impact of different types of training exercises on the determination of physical performance is still not sufficiently taken into account [1,2,3,4,5]. This substantiates the relevance, theoretical and practical significance of the chosen direction of study on the search and development of the latest technologies of functional diagnostics [13]. After all, today in Ukraine there are acute issues of selection and recruitment of national teams of different levels and sports. A number of sports cultivated in Ukraine still lag behind the world level [23,25].

Experts emphasise the need to take into account not only age and gender characteristics or physical development, but also the characteristics of physical performance and energy supply mechanisms [23]. To solve such problems, knowledge of individual characteristics of physical and functional fitness depending on the specialisation or role of the athlete [5,6,23]. Teachers and

coaches also need feedback on the impact of the applied means, in particular physical exercises, on individual systems and the athletes' body [16,19,20,25].

The results of our researches which provided complex use of aerobic and anaerobic-aerobic activities in diagnostics of physical work capacity of young sportsmen, testify to the double nature of changes of PWC₁₇₀ indicators. The opposite nature of the above changes depends on the following two factors. The first factor is the predominant orientation of the training process. The second factor is the type of dosed physical activity, namely:

- 1) anaerobic-aerobic power activities during power ergometric tests;
- 2) aerobic activities, respectively, during cycling ergometric tests.

According to the results of our studies, the most widespread for high-speed and power sports (group A) was a statistically significant increase in dynamics of absolute and relative indicators of anaerobic-aerobic work capacity, according to power-ergometry ($p < 0.001$) and insignificant changes of aerobic work capacity at cycling ergometry ($p > 0.05$). For endurance sports (group B) there was a significant increase ($p < 0.001$) in aerobic performance and a slight increase ($p > 0.05$) in anaerobic-aerobic performance. As expected, the representatives of the control group (group K) showed insignificant nature of changes ($p > 0.05$) in both aerobic and anaerobic-aerobic performance. The above is indisputable evidence of the specific impact of physical activity on body functions (including physical performance) of people of different ages and occupations [3,6,8,20,21,22]. The result of this impact is the improvement of some and deterioration of other body functions.

This can be confirmed by the results of comparative analysis of physical performance data obtained by different methods of sportsmen-winners with those who failed to perform at high-level competitions. On the basis of the conducted researches it was found that the sportsmen-winners of group A had significantly better indicators of anaerobic-aerobic productivity ($p < 0.01$) (power-ergometry method), than the rest of the group. Accordingly, there were no significant differences ($p > 0.05$) in aerobic power (cycling ergometry) between the athletes of this group. On the contrary, the athletes-winners of group B had significantly better ($p < 0.01$) values of aerobic capabilities compared to other representatives of this group.

Therefore, the complex use of cycle- and power-ergometry methods in laboratory conditions in determining aerobic and anaerobic-aerobic performance can be a component of the medical and pedagogical examination of athletes. The purpose of such examinations is to adjust the educational process in relation to specific pedagogical tasks. These tasks include:

- 1) transition to another state of fitness of an athlete;
- 2) assessment of the state of fitness;
- 3) resolving issues related to changes in activities in the training cycle, etc.

In the process of mass examinations of athletes in order to save time we suggest using only one dosed power-ergometric load of submaximal power. Physical capacity in this case is calculated according to the formula L. I. Abrosimova [14].

The sequence of complex testing in determining the physical performance of athletes is as follows. First, static-dynamic work

of a power nature (power-ergometry method) is performed, then (after 5 minutes of rest) – dynamic work of an aerobic orientation (cycling ergometry method).

Note. For trained athletes for whom pull-ups are one of the specific activities (gymnasts, climbers, wrestlers, workouters, etc.), you can offer 50 (60) pull-ups. Under these conditions, one pull-up is performed for 6 (5) s (respectively, 3–4 (2–3) s are allocated for ascent and descent, and 2–3 s for rest). For young athletes of 10–12 years old, the senior lecturer of the Department of Physical Therapy and Ergotherapy, co-author of this article, O. Y. Buriak suggests power loads of 10 pull-ups (one pull-up is performed for 30 s; 3–4 s are allocated for ascent and descent, 26–27 s for rest, standing on the floor).

Conclusions

1. The fact of specific influence of various training loads on the body functions of adolescents has been confirmed. The possibility of introducing into the practice of medical-biological control over the young athletes the methods of complex use of aerobic (cycle ergometry) and anaerobic-aerobic (power-ergometry) loads is shown. The diagnostics of various types of physical working capacity (PWC₁₇₀) will provide the coach with operational information about the functional state of the body of athletes, which will allow to effectively manage the educational and training process.

2. In case of mass health examination with complex testing of aerobic and anaerobic-aerobic performance (for example, during the annual medical check-up of athletes), for the purpose of saving time, it is expedient to use only one dosed cycle- and power-ergometry load of submaximal power.

Prospects for further research is to scientifically substantiate the possibilities of complex use of cycle- and power-ergometry in determining the physical capacity of athletes with disorders of the musculoskeletal system.

Information about the authors:

Khoroshukha M. F., PhD, DSc, Professor of the Department of Physical Therapy and Ergotherapy, Borys Grinchenko Kyiv University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-5024-5792](https://orcid.org/0000-0001-5024-5792)

Filippov M. M., PhD, DSc, Professor of the Department of Medical and Biological disciplines, National University of Ukraine on Physical Education and Sport, Kyiv.

ORCID ID: [0000-0001-5096-7445](https://orcid.org/0000-0001-5096-7445)

Bosenko A. I., PhD, DSc, Professor of the Department of Biology and Health Protection, The State Institution "South Ukrainian National Pedagogical University named after K. D. Ushynsky", Odesa, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-3472-0412](https://orcid.org/0000-0003-3472-0412)

Mykhaliuk Ye. L., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Physical Rehabilitation, Sports Medicine, Physical Education and Health, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-3607-7619](https://orcid.org/0000-0003-3607-7619)

Buriak O. Yu., PhD-student, Senior Lecturer of the Department of Physical Therapy and Ergotherapy, Borys Grinchenko Kyiv University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-7074-5743](https://orcid.org/0000-0001-7074-5743)

Відомості про авторів:

Хорошуха М. Ф., д-р пед. наук, канд. мед. наук, професор каф. фізичної терапії та ерготерапії, Київський університет імені Бориса Грінченка, Україна.

Філіппов М. М., д-р біол. наук, професор каф. медико-біологічних дисциплін, Національний університет фізичного виховання і спорту України, м. Київ.

Босенко А. І., д-р пед. наук, канд. біол. наук, професор каф. біології і охорони здоров'я, ДЗ «Південноукраїнський національний педагогічний університет імені К. Д. Ушинського», м. Одеса, Україна.

Михалюк С. Л., д-р мед. наук, професор каф. фізичної реабілітації, спортивної медицини, фізичного виховання і здоров'я, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Буряк О. Ю., аспірантка, старший викладач каф. фізичної терапії та ерготерапії, Київський університет імені Бориса Грінченка, Україна.

References

- Foster C, Porcari JP, Cress M. Clinical exercise testing. In: Thompson WR, editor. ACSM's Clinical Exercise Physiology. Wolters Kluwer; Baltimore, MD, USA: 2019. p. 349-364.
- Alajmi RA, Foster C, Porcari JP, Radtke K, Doberstein S. Comparison of non-maximal tests for estimating exercise capacity. *Kinesiology*. 2020;52(1):10-8. doi: [10.26582/k.52.1.2](https://doi.org/10.26582/k.52.1.2)
- Zenina I, Gavrilova N, Kuzmenko N, Kachalov O. [Factors that ensure an adequate level of physical fitness in female students of higher education institutions]. *Scientific Journal of NPDU. Physical culture and sports*. 2022;12(158):36-9. Ukrainian. doi: [10.31392/NPU-nc.series15.2022.12\(158\).09](https://doi.org/10.31392/NPU-nc.series15.2022.12(158).09)
- Diachenko A, Rusanova O, Huang Z, Chenging Y. [Characteristics of special work capacity functional support in skilled 1000 m kayakers and canoeists]. *Nauka v olimpiiskom sporte*. 2020;(4):16-23. Ukrainian. doi: [10.32652/olympic2020.4_2](https://doi.org/10.32652/olympic2020.4_2)
- Mykhaliuk YL, Potapenko MS, Horokhovskiy YY, Hunina LM, Holovashchenko RV. Characteristics of autonomic maintenance of central hemodynamics and physical working capacity in highly qualified sprint swimmers. *Zaporozhye medical journal*. 2020;22(2):245-9. doi: [10.14739/2310-1210.2020.2.200627](https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.2.200627)
- Bosenko A, Oriik N, Palshkova I. Dynamics of functional capabilities among 17-22 years old girls with different vegetative status during the ovarian-menstrual cycle. *Georgian Med News*. 2019;(294):27-31. PMID: 31687944.
- Jakovljević DK, Eric M, Jovanovic G, Dimitric G, Cupic MB, Ponorac N. Explosive muscle power assessment in elite athletes using wingate anaerobic test. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2018;24(2):107-11. doi: [10.1590/1517-869220182402183151](https://doi.org/10.1590/1517-869220182402183151)
- Bringhurst RF, Wagner DR, Schwartz S. Wingate Anaerobic Test Reliability on the Velotron With Ice Hockey Players. *J Strength Cond Res*. 2020;34(6):1716-22. doi: [10.1519/JSC.0000000000002458](https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002458)
- Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Bdeir A, Fares J, Baydoun H. Physical Testing in Sports Rehabilitation: Implications of a Potential Return to Sport. *Arthrosc Sports Med Rehabil*. 2022 Jan 28;4(1):e189-e198. doi: [10.1016/j.asmr.2021.09.034](https://doi.org/10.1016/j.asmr.2021.09.034)
- Beitia P, Stamatias A, Amasay T, Papadakis Z. Predicting Firefighters' Physical Ability Test Scores from Anaerobic Fitness Parameters & Mental Toughness Levels. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(22):15253. doi: [10.3390/ijerph192215253](https://doi.org/10.3390/ijerph192215253)
- Wood R. Speed and Power Fitness Tests [Internet]. Topend Sports Website. 2008. [cited 2023 Nov 21]. Available from: <https://www.topendsports.com/testing/anaerob.htm>
- Lunn WR, Axtell RS. Validity and Reliability of the Lode Excalibur Sport Cycle Ergometer for the Wingate Anaerobic Test. *J Strength Cond Res*. 2021;35(10):2894-901. doi: [10.1519/JSC.0000000000003211](https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000003211)
- Chaabene H, Negra Y, Bouguezzi R, Capranica L, Franchini E, Prieske O, et al. Tests for the Assessment of Sport-Specific Performance in Olympic Combat Sports: A Systematic Review With Practical Recommendations. *Front Physiol*. 2018;9:386. doi: [10.3389/fphys.2018.00386](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00386)
- Khoroshukha M. [Determination of physical performance in sports: power-ergometry method (from the author's many years of experience)]. *Sport Science and Human Health*. 2022;1(7):110-27. Ukrainian. doi: [10.28925/2664-2069.2022.19](https://doi.org/10.28925/2664-2069.2022.19)
- Bondarchuk VI, Bai AV, Myndziv KV, Vayda OV. [Features of application of technical means in the educational process of students on disciplines: "Bases of practical activity in physical rehabilitation (introduction to the specialty)", "Therapeutic exercises" and "Biomechanics and clinical kinesiology"]. *Medical education*. 2019;(3):6-13. Ukrainian. doi: [10.11603/me.2414-5998.2019.3.10642](https://doi.org/10.11603/me.2414-5998.2019.3.10642)
- Honcharenko OY. [Changes in humoral and cellular immunity, physical capability under the influence of power fitness]. PhD [dissertation]. Kyiv: National University of Ukraine on Physical Education and Sport; 2020. Ukrainian. Available from: <https://nrat.ukrintei.ua/en/searchdoc/0820U100524/>
- Aktas S, Cakmakci O. Examination of lower-upper limb of power and force parameters of elite athletes. *Phys Educ Stud*. 2020;24(6):340-7. doi: [10.15561/20755279.2020.0606](https://doi.org/10.15561/20755279.2020.0606)
- Hammami M, Gaamouri N, Suzuki K, Shephard RJ, Chelly MS. Effects of Upper and Lower Limb Plyometric Training Program on Components of Physical Performance in Young Female Handball Players. *Front Physiol*. 2020;11:1028. doi: [10.3389/fphys.2020.01028](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01028)
- Hill M, Talbot C, Puddiford M, Price M. Cardiorespiratory and perceptual responses to self-regulated and imposed submaximal arm-leg ergometry. *Eur J Appl Physiol*. 2018;118(5):1011-9. doi: [10.1007/s00421-018-3838-7](https://doi.org/10.1007/s00421-018-3838-7)
- Arikan Ş, Revan S. The Effect of Bicycle Training Program on Aerobic and Anaerobic Performance. *Turk J Sport Exe*. 2020;22(1):19-23. Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/tsed/issue/53281/678929>
- Khoroshukha M, Griban G, Terentjeva N, Tkachenko P, Petrachkov O, Semeniv B, et al. Influence of different training activities on development of junior athletes' logical thinking. *Intern J Human Mov Sports Sci*. 2021;9(1):62-70. doi: [10.13189/saj.2021.090109](https://doi.org/10.13189/saj.2021.090109)
- Silva AF, Ramirez-Campillo R, Ceylan HI, Sarmento H, Clemente FM. Effects of Maturation Stage on Sprinting Speed Adaptations to Plyometric Jump Training in Youth Male Team Sports Players: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open Access J Sports Med*. 2022;13:41-54. doi: [10.2147/OAJSM.S283662](https://doi.org/10.2147/OAJSM.S283662)
- Ieremenko N, Shynkaruk O, Moseychuk Y, Moroz O, Ivashchenko O, Yarmak O, et al. Analysis of Main Ergometric Parameters of Elite Kayak Athletes Specialized in Different Distance Events. *Sport Mont*. 2021;19(2):59-63. doi: [10.26773/smj.210610](https://doi.org/10.26773/smj.210610)
- Bezmylov M, Shynkaruk O, Griban G, Semeniv B, Yudenko O, Lytvynenko A, et al. Peculiarities of Physical Fitness of 17-20 Years Old Basketball Players Taking into Account Their Playing Role. *Intern J Human Mov Sports Sci*. 2022;10(6):1163-72. doi: [10.13189/saj.2022.100606](https://doi.org/10.13189/saj.2022.100606)
- Shynkaruk O, Shutova S, Serebriakov O, Nagorna V, Skorohod O. Competitive performance of elite athletes in modern ice hockey. *Journal of Physical Education and Sport*. 2020;20(1)76: 511-6. doi: [10.7752/jpes.2020.s1076](https://doi.org/10.7752/jpes.2020.s1076)

Influence of organism stimulation with bacterial lipopolysaccharide on nitric oxide production and metabolism in rat heart on the background of metabolic syndrome

O. Ye. Akimov¹*, A. O. Mykytenko², V. O. Kostenko³

Poltava State Medical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

bacterial lipopolysaccharide, nitric oxide, heart, peroxyxynitrite, nitrosothiols.

Ключові слова:

бактеріальний ліпополісахарид, оксид азоту, серце, пероксинітрит, нітрозотіоли.

Надійшла до редакції / Received: 02.10.2023

Після доопрацювання / Revised: 19.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 25.10.2023

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest:

authors have no conflict of interest to declare.

*E-mail:

o.akimov@pdmu.edu.ua

Aim. The aim of the study was to establish the changes in nitric oxide production and metabolism in rat heart during combined influence of organism stimulation with bacterial lipopolysaccharide (LPS) and modeling of metabolic syndrome (MetS).

Materials and methods. The study was conducted on 24 mature male Wistar rats weighing 200–260 g. Experiment lasted 60 days. The animals were divided into 4 groups of 6 animals each: control group, MetS group, LPS stimulation group, LPS + MetS group. MetS was reproduced by using a 20 % fructose solution as the only source of drinking water. LPS of *Salmonella typhi* was administered at a dose of 0.4 µg/kg intraperitoneally. Animals from LPS + MetS group received a 20 % fructose solution as the only source of drinking water and were administered LPS. In 10 % tissue homogenate of rat heart we studied: total activity of NO-synthases (NOS), activity of constitutive (cNOS) and inducible (iNOS) isoforms, activity of nitrate (NaR) and nitrite (NiR) reductases, concentration of peroxyxynitrites (ONOO⁻), nitrites, nitrosothiols and hydrogen sulfide.

Results. Combination of MetS and stimulation of organism with LPS led to increase in total NOS activity by 32.72 % compared to control group. Activity of cNOS did not change compared to control group. Activity of iNOS increased by 33.76 %. Arginase activity decreased by 23.53 %. NaR activity and NiR activity were increased by 86.67 % and by 149.29 %, respectively. Combination of MetS and stimulation of organism with LPS led to decrease in nitrite and nitrosothiols concentration by 38.73 % and by 54.79 %, respectively. Under these conditions concentration of ONOO⁻ elevated by 398.0 % compared to control group. Concentration of H₂S decreased by 27.56 %.

Conclusions. Combination of metabolic syndrome and stimulation of organism with bacterial lipopolysaccharide leads to prevalence of peroxyxynitrite formation during increased nitric oxide production NO-synthase-dependent and nitrate-nitrite-NO pathways in rat heart.

Modern medical technology. 2023;(4):45-50

Вплив стимуляції організму бактеріальним ліпополісахаридом на продукцію та метаболізм оксиду азоту в серці щурів за умов метаболічного синдрому

О. Є. Акімов, А. О. Микитенко, В. О. Костенко

Мета роботи – встановлення змін продукції та метаболізму оксиду азоту в серці щурів під час комбінованого впливу на організм стимуляції бактеріальним ліпополісахаридом (ЛПС) та моделювання метаболічного синдрому (МетС).

Матеріали та методи. Дослідження здійснили на 24 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар масою 200–260 г. Експеримент тривав 60 днів. Тварин поділили на 4 групи по 6 особин: контрольна група, група МетС, група стимуляції ЛПС, група ЛПС + МетС. МетС відтворений із використанням 20 % розчину фруктози як єдиного джерела питної води. ЛПС *Salmonella typhi* вводили інтроперитонеально в дозі 0,4 мкг/кг. Тварини з групи ЛПС + МетС отримували 20 % розчин фруктози як єдине джерело питної води, а також їм вводили ЛПС. У 10 % тканинному гомогенаті серця щурів досліджували сумарну активність NO-синтаз (NOS), активність конститутивної (cNOS) та індукційної (iNOS) ізоформ, активність нітрат (NaR) і нітрит (NiR) редуктаз, концентрацію пероксинітритів (ONOO⁻), нітритів, нітрозотіолів і гідроген сульфід.

Результати. Поєднання МетС і стимуляції організму ЛПС призвело до збільшення сумарної активності NOS на 32,72 % порівняно з контрольною групою. Активність cNOS порівняно з контрольною групою не змінилась. Активність iNOS зросла на 33,76 %. Активність аргінази знизилася на 23,53 %. Активність NaR і NiR зросла на 86,67 % та 149,29 % відповідно. Поєднання МетС і стимуляції організму ЛПС спричинило зниження концентрації нітритів і нітрозотіолів на 38,73 % і 54,79 % відповідно. За цих умов концентрація ONOO⁻ підвищилася на 398,0 % порівняно з контрольною групою. Концентрація H₂S зменшилася на 27,56 %.

Висновки. Поєднання метаболічного синдрому та стимуляції організму бактеріальним ліпополісахаридом призводить до переважання утворення пероксинітриду під час підвищеного утворення оксиду азоту від NO-синтазозалежного та нітрат-нітрид-NO шляхів у серці щурів.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 45-50

Nitric oxide (NO) is an important regulator of vascular tonus, as well as a signal molecule. Its function in heart is rather well established [1]. However, besides signaling and vascular tonus control functions NO can affect redox homeostasis and lead to development of oxidative and nitrosative damage to cells and tissues [2,3]. In mammalian cells NO is predominantly produced by specific enzymes, namely, nitric oxide synthases (EC 1.14.13.39, NOS). NOS can produce nitric oxide by transformation of L-arginine to L-citrulline in presence of electron donor (NADPH + H) and oxygen.

In the case of hypoxia or lack of substrate for NOS function another pathway of nitric oxide production exists. Nitric oxide can be formed from nitrates and nitrites by their enzymatic and non-enzymatic reduction [4]. Enzymes responsible for reduction of nitrates and nitrites to nitric oxide work in tandem and are called nitrate (NaR) and nitrite (NiR) reductases. They act like a backup system to ensure sufficient production of nitric oxide even under hypoxic conditions or other cases of NOS-dependent NO production impairment. This reductive pathway of NO synthesis is used for treatment of heart failure for many years [5].

Metabolic syndrome (MetS) is well known for its ability to cause heart failure and other cardiac diseases [6]. One of the mechanisms underlying cardiac complications of MetS is disruption of NO synthesis and utilization [7,8]. On the other hand, bacterial lipopolysaccharide (LPS), which can enter blood during sepsis may also lead to impaired NO synthesis, and endothelial dysfunction [9]. Taking into account, that patients with MetS are more prone to bacterial invasions, simultaneous influence of LPS and MetS on organism cannot be excluded [10]. Scientific literature provides limited amount of data about combined effect of LPS and MetS on production and utilization of NO in heart.

Aim

The aim of the study was to establish the changes in nitric oxide production and metabolism in rat heart during combined influence of organism stimulation with bacterial lipopolysaccharide and modeling of metabolic syndrome.

Materials and methods

The study was conducted on 24 mature male Wistar rats weighing 200–260 g. The animals were divided into 4 groups of 6 animals each: control group, MetS group, LPS stimulation group, LPS + MetS group. MetS was reproduced by using a 20 % fructose solution as the only source of drinking water for 60 days [11]. Stimulation of the organism with the bacterial LPS of *Salmonella typhi* (*S. typhi*) was carried out according to the following scheme: in the first week, animals were administered LPS at a dose of 0.4 µg/kg intraperitoneally three times a week, then LPS was administered at a dose of 0.4 µg/kg intraperitoneally once

a week throughout the experiment (60 days) [12]. Animals from LPS + MetS group received a 20 % fructose solution as the only source of drinking water and were administered LPS according to the scheme of LPS stimulation group.

The animals were kept in the vivarium of the Poltava State Medical University under standard conditions. We worked with laboratory animals according to “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes”. The withdrawal of animals from the experiment was carried out under thiopental anesthesia by taking blood from the right ventricle of the heart. All manipulations with laboratory animals were approved by the Bioethics Commission of the Poltava State Medical University (Record No. 206 from 24.06.2022).

The object of the study was a 10 % homogenate of rat heart. Tissue homogenate was prepared on Tris-HCl buffer solution (0.2 M, pH = 7.4) by homogenization of 1 g of tissue in 9 ml of Tris-HCl buffer. Total NOS activity was evaluated by increase in nitrite (NO₂⁻) concentration after incubation homogenated tissue samples for 30 min at temperature 37 °C in the incubation solution (3.1 ml) containing: 2.5 ml of 161 mM Tris-buffer (pH = 7.4), 0.3 ml of 31 mM L-arginine, 0.1 ml 32 µM NADPH and 0.2 ml of 10 % tissue homogenate [13].

In order to evaluate the activity of constitutive isoforms of NO-synthase (cNOS) we used following procedure: 0.2 ml of 10 % tissue homogenate was taken for analysis and was incubated for 60 min at t = 37 °C in incubation solution (3.3 ml) containing: 2.5 ml of 152 mM Tris-buffer (pH = 7.4), 0.3 ml of 29 mM L-arginine, 0.2 ml of 545 µM aminoguanidine hydrochloride and 0.1 ml of 30 µM NADPH. Activity of inducible isoform of NO-synthase (iNOS) was calculated by formula: iNOS = NOS - cNOS (µmol/min per g of protein) [12,13]. We used Griess-Ilosvay reagent for nitrite estimation (1 % sulfanilic acid in 30 % acetic acid and 0.1 % 1-naphtylamine in the same solvent) [12].

Total activity of arginases was assessed by difference of L-ornithine concentration before and after incubation of 0.1 ml of 10 % tissue homogenate in incubation solution (0.8 ml) containing 0.5 ml of 125 mM phosphate buffer (pH = 7.0), 0.2 ml of 6 mM L-arginine [13]. Evaluation of L-ornithine was performed after addition 0.1 ml of modified Chinard's reagent (2.5 % ninhydrin on acidic mixture consisting from 2:3 60 % orthophosphoric and ice acetic acids mixed at ratio 6:4 with water) and 1.0 ml of ice acetic acid [12].

Nitrite reductase (NiR) activity was assessed by decrease in nitrite content after 60 min at t = 37 °C incubation of 0.2 ml of 10 % tissue homogenate in incubation medium (2.3 ml) consisting of: 1 ml of 87 mM phosphate buffer (pH = 7.0), 1 ml of 4.35 mM sodium nitrite, and 0.1 ml of 61 µM NADH. Nitrites content was measured before and after incubation [12,13].

Nitrate reductase (NaR) activity was assessed by decrease in nitrate content after 60 min at t = 37 °C incubation of 0.2 ml of

Table 1. Production and metabolism of nitric oxide in rat heart under conditions of metabolic syndrome and stimulation of the organism with bacterial lipopolysaccharide (M ± SE)

Parameter, units of measurement		Groups			
		Control, n = 6	MetS, n = 6	LPS stimulation, n = 6	LPS + MetS, n = 6
NOS activity, µmol/min per g of protein	Total	1.62 ± 0.02	2.38 ± 0.03*	2.30 ± 0.02*	2.15 ± 0.02*#^
	cNOS	0.0530 ± 0.0002	0.0470 ± 0.0003*	0.0930 ± 0.0008*#	0.0530 ± 0.0003#^
	iNOS	1.57 ± 0.02	2.34 ± 0.03*	2.21 ± 0.02*#	2.10 ± 0.02*#^
Arginase activity, µmol/min per g of protein		2.21 ± 0.03	2.87 ± 0.02*	0.77 ± 0.02*#	1.69 ± 0.03*#^
Nitrate reductase activity, µmol/min per g of protein		5.27 ± 0.28	6.74 ± 0.67*	5.18 ± 0.17#	9.89 ± 0.33*#^
Nitrite reductase activity, µmol/min per g of protein		4.24 ± 0.18	10.85 ± 0.35*	13.47 ± 0.54*#	10.57 ± 0.10*^
Nitrite concentration, nmol/l		7.85 ± 0.12	3.14 ± 0.27*	11.10 ± 0.23*#	4.81 ± 0.18*#^
ONOO ⁻ concentration, µmol/g		0.50 ± 0.03	2.10 ± 0.05*	0.53 ± 0.02#	2.49 ± 0.03*#^
Concentration of nitrosothiols, µmol/g		0.73 ± 0.03	0.57 ± 0.03*	1.15 ± 0.03*#	0.33 ± 0.03*#^
Concentration of H ₂ S, µmol/g		10.34 ± 0.21	12.05 ± 0.37*	5.23 ± 0.37*#	7.49 ± 0.18*#^

*: significant difference compared to control group ($p < 0.05$); #: significant difference compared to experimental metabolic syndrome group ($p < 0.05$); ^: significant difference compared to the group of the organism stimulation by bacterial lipopolysaccharide ($p < 0.05$).

10 % tissue homogenate in incubation medium (2.3 ml) consisting of: 1 ml of 87 mM phosphate buffer (pH = 7.0), 1 ml of 4.35 mM sodium nitrate, and 0.1 ml of 61 µM NADH [12,13].

Concentration of peroxyntrites of alkali (Na⁺, K⁺) and alkali-earth (Ca²⁺) metals was measured by using its reaction with potassium iodide under pH = 7.0 in 0.2 M phosphate buffer with the same pH [13]. Concentration of low molecular weight S-nitrosothiols (S-NO) was determined by increase in nitrite concentration after 30 min incubation of 0.2 ml of 10 % tissue homogenate in incubation solution (2.6 ml) containing: 2.0 ml of 154 mM phosphate buffer (pH = 7.0), 0.1 ml of 923 µM sodium fluoride, and 854 µM mercury chloride [13].

Concentration of H₂S was estimated by amount of a color dye formed in reaction of H₂S with specific sulfide coloring reagent (0.4 g of N,N-dimethyl-p-phenylenediamin and 0.6 g of iron (III) chloride (FeCl₃·6H₂O) dissolved in 100 ml of 6 M HCl) [14].

The statistical significance of the difference between groups was determined using the non-parametric analysis of variance by Kruskal–Wallis method, followed by pairwise comparisons using the Mann–Whitney U-test. The difference was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

We established in our previous work, that addition of 20 % fructose solution as the only source of drinking water to standard ration of rats leads to development of features characteristic to metabolic syndrome [13].

Modeling of MetS led to increase in total NOS activity by 46.91 % compared to control group (Table 1). Activity of cNOS decreased by 11.32 % compared to control group. Activity of iNOS increased by 48.04 %. Arginase activity elevated by 29.86 %. NaR activity and NiR activity were increased by 27.89 % and by 155.90 %, respectively. MetS led to decrease in nitrite and

nitrosothiols concentration by 60.00 % and by 21.92 %, respectively. Under MetS conditions concentration of ONOO⁻ elevated by 320.0 % compared to control group. Concentration of H₂S increased by 16.54 %. Therefore, MetS leads to overproduction of NO by NOS-dependent mechanism (due to increased iNOS activity) and by nitrate-nitrite-NO pathway. Simultaneously MetS elevates intensity of highly toxic reactive nitrogen species (peroxyntrites) formation, while decreasing formation of excretory (nitrites) and deposited (nitrosothiols) forms of NO in rat heart.

Stimulation of organism with LPS led to increase in total NOS activity by 41.98 % compared to control group (Table 1). Activity of cNOS increased by 75.47 % compared to control group. Activity of iNOS increased by 40.76 %. Arginase activity decreased by 65.16 %. NaR activity did not changed statistically significantly. NiR activity increased by 217.69 %. Stimulation of organism with LPS led to increase in nitrite and nitrosothiols concentration by 41.40 % and by 57.53 %, respectively. Under these conditions concentration of ONOO⁻ did not changed statistically significantly compared to control group. Concentration of H₂S decreased by 49.42 %. Therefore, stimulation of organism with LPS leads to overproduction of NO by NOS-dependent mechanism and by nitrate-nitrite-NO pathway. However, stimulation of organism with LPS does not change the intensity of highly toxic reactive nitrogen species (peroxyntrites) formation, and increases formation of excretory (nitrites) and deposited (nitrosothiols) forms of NO in rat heart.

Comparing influence of stimulation of organism with LPS with MetS we can state that total NOS activity did not change compared to MetS group (Table 1). Activity of cNOS increased by 97.87 % compared to MetS group. Activity of iNOS decreased by 5.56 %. Arginase activity decreased by 73.17 %. NaR activity decreased by 23.15 %. NiR activity increased by 24.15 %. Stimulation of organism with LPS led to increase in nitrite and nitrosothiols concentration by 253.50 % and by 101.75 %, respectively. Under

these conditions concentration of ONOO⁻ decreased by 74.76 % compared to MetS group. Concentration of H₂S decreased by 56.60 % compared to MetS group.

Combination of MetS and stimulation of organism with LPS led to increase in total NOS activity by 32.72 % compared to control group (Table 1). Activity of cNOS did not change compared to control group. Activity of iNOS increased by 33.76 %. Arginase activity decreased by 23.53 %. NaR activity and NiR activity were increased by 86.67 % and by 149.29 %, respectively. Combination of MetS and stimulation of organism with LPS led to decrease in nitrite and nitrosothiols concentration by 38.73 % and by 54.79 %, respectively. Under these conditions concentration of ONOO⁻ elevated by 398.0% compared to control group. Concentration of H₂S decreased by 27.56 %.

Comparing combined influence of stimulation of organism with LPS and MetS with results in MetS group we can state that total NOS activity decreased by 9.66 % compared to MetS group (Table 1). Activity of cNOS decreased by 12.77 % compared to MetS group. Activity of iNOS decreased by 10.26 %. Arginase activity decreased by 41.11 %. NaR activity increased by 46.74 %. NiR activity did not change. Combined influence of stimulation of organism with LPS and MetS led to increase in nitrite concentration by 53.18 %, but decreased nitrosothiols concentration by 42.11 %. Under these conditions concentration of ONOO⁻ increased by 18.57 % compared to MetS group. Concentration of H₂S decreased by 37.84 % compared to MetS group.

Comparing combined influence of stimulation of organism with LPS and MetS with results in LPS stimulation group we can state, that total NOS activity decreased by 6.52 % compared to LPS stimulation group (Table 1). Activity of cNOS decreased by 43.01 % compared to LPS stimulation group. Activity of iNOS decreased by 4.98 %. Arginase activity increased by 119.48 %. NaR activity increased by 90.93 %. NiR activity decreased by 21.53 %. Combined influence of stimulation of organism with LPS and MetS led to decrease in nitrite and nitrosothiols concentration by 56.67 % and 71.30 %, respectively. Under these conditions concentration of ONOO⁻ increased by 369.81 % compared to LPS stimulation group. Concentration of H₂S increased by 43.21 % compared to LPS stimulation group.

Discussion

MetS and stimulation of organism with bacterial LPS have opposite effects on activity of cNOS. During combination of MetS and stimulation of organism with bacterial LPS inhibitory effect of MetS is dominant. Inhibitory effect of MetS on endothelial NOS (eNOS) activity is one of characteristic features of MetS and diabetes mellitus, and this is the cause of endothelial dysfunction development during MetS [15]. Several mechanisms are involved in decrease in eNOS activity during MetS. On the one hand, we observed increase in arginase activity in MetS group, which creates possibility for involvement of "arginine steal" mechanism [16]. On the other hand, increased concentration of peroxynitrite can also lead to eNOS inhibition [17]. Besides inhibition of eNOS activity peroxynitrite can cause eNOS uncoupling, which will lead to formation of reactive oxygen species (ROS) derived from eNOS electron transport chain [18]. We established that

stimulation of organism with LPS increased cNOS activity in rat heart, which is different from effect of LPS on skeletal muscle [13]. Several studies show, that during LPS-induced changes in organism transcription of eNOS and neuronal NOS (nNOS) genes are decreased [19,20]. However, there is an opinion, that this effect may depend of dosage of LPS and targeted organ, as it was shown in a study of Z. Peng et al. has showed, that LPS treatment can increase eNOS expression [21].

Opposite effects of MetS and stimulation of organism with bacterial LPS on arginase activity may be due to changes in macrophage polarization caused by LPS [22]. Therefore, predominance of pro-inflammatory macrophages in LPS stimulation group may explain decrease in arginase activity observed in this group. Despite the ability of MetS to induce change in macrophage polarization towards pro-inflammatory phenotype, these metabolically activated macrophages have different energy metabolism, which enables foam cell formation and increased arginase activity in tissue or organ [23]. The exact mechanism involved in obesity-induced arginase upregulation remains unclear but may be related to impaired secretion of adipokines [24].

MetS and stimulation of organism with bacterial LPS have a potential for induction of nitrate-nitrite-NO pathway of nitric oxide production. Reduction of nitrates to nitrites and nitrites to nitric oxide both require one electron. This process can be enzymatically controlled or non-enzymatically controlled. An example of non-enzymatically controlled reduction of nitrates to nitrites is donation of one electron derived from mitochondrial complexes [25]. A potential core enzyme responsible for enzymatically controlled reduction of nitrates to nitrites and further to nitrites to nitric oxide is xanthine oxidoreductase (EC 1.1.1.204 and EC 1.17.3.2, XOR), which consists from two main domains: xanthine oxidase (EC 1.17.3.2, XO) and xanthine dehydrogenase (EC 1.1.1.204, XD). XOR is upregulated under conditions of MetS, which explains an increase in NaR and NiR activities observed in MetS group in our experiment [26]. During LPS stimulation XOR can also be upregulated due to transition of macrophages polarization towards predominance of pro-inflammatory phenotypes [27]. And increase in NiR activity observed in LPS stimulation group may be related to adaptive reaction aimed at stabilization of mitochondrial function [28].

Another important substance which controls mitochondrial function and NO synthesis is hydrogen sulfide (H₂S) [29]. H₂S can control mitochondrial functions via interaction with NO and reactive oxygen species as well as by influencing activation of redox-sensitive transcriptional factors like NF-κB, which play crucial role in development of hyperproduction of NO during various pathological conditions [30,31,32]. Hydrogen sulfide can attenuate NF-κB activation both during MetS and stimulation of organism with bacterial LPS [33,34]. This, in turn, can decrease nitric oxide and ROS production [35,36]. Therefore, we can assume, that increase in H₂S concentration during MetS observed in our study is beneficial event aimed at controlling of NF-κB activation, while decrease in its concentration during stimulation of organism with LPS evidences about inability of this mechanism to compensate excessive stimulation of NF-κB activation.

Conclusions

1. Metabolic syndrome increases production of NO in rat heart by NO-synthase-dependent and nitrate-nitrite-NO pathways resulting in excessive peroxynitrite formation.

2. Stimulation of organism with bacterial lipopolysaccharide increases production of NO in rat heart by NO-synthase-dependent and nitrate-nitrite-NO pathways resulting in accumulation of nitrites and nitrosothiols, while omitting excessive peroxynitrite formation.

3. Combination of metabolic syndrome and stimulation of organism with bacterial lipopolysaccharide leads to prevalence of peroxynitrite formation during increased nitric oxide production NO-synthase-dependent and nitrate-nitrite-NO pathways in rat heart.

Prospects for future scientific research: a viable approach to further investigation of metabolic syndrome pathogenesis is to study influence of specific inhibitors of NF- κ B cascade activation on production and metabolism of nitric oxide, development of oxidative stress and degradation of connective tissue components not only in heart, but in other organs and tissues. It is of interest to further investigate the influence of changes in hydrogen sulfide concentration on nitric oxide cycle in heart.

Information about authors:

Akimov O. Ye., MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, Poltava State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-4958-3695](https://orcid.org/0000-0002-4958-3695)

Mykytenko A. O., MD, PhD, Associate Professor, Department of Biological and Bioorganic Chemistry, Poltava State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-4205-2699](https://orcid.org/0000-0002-4205-2699)

Kostenko V. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathophysiology, Poltava State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-3965-1826](https://orcid.org/0000-0002-3965-1826)

Відомості про авторів:

Акімов О. Є., д-р філософії за спеціальністю 222 «Медицина», доцент каф. патофізіології, Полтавський державний медичний університет, Україна.

Микитенко А. О., канд. мед. наук, доцент каф. біологічної та біоорганічної хімії, Полтавський державний медичний університет, Україна.

Костенко В. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патофізіології, Полтавський державний медичний університет, Україна.

References

- Infante T, Costa D, Napoli C. Novel Insights Regarding Nitric Oxide and Cardiovascular Diseases. *Angiology*. 2021;72(5):411-25. doi: [10.1177/0003319720979243](https://doi.org/10.1177/0003319720979243)
- Hancock JT, Veal D. Nitric oxide, other reactive signalling compounds, redox, and reductive stress. *J Exp Bot*. 2021;72(3):819-29. doi: [10.1093/jxb/eraa331](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa331)
- Kemp-Harper BK, Velagic A, Paolucci N, Horowitz JD, Ritchie RH. Cardiovascular Therapeutic Potential of the Redox Siblings, Nitric Oxide (NO \cdot) and Nitroxyl (HNO), in the Setting of Reactive Oxygen Species Dysregulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2021;264:311-37. doi: [10.1007/164_2020_389](https://doi.org/10.1007/164_2020_389)
- Yassaghi Y, Jeddı S, Yousefzadeh N, Kashfi K, Ghasemi A. Long-term inorganic nitrate administration protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *BMC Cardiovasc Disord*. 2023;23(1):411. doi: [10.1186/s12872-023-03425-2](https://doi.org/10.1186/s12872-023-03425-2)
- Ferguson SK, Woessner MN, Holmes MJ, Belbis MD, Carlström M, Weitzberg E, et al. Effects of inorganic nitrate supplementation on cardiovascular function and exercise tolerance in heart failure. *J Appl Physiol* (1985). 2021;130(4):914-22. doi: [10.1152/jappphysiol.00780.2020](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00780.2020)
- Satoh T, Wang L, Espinosa-Diez C, Wang B, Hahn SA, Noda K, et al. Metabolic Syndrome Mediates ROS-miR-193b-NFYA-Dependent Downregulation of Soluble Guanylate Cyclase and Contributes to Exercise-Induced Pulmonary Hypertension in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2021;144(8):615-37. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053889](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053889)
- Carlström M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(9):575-90. doi: [10.1038/s41581-021-00429-z](https://doi.org/10.1038/s41581-021-00429-z)
- Koka S, Xi L, Kukreja RC. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 with tadalafil affords cardioprotection in a mouse model of metabolic syndrome: role of nitric oxide. *Mol Cell Biochem*. 2020;468(1-2):47-58. doi: [10.1007/s11010-020-03710-0](https://doi.org/10.1007/s11010-020-03710-0)
- Lin Y, Xu Y, Zhang Z. Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction (SIMD): the Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Strategies Targeting Mitochondria. *Inflammation*. 2020;43(4):1184-200. doi: [10.1007/s10753-020-01233-w](https://doi.org/10.1007/s10753-020-01233-w)
- Wu TD, Fawzy A, Brigham E, McCormack MC, Rosas I, Villareal DT, et al. Association of Triglyceride-Glucose Index and Lung Health: A Population-Based Study. *Chest*. 2021;160(3):1026-34. doi: [10.1016/j.chest.2021.03.056](https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.03.056)
- Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int*. 2014;2014:263897. doi: [10.1155/2014/263897](https://doi.org/10.1155/2014/263897)
- Yelins'ka AM, Akimov OYe, Kostenko VO. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *Ukr Biochem J*. 2019;91(1):80-5. doi: [10.15407/ubj91.01.080](https://doi.org/10.15407/ubj91.01.080)
- Akimov OYe, Mykytenko AO, Kostenko VO. Nitric oxide cycle activity in rat biceps femoris muscle under conditions of bacterial lipopolysaccharide influence, experimental metabolic syndrome and their combination. *Ukr Biochem J*. 2023;95(4):24-34. doi: [10.15407/ubj95.04.024](https://doi.org/10.15407/ubj95.04.024)
- Mykytenko AO, Akimov OY, Neporada KS. Influence of lipopolysaccharide on the development of oxidative-nitrosative stress in the liver of rats under conditions of chronic alcohol intoxication. *Fiziol Zh*. 2022;68(2):29-35. doi: [10.15407/fz68.02.029](https://doi.org/10.15407/fz68.02.029)
- Şaman E, Cebova M, Barta A, Koneracka M, Zavisova V, Eckstein-Andicsova A, et al. Combined Therapy with Simvastatin- and Coenzyme-Q10-Loaded Nanoparticles Upregulates the Akt-eNOS Pathway in Experimental Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):276. doi: [10.3390/ijms24010276](https://doi.org/10.3390/ijms24010276)
- Mahdi A, Kövamees O, Pernow J. Improvement in endothelial function in cardiovascular disease – Is arginase the target? *Int J Cardiol*. 2020;301:207-14. doi: [10.1016/j.ijcard.2019.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.11.004)
- Mahdi A, Tengbom J, Alvarsson M, Wernly B, Zhou Z, Pernow J. Red Blood Cell Peroxynitrite Causes Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus via Arginase. *Cells*. 2020;9(7):1712. doi: [10.3390/cells9071712](https://doi.org/10.3390/cells9071712)
- Pérez-Torres I, Manzano-Pech L, Rubio-Ruiz ME, Soto ME, Guamer-Lans V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. *Molecules*. 2020;25(11):2555. doi: [10.3390/molecules25112555](https://doi.org/10.3390/molecules25112555)
- Yang Z, Su W, Zhang Y, Zhou L, Xia ZY, Lei S. Selective inhibition of PKC β 2 improves Caveolin-3/eNOS signaling and attenuates lipopolysaccharide-induced injury by inhibiting autophagy in H9C2 cardiomyocytes. *J Mol Histol*. 2021;52(4):705-15. doi: [10.1007/s10735-021-09990-0](https://doi.org/10.1007/s10735-021-09990-0)
- Luo R, Chen X, Ma H, Yao C, Liu M, Tao J, et al. Myocardial caspase-3 and NF- κ B activation promotes calpain-induced septal apoptosis: The role of Akt/eNOS/NO pathway. *Life Sci*. 2019;222:195-202. doi: [10.1016/j.lfs.2019.02.048](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.048)
- Peng Z, Zhang M, Ouyang M, Ouyang X, Xu G, Zhou J, et al. Protective effects of myocardium-targeted nanoparticles loaded L-arginine on sepsis-induced myocardial injury. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2020;32(8):953-9. doi: [10.3760/cma.j.cn121430-20200217-00168](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121430-20200217-00168)
- Liu L, Guo H, Song A, Huang J, Zhang Y, Jin S, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B and MAPK pathways. *BMC Immunol*. 2020;21(1):32. doi: [10.1186/s12865-020-00355-y](https://doi.org/10.1186/s12865-020-00355-y)

23. Russo S, Kwiatkowski M, Govorukhina N, Bischoff R, Melgert BN. Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. *Front Immunol.* 2021;12:746151. doi: [10.3389/fimmu.2021.746151](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.746151)
24. Atawia RT, Bunch KL, Toque HA, Caldwell RB, Caldwell RW. Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2019;24(5):890-934. doi: [10.2741/4758](https://doi.org/10.2741/4758)
25. Schiffer TA, Lundberg JO, Weitzberg E, Carlström M. Modulation of mitochondria and NADPH oxidase function by the nitrate-nitrite-NO pathway in metabolic disease with focus on type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(8):165811. doi: [10.1016/j.bbadis.2020.165811](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165811)
26. Fujishima Y, Kita S, Nishizawa H, Maeda N, Shimomura I. Cardiovascular significance of adipose-derived adiponectin and liver-derived xanthine oxidoreductase in metabolic syndrome. *Endocr J.* 2023;70(7):663-75. doi: [10.1507/endocrj.EJ23-0160](https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ23-0160)
27. Li H, Zhang C, Zhang H, Li H. Xanthine oxidoreductase promotes the progression of colitis-associated colorectal cancer by causing DNA damage and mediating macrophage M1 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2021;906:174270. doi: [10.1016/j.ejphar.2021.174270](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174270)
28. Yang Y, Li S, Qu Y, Wang X, An W, Li Z, et al. Nitrate partially inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by maintaining mitochondrial function. *J Int Med Res.* 2020;48(2):300060520902605. doi: [10.1177/0300060520902605](https://doi.org/10.1177/0300060520902605)
29. Mykytenko A, Akimov O, Shevchenko O, Neporada K. Role of sulfide anion in the development of chronic alcoholic hepatitis under the conditions of modulation of adenosine monophosphate kinase – a correlational study. *Eur J Clin Exp Med.* 2023;21(3):567-75. doi: [10.15584/ejcem.2023.3.24](https://doi.org/10.15584/ejcem.2023.3.24)
30. Magierowska K, Korbut E, Wójcik-Grzybek D, Bakalarz D, Sliwowski Z, Cieszkowski J, et al. Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donors versus acute oxidative gastric mucosal injury. *J Control Release.* 2022;348:321-34. doi: [10.1016/j.jconrel.2022.05.051](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.051)
31. Mykytenko AO, Akimov OYe, Yeroshenko GA, Neporada KS. Influence of NF- κ B on the development of oxidative-nitrosative stress in the liver of rats under conditions of chronic alcohol intoxication. *Ukr Biochem J.* 2022;94(6):57-66. doi: [10.15407/ubj94.06.057](https://doi.org/10.15407/ubj94.06.057)
32. Akimov OY, Kostenko VO. Role of NF- κ B transcriptional factor activation during chronic fluoride intoxication in development of oxidative-nitrosative stress in rat's gastric mucosa. *J Trace Elem Med Biol.* 2020;61:126535. doi: [10.1016/j.jtemb.2020.126535](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126535)
33. Wang L, Meng J, Wang C, Wang Y, Yang C, Li Y. Hydrogen sulfide attenuates cigarette smoke-induced pyroptosis through the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2022;49(5):56. doi: [10.3892/ijmm.2022.5112](https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5112)
34. Zhao M, Cheng Y, Wang X, Cui X, Cheng X, Fu Q, et al. Hydrogen Sulfide Attenuates High-Fat Diet-Induced Obesity: Involvement of mTOR/IKK/NF- κ B Signaling Pathway. *Mol Neurobiol.* 2022;59(11):6903-17. doi: [10.1007/s12035-022-03004-0](https://doi.org/10.1007/s12035-022-03004-0)
35. Skrypnyk I, Maslova G, Lymanets T, Gusachenko I. L-arginine is an effective medication for prevention of endothelial dysfunction, a predictor of anthracycline cardiotoxicity in patients with acute leukemia. *Exp Oncol.* 2017;39(4):308-11.
36. Kostenko V, Akimov O, Gutnik O, Kostenko H, Kostenko V, Romantseva T, et al. Modulation of redox-sensitive transcription factors with polyphenols as pathogenetically grounded approach in therapy of systemic inflammatory response. *Heliyon.* 2023;9(5):e15551. doi: [10.1016/j.heliyon.2023.e15551](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15551)

Contemporary comprehensive approaches to assessing the effectiveness of experimental model of neurodegenerative disorders with cognitive status changes

M. V. Danukalo¹, Yu. M. Kolesnyk¹, O. V. Hancheva¹

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

neurodegenerative diseases, axonal transport, cognitive functions, open field, radial maze, rats.

Ключові слова:

нейродегенерація, аксональний транспорт, когнітивні функції, відкрите поле, радіальний лабіринт, щури.

Надійшла до редакції /
Received: 04.10.2023

Після доопрацювання /
Revised: 08.11.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 15.11.2023

Конфлікт інтересів:

відсутній.

Conflicts of interest:

authors have no conflict of interest to declare.

*E-mail:

gancheva_olga@i.ua

Aim of the study was to characterize the locomotor and cognitive aspects of the behavior of experimental rats under intracerebroventricular colchicine administration in the open field test and the 8-arm radial maze, as well as to identify a set of behavioral features of experimental animals that emerged during the study.

Materials and methods. The study was conducted in two stages on 20 male Wistar rats aged 10–11 months. The first stage involved assessment of initial locomotor activity and cognitive functions in all intact rats. At the next stage, the rats were divided into two experimental groups (n = 10): the first group with intracerebroventricular injection of physiological NaCl solution, and the second group with intracerebroventricular injection of colchicine. In 14 days after the surgery, repeated recording of locomotive and cognitive activity indicators was performed.

Results. The locomotor activity characteristics did not statistically differ between the animals before the surgical procedures and the rats of the first group. However, in the second group, the activity indicators were significantly higher than in the respective pre-surgery rats. In the intergroup comparison of the rats that entered the second stage of the experiment, it was found that among all the investigated parameters, only the indicator of high activity duration was significantly higher in the second group compared to the first group. At the same time, the animals in the second group showed significant cognitive impairments compared to the first group, as indicated by significantly lower memory index values, the number of correct entries into the maze arms, and a significantly longer time to make the first correct entry into the maze arm.

Conclusions. Intracerebroventricular administration of colchicine to experimental rats is accompanied by increased locomotor activity and impairment of cognitive functions. The administration of a physiological solution is not accompanied by a statistically significant increase in locomotor activity, but it demonstrates a clear tendency to increase, which may indicate a certain influence of the procedure itself. The applied pharmacological model of neurodegeneration with subsequent comprehensive assessment of animal behavior in an open field and an 8-arm radial maze is legitimate and can be used to study the early development of neuroinflammation, neuroapoptosis, and synaptogenesis disorders in the experiment.

Modern medical technology. 2023;(4):51-58

Сучасні комплексні підходи до оцінювання ефективності експериментальної моделі нейродегенеративних порушень зі змінами когнітивного статусу

М. В. Данукало, Ю. М. Колесник, О. В. Ганчева

Мета роботи – охарактеризувати локомоторні та когнітивні аспекти поведінки експериментальних щурів на тлі інтрацеребровентрикулярного введення колхіцину у тесті «відкрите поле» та восьмирукавному лабіринті, а також визначити їхні поведінкові особливості, що виникли під час дослідження.

Матеріали та методи. На 20 щурах самцях лінії Wistar віком 10–11 місяців у 2 етапи дослідили локомоторну активність у тесті «відкрите поле» та когнітивні функції у восьмирукавному радіальному лабіринті. На першому етапі в усіх інтактних щурів зафіксували вихідні показники. На наступному етапі щурів поділили на 2 експериментальні групи: перша – з інтрацеребровентрикулярним введенням фізіологічного розчину NaCl (n = 10); друга – з інтрацеребровентрикулярним введенням колхіцину (n = 10). Через 14 днів після оперативного втручання повторно фіксували показники локомоторної та когнітивної активностей.

Результати. Характеристики локомоторної активності статистично не відрізнялися у тварин до оперативного втручання та щурів першої групи. Натомість у тварин другої групи показники активності вірогідно перевищували відповідні параметри щурів до оперативного втручання. При міжгруповому порівнянні щурів, що залучені до другого етапу експерименту, встановили: з-поміж усіх параметрів, що вивчали, у тварин другої групи вірогідно більшим був лише показник часу високої активності порівняно зі щурами першої групи. Разом із тим, у тварин другої групи виявили значні когнітивні порушення порівняно з тваринами

першої групи. Про це свідчили вірогідно нижчі показники індексу пам'яті та кількості правильних входів до рукавів лабіринту, а також вірогідно більший час затримки першого правильного входу в рукав лабіринту.

Висновки. Інтрацеребровентрикулярне введення колхіцину експериментальним щурам супроводжується підвищенням локомоторної активності та погіршенням когнітивних функцій. Введення фізіологічного розчину не супроводжується статистично значущим підвищенням показників локомоторної активності, проте демонструє чітку тенденцію до їх зростання; це може свідчити про певний вплив власне процедури. Застосована фармакологічна модель нейродегенерації з наступним комплексним оцінюванням поведінки тварини у відкритому полі та восьмирукавному лабіринті є придатною, може бути використана під час дослідження раннього розвитку процесів нейрозапалення, нейроапоптозу, порушень синаптогенезу в експерименті.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 51-58

Intracerebroventricular (ICV) administration of colchicine, particularly into the lateral ventricles of the brain, is currently considered as one of the methods for modeling neurodegeneration in laboratory animals [1]. According to research, the primary mechanisms leading to neuronal death involve irreversible axonal transport blockade, accompanied by neuroinflammation, mitochondrial dysfunction in neurons, impaired synaptogenesis, and glial activation [2,3]. Additionally, it has been demonstrated that the neurotoxic effect of colchicine is also realized through alterations in the expression levels of neuropeptide genes in the brains of rats [4].

It should be noted that in experiments, selective sensitivity of neurons of various brain structures to colchicine introduced into the lateral ventricles has been repeatedly demonstrated. Notably, one of the most sensitive groups of neurons to colchicine toxic effect are the cholinergic neurons in the basal brain region [5,6]. The latter play a crucial role in the formation of higher cognitive functions, and their impairment is characteristic of the early stages of Alzheimer's disease [7]. It is essential to emphasize that under the mentioned method of neurotoxin administration, there was a predominance of neurodegeneration in specific brain regions, including the hippocampus, frontal cortex, amygdala, and striatum. These structures are pivotal for cognitive function too [1]. These findings have led researchers to consider ICV colchicine administration as one of the ways to model sporadic dementia of Alzheimer's type in animals [8,9].

The mentioned method of pharmacologically induced neurodegeneration potentially offers several advantages over a large number of corresponding genetically determined animal models. Primarily, this is because in the latter case, it's challenging to track the initial stages of the disease and control the extent of neuronal damage. In contrast, pharmacologically induced neurodegenerative conditions allow for this, as there is a "starting point" (the time of neurotoxin administration) and a dose-dependent effect of colchicine-induced damage [8]. This is important since neurodestruction in several brain structures, including cholinergic ones, is observed in the preclinical stages of various age-related neurodegenerative diseases and leads to progressive afferent cortical cholinergic denervation [10,11,12]. In such cases, there is an opportunity for in-depth study of key neurochemical aspects of neurodegeneration precisely in the preclinical stage.

Cognitive testing in mazes is essential for verifying the development of cognitive deficits in experiments. There are currently a wide variety of maze designs and research methodologies available [13,14]. However, the diversity of these mazes requires

the researcher to have a clear understanding of which specific cognitive process can be investigated in each particular maze and which indicators will most accurately characterize it [14].

It is worth noting that different approaches to modeling cognitive impairments in experimental animals will lead to unique patterns and relationships of changes in the described characteristics. Therefore, based on all the above, it is logical to assume that in experimental animals exposed to ICV colchicine administration, due to the nature of the neurotoxin's impact and the emergence of "specificity in behavioral changes", conducting maze experiments requires a distinct approach and necessitates the verification of cognitive impairments in each specific case.

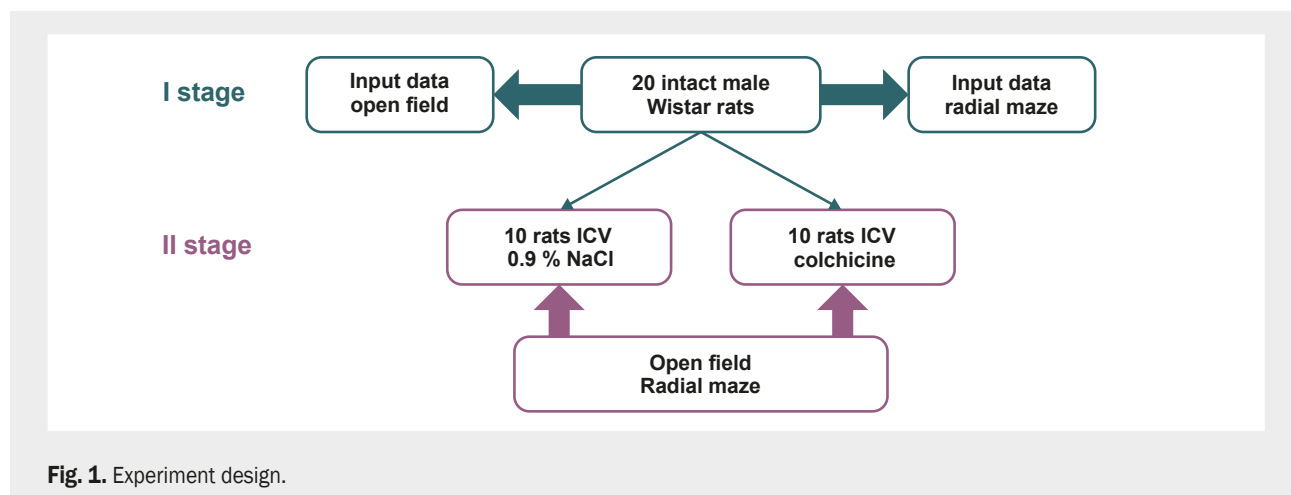
Aim

Therefore, the aim of this study was to characterize the locomotor and cognitive aspects of the behavior of experimental rats under intracerebroventricular colchicine administration in the open field test and the 8-arm radial maze, as well as identify a set of behavioral features of experimental animals that emerged during the study.

Materials and methods

The experiment involved 20 male Wistar rats, aged 10–11 months, with a weight range of 250–350 grams. All rats were housed under standard vivarium conditions at the Training medical and laboratory center of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University. The research received approval from Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University Bioethics Committee and was conducted in strict accordance with the national "General Ethical Principles for Conducting Experiments on Animals" (Ukraine, 2001), which align with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council dated September 22, 2010, titled "On the protection of animals used for scientific purposes".

In the first stage of the research, baseline measurements of locomotor activity and cognitive status were recorded in all intact rats using an integrated system that allowed for testing in the open field and an 8-arm radial maze (LE760, PanLab Harvard Apparatus, Spain). The system was equipped with a SONY camera (Japan) and video analysis software Smart v. 3.0 (PanLab Harvard Apparatus, Spain, s/n DD347-0E6) [15]. The tests were conducted according to the methodologies described below.

**Table 1.** Characteristics of the parameters studied in the open field test

Parameter, units of measurement	Description	Value
Duration of high, low activity, and immobility of the animal in the zone, s	Time, that animal spent at a specific level of activity in the zone of interest.	Quantitative determination of the animal's activity and its movement pattern in the open field
Distance in the zone, cm	Distance traveled by the subject in the designated zone	Quantitative assessment of animals' locomotor activity
Mean speed in zone, cm/s	Average speed of the subject in the zone of interest	Quantitative assessment of animals' locomotor activity and its movement pattern
The number of entries into the respective zone of the open field	The number of entries by subjects into the designated zones associated with the experiment. Calculated for each zone defined by the user as "zone of interest"	Assessment of the locomotor activity of the animal; Assessment of preference for a specific zone, which can be used to evaluate anxiety and exploratory activity

During the next stage, the intact rats were divided into two experimental groups, with 10 rats in each group. The first group, under "Telazol" anesthesia (0.1 ml per 100 grams of body weight), received ICV injections of a physiological saline solution (37 °C). This group served as the control group. The second group, under the same anesthesia, also received ICV injections, but in this case, it was a solution of colchicine (37 °C) (Fig. 1).

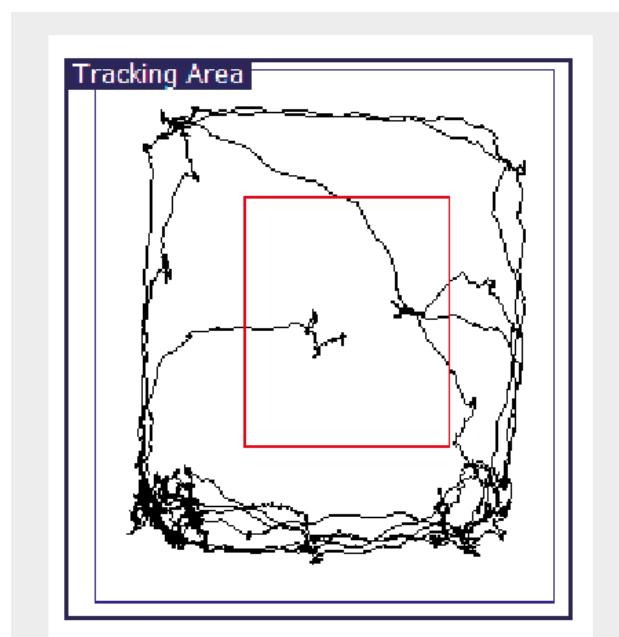
The methodology of open field test. The following parameters of animals' locomotor activity were calculated both in the center and in the peripheral zone using this test (Table 1) [16].

The calculation of the animal's activity level was performed automatically by the program based on the parameters set by the developers.

The test was conducted in an open box made of polyvinyl chloride with dimensions (width × length × height) of 80 × 80 × 20 cm. The box was positioned at a height of 1 m above the floor.

The experimental animal was placed in the center of the box, and its movements in the open field were recorded by video for 5 minutes. After each animal, the field was cleaned of feces and disinfected with a 70 % ethanol solution, and only after it had completely dried next animal placed in the field.

The subsequent stage of the research involved digital video processing in Smart v. 3.0. To accomplish this, observation zones were first delineated: the central field (highlighted in red) and the periphery (the area between the red and blue squares) (Fig. 2).

**Fig. 2.** Rat's tracking at the initial stage of the experiment and analysis zones in the open field test using Smart v. 3.0. The central field is highlighted in red, and the analysis boundaries are marked in blue. The area between the red and blue delineations represents the periphery.

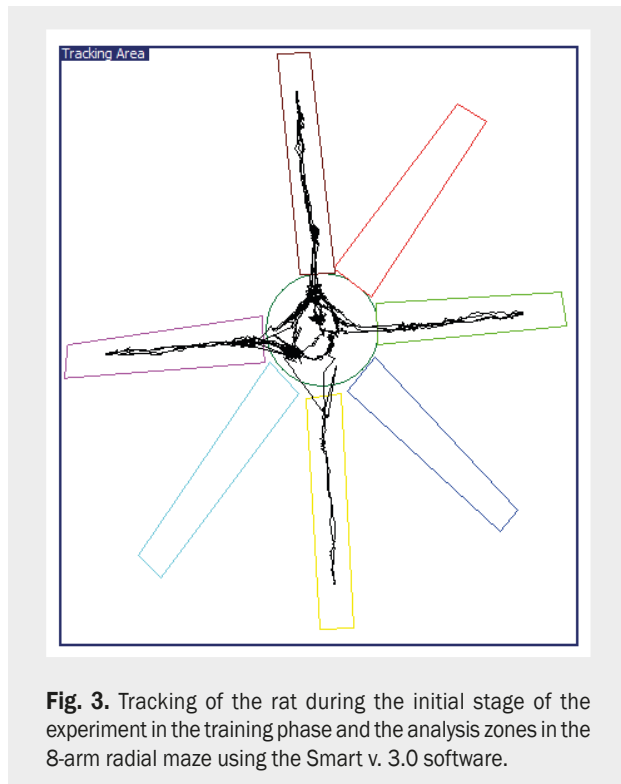


Fig. 3. Tracking of the rat during the initial stage of the experiment in the training phase and the analysis zones in the 8-arm radial maze using the Smart v. 3.0 software.

The methodology for conducting research in the 8-arm radial maze involved the Delayed Spatial Win-Shift test as a basis for assessing the cognitive status of rats. This test allows assessment of both short-term working spatial memory and long-term memory, the deficits of which were observed in the context of ICV colchicine administration by other researchers [17]. A distinctive feature of this test is the analysis of the subtest animals' ability to retain spatial information and reproduce it both during the test and after a delay period. Thus, the procedure conducted in this experiment comprised three stages: training, delay, and testing, each lasting 5 minutes.

It should be noted that before the test, the rat was adapted to the conditions of the radial maze (5 days) in compliance with several conditions, namely:

- the experiment was conducted at the same time of day to maintain stable natural lighting conditions without additional sources of light;
- access to food was restricted by 80 % during the experiment;
- the maze was cleaned with 70 % ethanol and dry wipes after each rat.

In order to form the animal's adaptation to the maze, a food reward was placed at the end of each arm. The rat was placed in the center of the maze and had the opportunity to freely explore all its arms for 10 minutes.

After the adaptation, we started the experimental phase. It began with a training stage, which involved a 5-minute recording of the rat's behavior. During this phase, the rat was placed in the center of the maze where only 4 arms had food rewards and were open, while the other arms had no rewards, and access to them was blocked by special doors with a guillotine mechanism.

After the training, the delay phase (5 minutes) followed, when the rodent was removed from the maze and placed in its cage. The next stage was the testing phase, when the rat was placed in the center of the maze, and all 8 arms were open, but food rewards were placed in 4 different arms than in the training phase [18].

Data recording continued for four consecutive days. After this, one group of rats received an ICV injection of 3 μ l of physiological saline (NaCl) into the lateral ventricles of the brain (control group). The rats of other group were administered colchicine (15 μ g in 3 μ l of 0.9 % NaCl solution) in the same method. All procedures were conducted under sterile conditions while the rats were under "Telazol" anesthesia.

Fourteen days after the stereotaxic surgical procedure, with ICV administration of either physiological saline (1st control group) or colchicine (2nd experimental group), the entire experiment procedure in the maze was repeated. Video tracking of the animals in the maze, followed by digital video processing, was performed using the previously mentioned Smart v. 3.0 software (Fig. 3).

The following parameters were investigated during the testing phase:

- the number of correct and incorrect entries into the respective arms of the maze. Re-entering the same arm was also considered an error. Based on these data, a memory index (MI) was calculated using the following formula:

$$MI = (CE - IE) / (CE + IE) \quad (1),$$

where *CE*: the number of correct entries into the arms; *IE*: the number of incorrect entries into the arms [19];

- the time elapsed from the beginning of the phase to the first correct entry into an arm (latency time), s.

The intracerebroventricular injection procedure was carried out in the surgery room for vivarium animals at the Training medical and laboratory center of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University under sterile conditions and anesthesia using "Telazol" (containing tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride at 250 mg each in one vial) at a dose of 0.1 ml per 100 grams of the animal's body weight, administered intraperitoneally.

The ICV injections into the lateral ventricles of the rat brain were performed using a stereotaxic digital instrument World Precision Instruments (USA). The coordinates for the injections were as follows: 9.5 mm anterior to the bregma; 1.5 mm to the right of the midline and 6 mm deep.

The precise positioning of the colchicine injection site in the animal brain was performed using a stereotaxic coordinate system based on external cranial landmarks and their comparison with the images of the stereotaxic atlas of the rat brain [20].

The experimental data were processed using the Statistica software package (license number: JPZ8041382130ARCN10-J) and Microsoft Excel 7.0 (Microsoft Corp., USA). For all parameters, the following statistics were calculated: Mean (*M*), data dispersion and Standard Error of the Mean (*m*). To assess the significance of differences in the research results between the experimental and control groups of rats Student's t-test (*t*) was used for samples with normally distributed data or Mann-Whitney test (*U*) was used for samples with data that did not follow a normal distribution. A single factor analysis of variance (ANOVA) was employed to assess the memory index (MI) in the experimental

Table 2. Locomotor activity parameters in the open field test for rats in the experimental groups

Parameter, units of measurement	Before surgery, at the 1 st stage		First group with ICV administration of 0.9 % NaCl		Second group with ICV administration of colchicine	
	Center	Periphery	Center	Periphery	Center	Periphery
High activity duration, s	1.53 [0.82; 3.12]	9.96 [2.13; 26.98]	5.07 [0.44; 9.84]	34.13 [22.52; 37.21]	5.46 [2.43; 7.27]	57.42 [46.79; 63.13] ^{1,2}
Immobility duration, s	0.00 [0.00; 0.58]	180.37 [114.12; 228.96]	0.52 [0.00; 2.60]	69.96 [52.04; 109.82]	0.86 [0.00; 7.66]	64.75 [42.74; 75.66] ¹
Mean speed in zone, cm/s	10.50 [7.69; 17.00]	6.69 [5.59; 8.78]	12.99 [9.79; 16.23]	9.72 [8.61; 10.95]	10.83 [9.87; 16.23]	10.32 [9.35; 12.21] ¹

1: a significant difference ($p_U < 0.05$) was observed in the parameters of rats with ICV colchicine compared to animals before surgery;

2: a significant difference ($p_U < 0.05$) was observed in the parameters of rats with ICV colchicine compared to animals of the first group.

groups. After that, the probability of differences between the samples (p) was determined. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant, indicating that observed differences were unlikely to be random.

Results

After analyzing the results of the research on the behavior and cognitive functions of the rats, significant intergroup differences were identified both in rats' behavior in the open field test and in the cognitive status of animals following intracerebroventricular colchicine administration.

Thus, statistical analysis of the locomotor activity of experimental animals showed no significant difference between animals before surgery and rats of the first group in all the parameters studied, both in the center and on the periphery of the open field.

The studied animals demonstrated typical behavioral patterns with higher activity on the periphery of the open field, but the speed of movement per unit time prevailed in the center. In the animals of the second group, activity also prevailed in the periphery, but the speed per second in the center and periphery was almost the same (*Table 2*).

In the intergroup comparison, it was found that rats treated with colchicine injection demonstrated significant changes in the following parameters only in the periphery.

In the intergroup comparison, it was found that rats with ICV colchicine administration demonstrated significant changes in the following parameters only in the periphery of the open field:

1. High Activity duration: an increase by 576.5 % compared to the respective pre-surgical values and a 168 % increase compared to rats from the first group;

2. Immobility duration: a decrease by 35.89 % compared to the animals before the surgery but without significant changes compared to rats from the first group;

3. Mean speed: an increase of 155.3 % compared to the animals before the surgery but also without significant changes compared to rats from the first group (*Table 2*).

It should be noted that the examined parameters of rats from the second group in the center of the open field did not differ

significantly from those of animals from the other comparison groups (*Table 2*).

As for other parameters of locomotor activity (duration of low activity, distance in the zone, and the number of entries into the corresponding zone of the open field), there was no significant difference between the experimental groups of rats.

The next stage of the research was to characterize the effect of colchicine on the cognitive functions of laboratory rats in the 8-arm radial maze by determining the memory index and the delay time before entering the correct arm.

According to the obtained results, the memory index in rats that received ICV of a 0.9 % NaCl solution was significantly higher than the corresponding index in the rats of the second group (based on the results of single factor analysis of variance (ANOVA) $F_{3,35} = 30.97$, $p < 0.05$) (*Fig. 4*).

At the same time, tracking the dynamics from the 1st to the 4th day of the experiment, it should be noted that in both examined groups, there was a tendency for the memory index to increase (*Fig. 4*). The change in the memory index is directly associated with the number of correct entries, which was on average 237.5 % higher in rats from the first group than in animals from the second group ($p < 0.05$) (*Fig. 5*).

Simultaneously with the changes in the number of correct entries into the arms and the memory index, rats from the 2nd group, compared to the control group (1st group), demonstrated a 292.8 % higher latency time from the moment of placement in the maze to entering a free arm (*Fig. 6*).

Dynamic observation of this parameter revealed that from the 1st to the 2nd day of observations, there was a tendency for a decrease in the latency time in both groups. Later, in the group of animals from the 2nd group, this parameter continued to decrease, whereas in the control rats (1st group), it remained constant (*Fig. 7*).

Thus, the provided data suggest that in rats with ICV colchicine administration, the changes observed in the open field test indicate increased locomotor activity, as well as a clear tendency to similar behavior in control animals. At the same time, the studied neurotoxin, when administered intracerebroventricularly, led to significant cognitive impairments in rats compared to animals that received a 0.9 % NaCl solution.

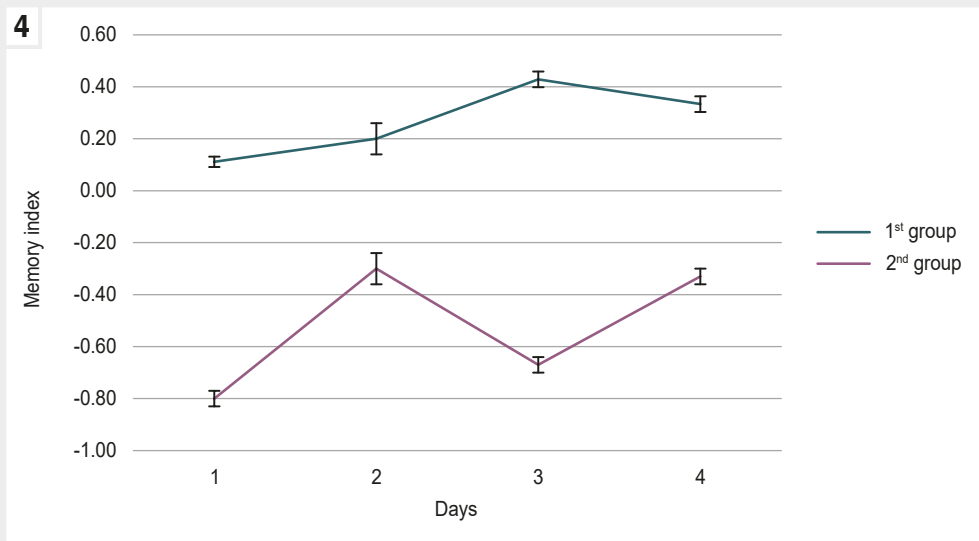


Fig. 4. Rats' memory index parameters from the first and second experimental groups.

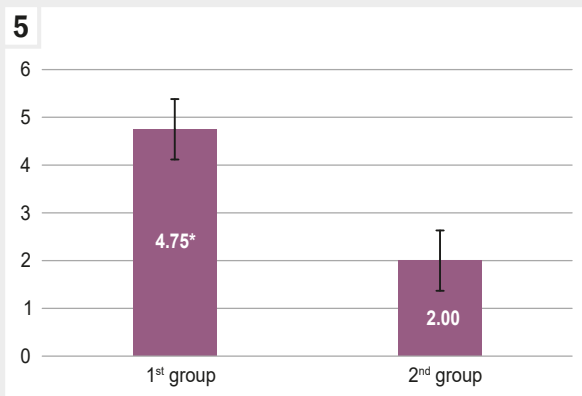


Fig. 5. The number of correct entries into the arms of the maze in rats from the 1st and 2nd groups.

*: a significant difference between the experimental groups ($p_{st} < 0.05$).

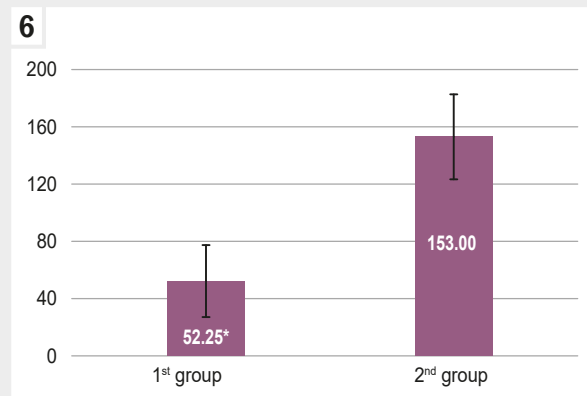


Fig. 6. Mean latency time (s) in rats from the 1st and 2nd groups.

*: a significant difference between the experimental groups ($p_{st} < 0.05$).

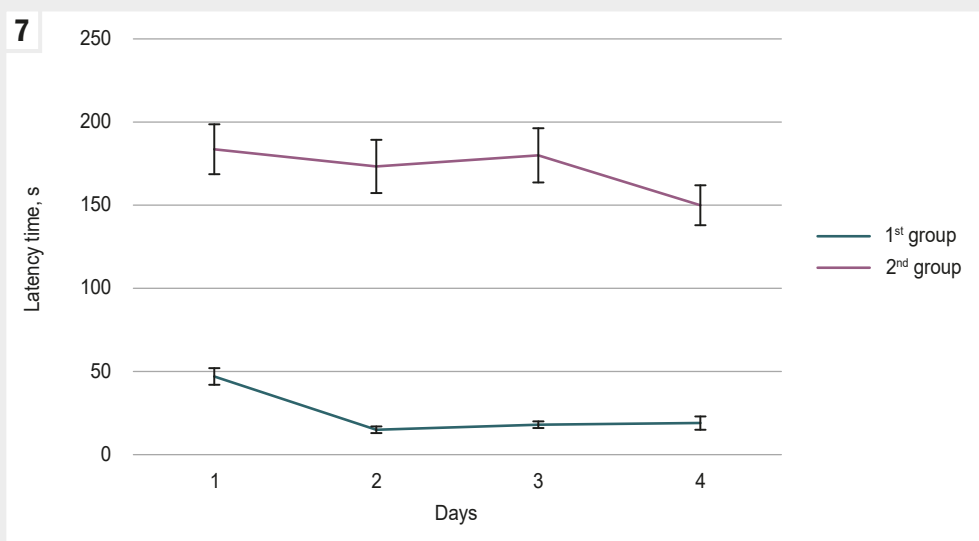


Fig. 7. Latency time parameters in rats from the 1st and 2nd groups.

Discussion

When analyzing the obtained results, it's important to consider several key components that can influence purity of the experiment. Firstly, ICV administration of colchicine is an invasive procedure, and its possible complications can potentially affect the locomotor behavior of the animals.

Additionally, the toxic effect on neurons in structures that largely contribute to the motivational component, especially appetite, in performing tasks in the radial maze may play a significant role [21].

In this regard, it's not surprising that certain contradictions can be found in the results of research by different scientists. For instance, Veerendra Kumar and colleagues claim that ICV colchicine does not lead to significant changes in the locomotor behavior of rats two to three weeks after administration [17]. In contrast, Stanley Barone Jr. and colleagues observed hyperactivity and increased aggression in animals after ICV colchicine for three weeks after injection [22]. To some extent, our results confirm these findings.

Researchers seem to draw more consistent conclusions regarding the impact of colchicine on the cognitive functions of animals. Thus, there is almost unanimous agreement that cognitive function deteriorates, that has been observed in a water maze [22], a plus-maze [17], and a radial 8-arm maze [5]. Therefore, this is consistent with the data we have obtained.

At the same time, it's difficult to ignore the clear influence of changes in locomotor activity on the results of cognitive tests in mazes. If an animal is less active, both the time-based measures (latency time to the first entry into the correct arm and the time it takes the animal to visit all correct arms) and the number of arms entered within a limited time (usually 5 minutes) will significantly differ from similar measures in hyperactive animals. In contrast, in the latter case, there is a high likelihood of the experimental rat randomly entering the correct arm.

Therefore, forming the groups of test animals for further research of cognitive status in the maze should take their activity into account. Such a comprehensive approach will allow for a more accurate analysis of colchicine-induced behavioral changes.

An essential component of testing in the radial maze is the motivation of the animal. Brenda J. Anderson and colleagues emphasized the importance of analyzing the motivational component in their research, where they restricted access to water, resulting in differing energy expenditures. This created a difference in motivation between experimental groups, making their results sensitive to group differences in this regard [23].

If we apply this to the conducted experiment, there are currently isolated studies that suggest the potential influence of colchicine on the feeding behavior of animals by damaging specific hypothalamic centers [24].

It's worth noting that the doses and method of colchicine administration in these studies differ significantly from the description provided above. Therefore, it's not possible to definitively state that intracerebroventricular administration of colchicine at a dose of 15 µg will lead to feeding behavior disturbances that affect the motivation of the animals to seek rewards in the maze.

Conclusions

1. Intracerebroventricular administration of colchicine to experimental rats is accompanied by increased locomotor activity and impairment of cognitive functions.

2. The administration of a physiological solution is not accompanied by a statistically significant increase in locomotor activity, but it demonstrates a clear tendency to increase, which may indicate a certain influence of the procedure itself.

3. The applied pharmacological model of neurodegeneration with subsequent comprehensive assessment of animal behavior in an open field and an 8-arm radial maze is legitimate and can be used to study the early development of neuroinflammation, neuroapoptosis, and synaptogenesis disorders in the experiment.

Funding

The study was a part of the research work of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University: "Dysfunction of neuro-humoral regulation in the pathogenesis of metabolic disorders and cognitive disorders in experimental pathology", state registration number No. 0123U103051 (2023–2028).

Information about the authors:

Danukalo M. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-3413-945X](https://orcid.org/0000-0003-3413-945X)

Kolesnyk Yu. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Rector of Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Honored Science and Technology Figure of Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-1556-5085](https://orcid.org/0000-0002-1556-5085)

Hancheva O. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology with the Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0001-7339-7078](https://orcid.org/0000-0001-7339-7078)

Відомості про авторів:

Данукало М. В., PhD, доцент каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Колесник Ю. М., д-р мед. наук, професор каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, ректор Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, заслужений діяч науки і техніки України.

Ганчева О. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- Sil S, Ghosh R, Sanyal M, Guha D, Ghosh T. A comparison of neurodegeneration linked with neuroinflammation in different brain areas of rats after intracerebroventricular colchicine injection. *J Immunotoxicol.* 2016;13(2):181-90. doi: [10.3109/1547691x.2015.1030804](https://doi.org/10.3109/1547691x.2015.1030804)
- Guo W, Stoklund Dittlau K, Van Den Bosch L. Axonal transport defects and neurodegeneration: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cell Amp Dev Biol.* 2020;99:133-50. doi: [10.1016/j.semcdb.2019.07.010](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.07.010)
- Sleigh JN, Rossor AM, Fellows AD, Tosolini AP, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(12):691-703. doi: [10.1038/s41582-019-0257-2](https://doi.org/10.1038/s41582-019-0257-2)

4. Dufourny L, Leroy D, Warembourg M. Differential effects of colchicine on the induction of nitric oxide synthase in neurons containing progesterone receptors of the guinea pig hypothalamus. *Brain Res Bull.* 2000;52(5):435-43. doi: [10.1016/s0361-9230\(00\)00286-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(00)00286-0)
5. Emerich DF, Walsh TJ. Cholinergic cell loss and cognitive impairments following intraventricular or intradentate injection of colchicine. *Brain Res.* 1990;517(1-2):157-67. doi: [10.1016/0006-8993\(90\)91021-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91021-8)
6. Giardino L, Giuliani A, Calzà L. Exogenous administration of L-arginine protects cholinergic neurons from colchicine neurotoxicity. *NeuroReport.* 2000;11(8):1769-72. doi: [10.1097/00001756-200006050-00034](https://doi.org/10.1097/00001756-200006050-00034)
7. Fu H, Hardy J, Duff KE. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1350-8. doi: [10.1038/s41593-018-0221-2](https://doi.org/10.1038/s41593-018-0221-2)
8. Rapaka D, Adiukwu PC, Bitra VR. Experimentally induced animal models for cognitive dysfunction and Alzheimer's disease. *MethodsX.* 2022;9:101933. doi: [10.1016/j.mex.2022.101933](https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101933)
9. Kumar A, Seghal N, Naidu PS, Padi SS, Goyal R. Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Pharmacol Rep.* 2007;59(3):274-83. https://www.researchgate.net/profile/Sreenivasulu-Pattipati-2/publication/6185623_Colchicines-induced_neurotoxicity_as_an_animal_model_of_sporadic_dementia_of_Alzheimer's_type/links/57890f4908ae254b1ddcec7c/Colchicines-induced-neurotoxicity-as-an-animal-model-of-sporadic-dementia-of-Alzheimers-type.pdf
10. Liu AK, Chang RC, Pearce RK, Gentleman SM. Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2015;129(4):527-40. doi: [10.1007/s00401-015-1392-5](https://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5)
11. Kumbhare D, Palys V, Toms J, Wickramasinghe CS, Amarasinghe K, Manic M, et al. Nucleus basalis of Meynert stimulation for dementia: Theoretical and technical considerations. *Front Neurosci.* 2018;12. doi: [10.3389/fnins.2018.00614](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00614)
12. Tiepolt S, Meyer PM, Patt M, et al. PET Imaging of Cholinergic Neurotransmission in Neurodegenerative Disorders. *J Nucl Med.* 2022;63(Suppl 1):33S-44S. doi: [10.2967/jnumed.121.263198](https://doi.org/10.2967/jnumed.121.263198)
13. Olton DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiol Amp Behav.* 1987;40(6):793-7. doi: [10.1016/0031-9384\(87\)90286-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90286-1)
14. Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cogn Brain Res.* 1996;3(3-4):167-81. doi: [10.1016/0926-6410\(96\)00004-3](https://doi.org/10.1016/0926-6410(96)00004-3)
15. Kolesnyk YM, Hancheva OV, Abramov AV, Kolesnyk MY, Ivanenko TV, Tishchenko SV, et al. [Modern approaches and new methodological possibilities in the functional state of small laboratory animals assessing]. *Patologija.* 2017;14(3):364-70. Russian. doi: [10.14739/2310-1237.2017.3.118770](https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.3.118770)
16. Guo B, Chen J, Chen Q, Ren K, Feng D, Mao H, et al. Anterior cingulate cortex dysfunction underlies social deficits in Shank3 mutant mice. *Nat Neurosci.* 2019;22(8):1223-34. doi: [10.1038/s41593-019-0445-9](https://doi.org/10.1038/s41593-019-0445-9)
17. Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Intracerebroventricular administration of colchicine produces cognitive impairment associated with oxidative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73(3):565-71. doi: [10.1016/s0091-3057\(02\)00838-9](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00838-9)
18. De Luca S, Sominsky L, Spencer S. Delayed spatial win-shift test on radial arm maze. *Bio Protoc.* 2016;6(23). doi: [10.21769/bioprotoc.2053](https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2053)
19. Richter SH, Zeuch B, Lankisch K, Gass P, Durstewitz D, Vollmayr B. Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression. *PLoS One.* 2013;8(4):e62458. doi: [10.1371/journal.pone.0062458](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062458)
20. Watson C, Paxinos G. *Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Elsevier Science & Technology Books; 2006.
21. Rodríguez Díaz M, Abdala P, Barroso-Chinea P, Obeso J, González-Hernández T. Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2001;122(1):79-92. doi: [10.1016/s0166-4328\(01\)00168-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00168-1)
22. Barone S, Nanry KP, Mundy WR, McGinty JF, Tilson HA. Spatial learning deficits are not solely due to cholinergic deficits following medial septal lesions with colchicine. *Psychobiology.* 1991;19(1):41-50. doi: [10.1007/bf03337954](https://doi.org/10.1007/bf03337954)
23. Anderson BJ, Rapp DN, Baek DH, McCloskey DP, Coburn-Litvak PS, Robinson JK. Exercise influences spatial learning in the Radial Arm Maze. *Physiol Behav.* 2000;70(5):425-9. doi: [10.1016/s0031-9384\(00\)00282-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00282-1)
24. Preston E, Triandafillou J, Haas N. Colchicine lesions of ventromedial hypothalamus: Effects on regulatory thermogenesis in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989;32(1):301-7. doi: [10.1016/0091-3057\(89\)90247-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90247-5)

The behavior of the *Bacillus* probiotic species under conditions of co-cultivation

O. V. Knysh^{ID}*A-F, A. V. Martynov^{ID}A,B,C,E,F, S. I. Pokhyl^{ID}B,C, N. I. Skliar^{ID}B,C

State Institution "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Ключові слова:

Bacillus, *B. clausii*,
B. coagulans, *B. subtilis*,
співкультивування,
інгібіторна активність,
плавання, роїння.

Key words:

Bacillus, *B. clausii*,
B. coagulans, *B. subtilis*,
cocultivation, inhibitory
activity, swimming,
swarming.

Надійшла до редакції /
Received: 03.07.2023

Після доопрацювання /
Revised: 18.09.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 22.09.2023

Конфлікт інтересів:
відсутній.

Conflicts of interest:
authors have no conflict
of interest to declare.

***E-mail:**
knysh_oksana@ukr.net

Combining probiotic bacteria is a promising strategy to increase the effectiveness and avoid side effects of probiotic therapy. Bacteria that find themselves in a common environment are able to both change their properties and show new ones under the influence of each other. The change of colonization and antagonistic properties, which provide bacteria with competitive advantages in the development of new spaces, deserves special attention.

The aim of this research was to study the features of the mutual influence of probiotic bacilli: *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis* on growth, swimming and swarming motility when co-cultivated on agar media of different solidity.

Materials and methods. The study used commercial strains of bacilli from three probiotic preparations: Enterogermina, Lactovit forte and Subalin. The ability of the studied species of bacilli to influence each other's growth was investigated by the agar block method (using 1.5 % nutrient agar) and the spot-on-lawn assay (using 0.7 % nutrient agar). The study of the mutual influence on swimming and swarming activity was carried out when bacilli were cultivated on 0.25 % and 0.70 % tryptone agar, respectively. The diameters of swimming halos and migration swarms formed by mono- and mixed cultures were measured, and the areas covered by them were compared. The phenotypes of the meeting of swarms formed by cultures spotted on the swarm plates at different locations were also investigated.

Results. The studied probiotic species of the bacilli did not show a strong ability to inhibit each other's growth. The *B. clausii* culture had no inhibitory effect, and the *B. coagulans* culture demonstrated a moderate inhibitory influence on the growth of the other two species of bacilli when using both diffusion methods. The *B. subtilis* culture showed moderate or weak inhibitory activity against the *B. clausii* culture and weak or no inhibitory activity against the *B. coagulans* culture using the agar block method or spot-on-lawn assay, respectively. The *B. coagulans* + *B. subtilis*, *B. clausii* + *B. coagulans* and *B. clausii* + *B. subtilis* mixed cultures showed moderate, weak and no inhibitory activity against third cultures, respectively. The studied species of bacilli showed different swimming ability and swarming potential as well as the ability to influence each other's motility. Swimming halos formed by the *B. clausii* + *B. subtilis* and *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed cultures covered significantly larger plate areas than the swimming halos formed by each culture separately during the same cultivation time. The highest swarming potential was observed in *B. coagulans* culture and *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture. The studied bacilli did not show the ability to merge swarms, but, on the contrary, their swarms at the point of contact formed visible "boundary" or "intermediate" lines, demonstrating the ability to identify nonself.

Conclusions. The obtained results indicate the ability of the probiotic species of bacilli: *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis* to mutually influence growth, swimming and swarm motility. The highest indicators of swimming and swarming of the triple mixed culture indicate an increase in the colonization potential of the studied bacilli when they are combined. The hypothesis of mutual induction of inhibitory compounds production by bacilli, which may increase the overall antagonistic potential of the triple mixed culture, is subject to further confirmation.

Modern medical technology. 2023;(4):59-69

Поведінка пробіотичних видів *Bacillus* за умов співкультивування

О. В. Книш, А. В. Мартинов, С. І. Похил, Н. І. Скляр

Поєднання пробіотичних бактерій – перспективна стратегія підвищення ефективності й уникнення побічних ефектів пробіотичної терапії. Бактерії, що потрапили в спільне середовище, під впливом одна на одну можуть змінювати окремі властивості та виявляти нові. Особливої уваги заслуговує зміна колонізаційних та антагоністичних властивостей, що забезпечують бактеріям конкурентні переваги в освоєнні нових просторів.

Мета роботи – вивчення особливостей взаємного впливу пробіотичних бацил, а саме *B. clausii*, *B. coagulans* та *B. subtilis* на ріст, плавальну та роївову рухливість при спільному культивуванні на агаризованих середовищах різної густини.

Матеріали та методи. У дослідженні використовували комерційні штами бактерій трьох пробіотичних препаратів, а саме Ентерожерміна, Лактовіт форте та Субалін. Здатність видів бацил, що вивчали, взаємно впливати на ріст досліджували методом агарових блоків (з використанням 1,5 % поживного агару) та методом лунок на газоні (з використанням 0,7 % поживного агару). Взаємний вплив на плавальну та ройову активність вивчали при культивуванні бацил на 0,25 % та 0,70 % триптонному агарі відповідно. Вимірювали діаметри плавальних ореолів і міграційних зграй, утворених моно- та змішаними культурами, а також порівнювали охоплені ними площі чашок. Крім того, дослідили фенотипи зустрічі роїв, утворених культурами, що нанесені на ройових чашках у різних місцях.

Результати. Досліджені пробіотичні види бацил не виявили сильної здатності пригнічувати ріст один одного. Культура *B. clausii* не мала інгібіторного ефекту, а культура *B. coagulans* показала помірний інгібіторний вплив на ріст двох інших видів бацил; це спостерігали при використанні обох дифузійних методів. Культура *B. subtilis* характеризувалася помірною або слабкою інгібіторною активністю щодо культури *B. clausii*, не мала або виявила слабку інгібіторну активність щодо культури *B. coagulans* при застосуванні методу агарових блоків або лунок на газоні відповідно. Змішані культури *B. coagulans* + *B. subtilis*, *B. clausii* + *B. coagulans* і *B. clausii* + *B. subtilis* характеризувалися помірною та слабкою інгібіторною активністю відповідно, щодо третіх культур її не виявили. Досліджені види бацил характеризувалися різною плавальною активністю та потенціалом роїння, а також мали здатність впливати на рухливість один одного. Плавальні ореоли, утворені змішаними культурами *B. clausii* + *B. subtilis* та *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis*, охоплювали значно більші площі чашок, ніж плавальні ореоли, що утворені кожною культурою окремо протягом однакового часу культивування. Найвищий потенціал до роїння визначили в *B. coagulans* та змішаній культурі *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis*. Бацили, що вивчали, не виявляли здатності до злиття роїв – їхні рої в місці контакту утворювали видимі «межові» або «проміжні» лінії, а отже мали здатність ідентифікувати «не себе».

Висновки. Результати свідчать про здатність пробіотичних видів бацил, зокрема *B. clausii*, *B. coagulans* і *B. subtilis*, взаємно впливати на ріст, плавання та ройову рухливість. Найвищі показники плавання та роїння потрійної мікс-культури свідчать про підвищення колонізаційного потенціалу досліджених бацил при їх поєднанні. Гіпотеза про взаємну індукцію бацилами продукції інгібіторних сполук, що може збільшити загальний антагоністичний потенціал потрійної змішаної культури, потребує підтвердження.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 59-69

Probiotic bacteria of the genus *Bacillus* are of great interest to researchers. Beneficial bacilli play a key role in intestinal homeostasis, promoting the growth of other beneficial bacteria and inhibiting the growth of pathogens and pathobionts, contribute to the proper development, maturation and functioning of the immune system, strengthening the epithelial barrier, normalizing digestion and metabolism, etc. [1,2,3,4]. The former notion of *Bacillus* as "transient" members of the gut microbiome is incorrect as they are most likely intestinal colonizers [3]. Due to the high resistance of spores to adverse environmental factors, bacilli survive in stressful conditions of the gastrointestinal tract and reach the intestine without significant quantitative and qualitative losses [5,6]. This allows bacilli to realize their probiotic potential more efficiently than non-spore-forming bacteria [7,8,9,10]. Unlike vegetative probiotic bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*, representatives of the genus *Bacillus* do not require lyophilization, as they can be stored in spore form for a long time without loss of germination [8,11].

B. clausii, *B. coagulans* and *B. subtilis* are some of the most commonly used commercial *Bacillus* probiotic species [10]. In addition to common probiotic activity, each species / strain has inherent only to its properties and the mechanisms of action due to the uniqueness of the structure and spectrum of produced biologically active metabolites [6,12,13,14,15]. For example, recombinant probiotic strain *B. subtilis* UCM B-5020 is capable of synthesizing human leukocyte α 2-interferon due to the artificial introduction of plasmid DNA containing the interferon gene into its genome [14].

Combining probiotic species, strains, and postbiotic products is a promising strategy to improve efficacy and avoid side effects of probiotic therapy [16,17,18,19]. Multi-strain probiotics have demonstrated higher antagonistic activity against pathogens than single-strain probiotics [19,20]. Bacteria that find themselves in a common environment establish certain relationships with each other. A number of studies have established that intermicrobial interactions in a coexistence environment can lead not only to a change in the properties inherent in bacteria, but also to the emergence of new properties that are absent in a monoculture [21,22]. The study of the mutual influence of probiotic bacteria on colonization and antagonistic properties, which provide them with competitive advantages in the development of new spaces and the improvement of the microecological environment, deserves special attention.

Aim

The aim of this research was to study the features of the mutual influence of probiotic bacilli: *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis* on growth, swimming and swarming motility when co-cultivated on agar media of different solidity.

Materials and methods

This research was carried out in the Laboratory and Clinical Department of Molecular Immunopharmacology of the State Institution "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine".

The study used commercial strains of bacilli from three probiotic preparations:

1) Enterogermina (Sanofi-Aventis S. P. A., Italy), contains a mixture of spores ($2.5 \times 10^9/5$ mL) of four multiresistant strains of *B. clausii* ENTPro: O/C (CNCM I-276), N/R (CNCM I-274), SIN (CNCM I-275) and T (CNCM I-273);

2) Lactovit forte (Mili Healthcare, Great Britain), contains $1,2 \times 10^8$ spores/capsule of *B. coagulans*;

3) Subalin (Biopharma, Ukraine), contains spores and lyophilized microbial mass of a live antagonistically active culture of *B. subtilis* UCM B-5020 (1×10^9 CFU/sachet).

Before inoculation, aqueous suspensions of spores ($\sim 10^9$ /ml) were heated for 15 min at 70 °C in order to activate spores and kill bacteria. Vegetative cells were obtained by germinating spores on the surface of nutrient agar (NA, HiMedia, India) at 37 °C for 24 hours. The inoculum was prepared by suspending a few colonies from the agar preculture in sterile saline solution (0.9 % NaCl) and adjusting the suspension to a turbidity of 4.0 McFarland (approximately corresponds to a cell density of $1.6 \pm 0.5 \times 10^8$ cells/ml). The turbidity of the suspension was measured using the Densi-La-Meter device (Pliva-Lachema Diagnostika, Czech Republic).

The influence of probiotic species of bacilli on the growth of each other under the conditions of co-cultivation was studied by two modified diffusion methods: agar block method and spot-on-lawn assay [23,24].

Agar block method. The inoculum from test preculture was sown on the surface of the NA by the "lawn" method and cultivated at 37 °C for 24 hours. It was assumed that during cultivation, diffusion into the agar of metabolites produced by bacteria, including those with inhibitory properties, occurred. Agar blocks (cylinders with a diameter of 5 mm and a height of 3 mm) with grown test cultures were cut out in the conditions of sterility. The resulting blocks were installed on the surface of freshly seeded (by inoculum containing vegetative cells of the indicator culture) and dried agar. Plates with agar blocks were kept at a temperature of $+8 \pm 2$ °C for an hour for the diffusion of metabolites of the test culture from the blocks into the agar with the indicator culture and in order to avoid premature growth of the latter. Then the plates were incubated at 37 °C. The results of the experiment were taken into account after 24 hours. The inhibitory activity of the test culture against the indicator culture was assessed by the size of the growth inhibition zone of the latter: + – weak, 1–2 mm; ++ – moderate, 2–4 mm; +++ – strong, more than 4 mm, as described previously by I. Khatri et al. [8].

Spot-on-lawn assay. 800 µl of inoculum from indicator preculture was mixed with 16 ml of 0.7 % soft NA and directly poured onto a plate with 1.5 % NA. The plate was dried for 50 min. In the center of the plate, three wells with a diameter of 10 mm were made at a distance of at least 2.5 mm from each other. 50 µl of inoculums from two test precultures and their mixture (1:1) were added to the wells. The plate was incubated at 37 °C for 24 h. The inhibitory activity of the test cultures and their mixture against the indicator culture was evaluated based on the inhibition zone as described above.

Motility assays. Swimming and swarming motility were studied in accordance with the previously described methods [25,26].

Plates with a diameter of 90 mm were used. For each experiment swim plates (TrM: 1.00 % tryptone, 0.50 % NaCl, 0.25 % agar) and swarm plates (TrA: 1.0 % tryptone, 0.5 % NaCl, 0.7 % agar) were prepared fresh daily and left overnight at room temperature before use. 5 µl of inoculum from preculture (or mixture of two / three precultures) was spotted onto the center of TrM plate. The growth halo diameter was measured every 2 hours for 10 hours and after 15 hours incubation of plates at 37 °C in a humidified chamber.

Swarming motility was initiated by spotting 50 µl of inoculum from preculture (or mixture of two/three precultures) onto the center of TrA plate. Swarming migration was evaluated by measuring swarm diameter every 2 hours for 16 hours and after 24 hours incubation of plates at 37 °C in a humidified chamber. Swarming differentiation was confirmed by visualizing the presence of elongated swarmer cells at the colony rim (Fig. 4D).

A swarm boundary assay was performed as described by P. Stefanic et al. [27]. To investigate difference between approaching swarms, cell suspensions of monocultures were spotted on the TrA plate at different locations. After drying for 5 minutes plates were incubated at 37 °C in a humidified chamber and photographed. The phenotypes of the meeting of swarms were determined from the photos.

All experiments were performed in triplicate at least three times. Data were statistically processed using LibreOffice Calc 7.5 OpenLicense MPL 2.0 and expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Significant differences ($p < 0.05$) between the compared indicators were determined by performing a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc multiple comparisons using Bonferroni adjustment.

Results

The study of relationships between bacilli on a solid nutrient medium using the agar block method showed their complex nature. The *B. clausii* culture did not show an inhibitory effect on the growth of the *B. coagulans* culture (Fig. 1a). Visually, the growth zone of one culture smoothly passed into the growth zone of another. Between the agar blocks with the *B. clausii* culture and the growth zones of *B. subtilis*, very thin (up to 0.5 mm) stripes of the absence of culture growth were observed, which indicated an insignificant effect of the test culture on the growth of the indicator culture (Fig. 1b).

On plates with the *B. clausii* indicator culture, a noticeable, up to 1.8 ± 0.8 mm, expansion of the *B. coagulans* culture beyond the agar blocks was observed (Fig. 1c). These two cultures were separated by 0.3 ± 0.2 mm wide streaks of no growth. Therefore, the *B. coagulans* culture has a moderate (++) inhibitory effect on the growth of the *B. clausii* culture. On plates with the *B. subtilis* indicator culture, in addition to the expansion of the *B. coagulans* culture beyond the agar blocks for a distance of up to 0.9 ± 0.4 mm, a significant growth inhibition of the indicator culture was observed (Fig. 1d). The width of the growth inhibition zone of *B. subtilis* culture was 2.9 ± 0.4 mm (++, moderate inhibitory activity).

On plates with the *B. clausii* indicator culture, the expansion of the *B. subtilis* culture beyond the agar block to a distance of up to 1.2 ± 0.4 mm was observed (Fig. 1e). The width of the

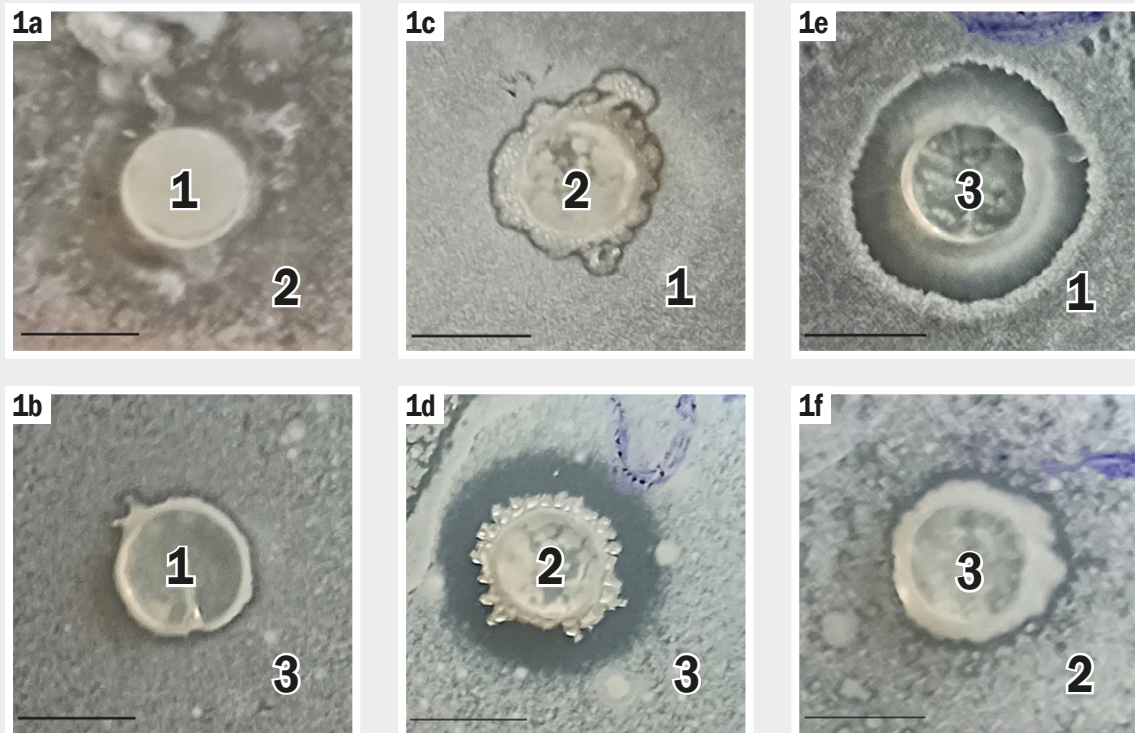


Fig. 1. Representative photographs of agar blocks with studied cultures surrounded by growth zones / growth inhibition zones of indicator cultures. **1:** *B. clausii*; **2:** *B. coagulans*; **3:** *B. subtilis*. The scale bar is 5 mm.

Table 1. The ability of probiotic *Bacillus* species to inhibit each other’s growth (spot-on-lawn assay)

Test cultures	The growth inhibition zones of the indicator cultures (mean ± SD, mm)		
	<i>B. clausii</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>B. clausii</i>	–	<1.0	<1.0
<i>B. coagulans</i>	2.5 ± 0.5	–	2.1 ± 0.7
<i>B. subtilis</i>	1.2 ± 0.4	<1.0	–
<i>B. coagulans</i> + <i>B. subtilis</i>	2.9 ± 0.7	–	–
<i>B. clausii</i> + <i>B. subtilis</i>	–	<1.0	–
<i>B. clausii</i> + <i>B. coagulans</i>	–	–	1.1 ± 0.7

growth inhibition zone of the indicator culture was 1.43 ± 0.40 mm. Thus, the *B. subtilis* culture revealed a moderate (++) inhibitory effect on the growth of the *B. clausii* culture. On plates with the *B. coagulans* indicator culture, the expansion of *B. subtilis* beyond the boundaries of the agar blocks up to 1.0 ± 0.5 mm was observed (Fig. 1f). The *B. subtilis* and *B. coagulans* cultures were separated by a very narrow, up to 0.40 ± 0.15 mm, stripe of no growth. So, *B. subtilis* showed weak (+) inhibitory activity against *B. coagulans* culture.

The results of the spot-on-lawn assay in many ways resembled the results of the agar block method. The *B. clausii* test culture had no inhibitory effect on the growth of *B. coagulans* and *B. subtilis* indicator cultures (Table 1).

The *B. coagulans* test culture showed a moderate inhibitory effect on the growth of *B. clausii* and *B. subtilis* indicator cultures.

A distinctive feature was that the *B. subtilis* test culture had a weak inhibitory effect on the growth of the *B. clausii* indicator culture and had no significant effect on the growth of the *B. coagulans* indicator culture. The *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture showed a moderate inhibitory effect on the *B. clausii* indicator culture. The *B. clausii* + *B. coagulans* mixed culture had a weak inhibitory effect on the *B. subtilis* indicator culture. The *B. clausii* + *B. subtilis* mixed culture did not significantly affect the growth of *B. coagulans* indicator culture.

It should be noted that the studied probiotic species of bacilli did not show a strong ability to inhibit each other’s growth. Schematically, the nature of intermicrobial relationships between the studied bacilli is shown in Fig. 2.

The aim of the next stage of the study was to find out whether the motile activity of bacilli changes during co-cultivation. The

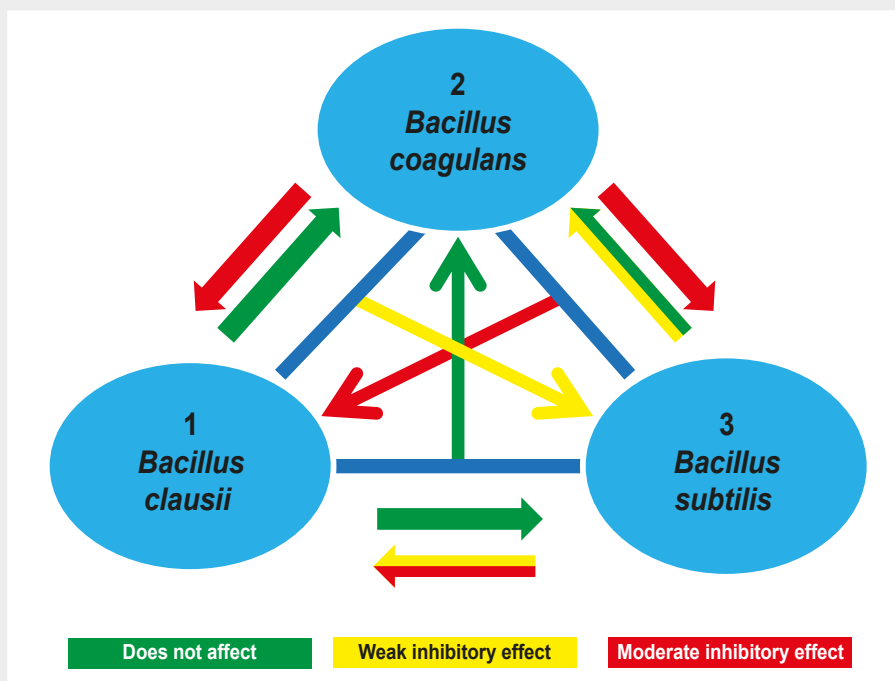


Fig. 2. Effect of probiotic bacilli on each other's growth.

studied species of bacilli showed different swimming motility (Fig. 3A, B). First, the bacilli had different durations of the initial lag phase. Second, the growth rate of swimming halos has been uneven over time and varied across cultures. As a result of the first and second, it took different times to completely cover the surface of the plate by swimming halos of different cultures and mixed cultures.

A short initial lag phase lasting 2.5 ± 0.5 hours was typical for the *B. coagulans* culture. After that, the diameter of the swimming halo increased at an average rate of ~ 10.8 mm/h. After 10 hours of cultivation, the swimming halo occupied 80.9 ± 8.0 % of the plate surface (Fig. 3A). The initial lag phases of the *B. clausii* and *B. subtilis* cultures lasted 5.00 ± 0.50 and 4.50 ± 0.25 hours, respectively. Then the swimming halo of the *B. clausii* culture expanded over the surface of the plate at an average rate of ~ 9.0 mm/h, occupying 24.9 ± 7.8 % of its area after 10 hours of cultivation. The swimming halo of the *B. subtilis* culture spread over the surface of the plate at an average rate of ~ 9.6 mm/h, occupying 34.7 ± 3.9 % of its area after 10 hours of cultivation.

The initial lag phase of the *B. clausii* + *B. coagulans* mixed culture lasted up to 2.50 ± 0.25 hours. The average rate of their swimming halo spreading over the plate surface was ~ 11.3 mm/h. After 10 hours of cultivation its area reached 89.2 ± 8.4 %, significantly exceeding the area of the swimming halo formed by *B. clausii* culture and not significantly different from the swimming halo formed by *B. coagulans* for the same cultivation time (Fig. 3A). The swimming halo of the *B. clausii* + *B. subtilis* mixed culture began to grow after a 4.5-hour initial lag phase at an average rate of ~ 11.2 mm/h. This mixed culture covered 47.5 ± 6.1 % of the plate surface after 10 hours of cultivation, which was significantly more compared to the areas occupied by the swimming halos of

each culture separately. Covering the surface of the plate by the swimming halo formed by *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture occurred at an average rate of ~ 9.3 mm/h, except for a 3-hour initial lag phase. After 10 hours of cultivation it covered the plate surface by 52.2 ± 9.6 %, which was significantly larger than the area of the *B. subtilis* swimming halo and significantly less than the area of the *B. coagulans* swimming halo. The initial lag phase of 3.0 ± 0.2 hours and the highest rate (~ 12.6 mm/h) of plate surface coating by a swimming halo were observed in the triple mixed culture of bacilli (*B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis*). After 10 hours of cultivation 95.6 ± 5.4 % of the plate surface was covered by this swimming halo.

The bacilli of the studied species showed different swarming abilities. The most powerful swarm potential among them was demonstrated by the *B. coagulans* culture (Fig. 4A). The weakest swarming potential was possessed by the *B. clausii* culture. The shortest initial lag phase of 2.00 ± 0.25 hours was observed in the *B. coagulans* culture. The initial lag phases of *B. clausii* and *B. subtilis* cultures lasted 4.50 ± 0.50 and 4.25 ± 0.25 hours, respectively. The lag phase was followed by a phase of swarm expansion. The swarm expansion rate was uneven and gradually decreased over time. The average swarm expansion rates calculated for *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis* cultures were ~ 3.8 mm/h, ~ 6.2 mm/h and ~ 6.4 mm/h, respectively. At 16 hours after inoculation, the swarm formed by the *B. coagulans* culture covered the plate surface by 93.4 ± 6.4 %, and the swarm formed by the *B. subtilis* culture covered it by 69.4 ± 9.2 %. The swarm formed by the *B. clausii* culture during this time occupied a limited area around the inoculation point, which accounted for 23.9 ± 6.5 % of the plate surface.

When *B. clausii* or *B. subtilis* were co-cultivated with *B. coagulans* on swarm plates, the initial lag phases were reduced

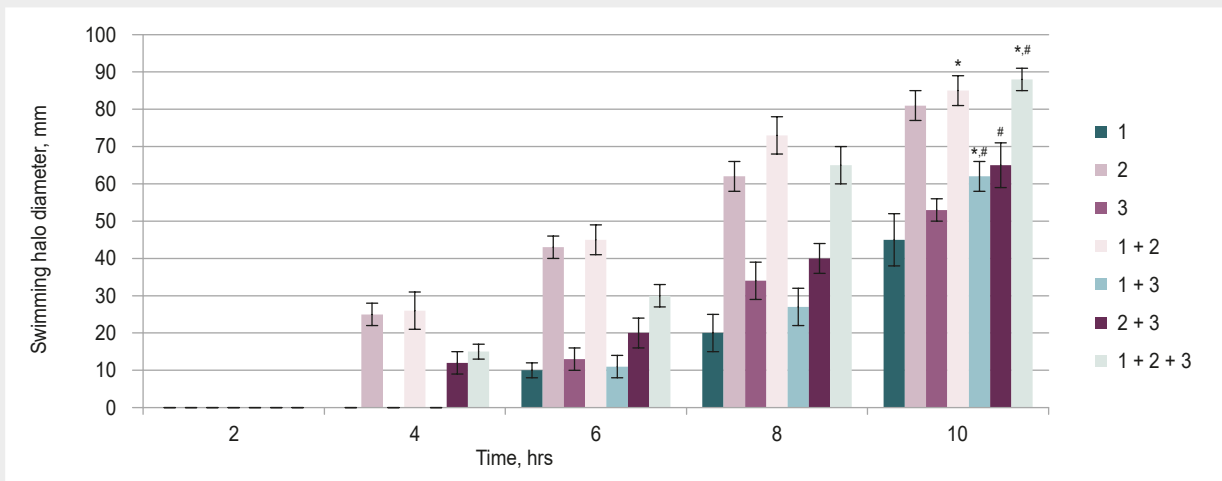


Fig. 3A. Swimming ability of *Bacillus* probiotic species under conditions of mono- and co-cultivation.

*: the differences are significant compared to sample 1; #: the differences are significant compared to sample 3, $p < 0.05$

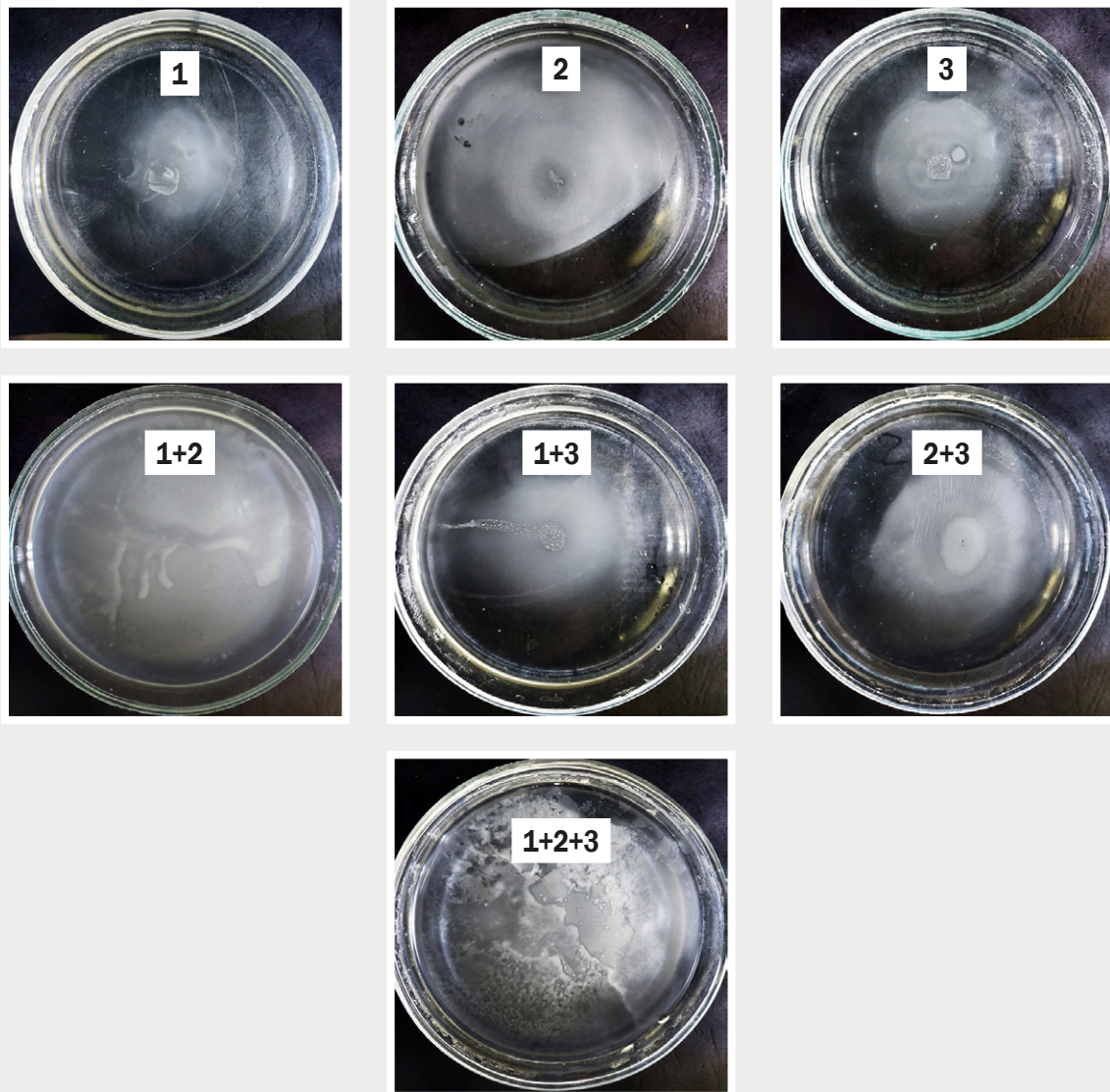


Fig. 3B. Representative photographs showing differences between the swimming halos formed by mono- and mixed cultures of the studied bacilli after 10 hours of cultivation. **1:** *B. clausii*; **2:** *B. coagulans*; **3:** *B. subtilis*.

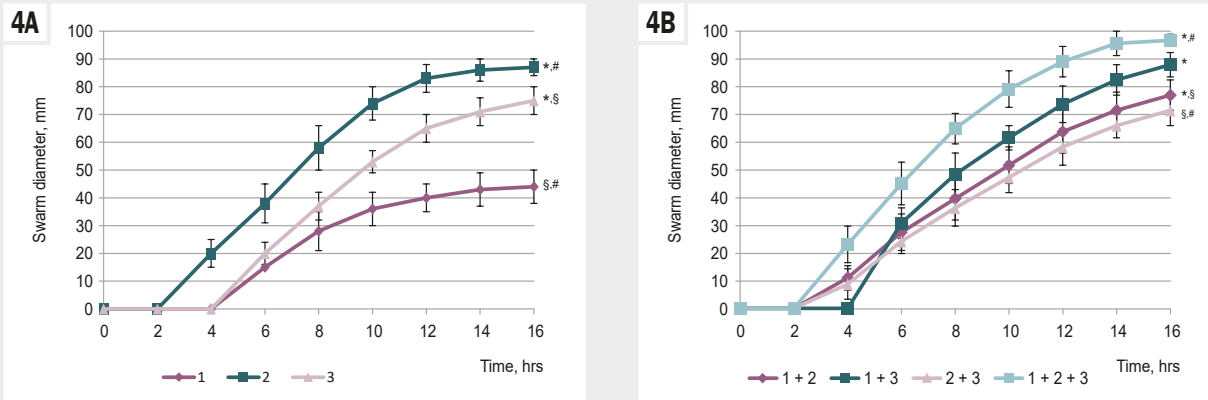


Fig. 4A, 4B. Swarming ability of *Bacillus* probiotic species under conditions of mono- (A) and co-cultivation (B). *: the differences are significant compared to 1; §: the differences are significant compared to 2; #: the differences are significant compared to 3, $p < 0.05$.

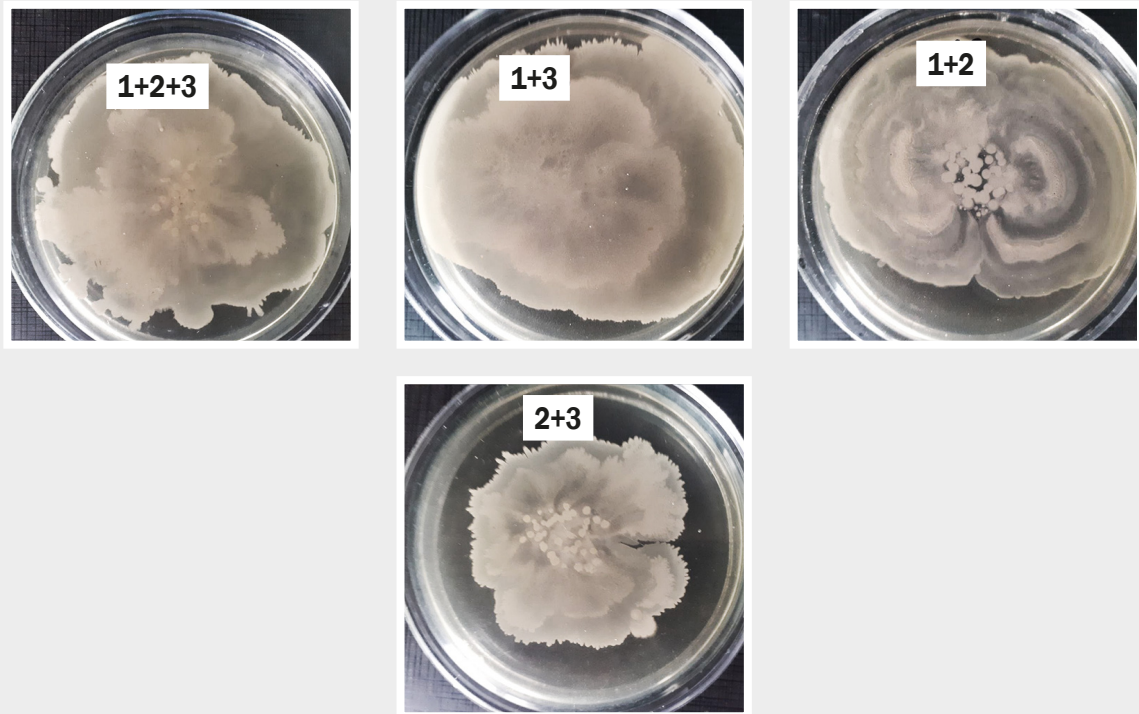


Fig. 4C. Representative photographs showing the differences between swarms formed by mixed cultures of bacilli. **1:** *B. clausii*; **2:** *B. coagulans*; **3:** *B. subtilis*.

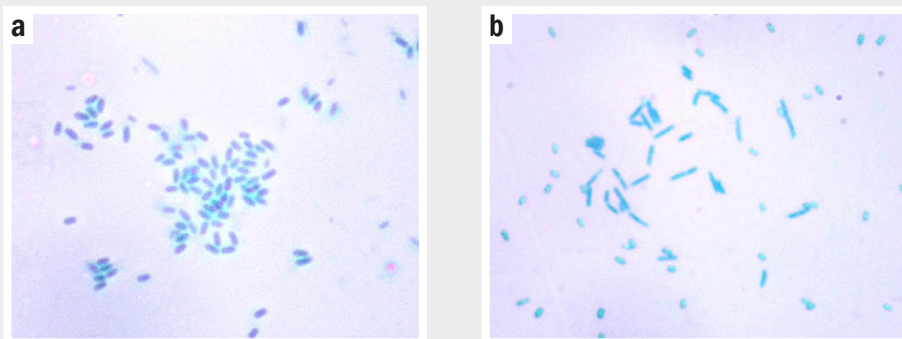
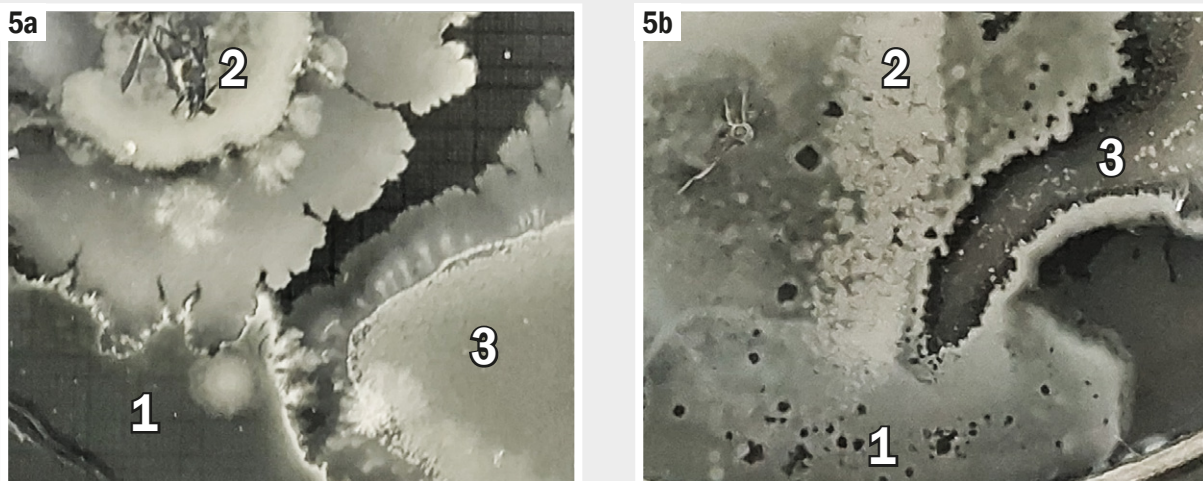


Fig. 4D. Representative micrographs showing differences between normal (a) and elongated swarm (b) cells. Normal cells were $2.0\text{--}2.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ in size; swarm cells had a size of $3.5\text{--}4.5 \times 0.5\text{--}1.0 \mu\text{m}$. Anjesky's staining technique.



1: *B. clausii*; 2: *B. coagulans*; 3: *B. subtilis*.

Fig. 5. Representative photographs to show the differences in approach phenotypes between swarms of probiotic bacillus species after 10 (a) and 24 (b) hours of cultivation.

to 2.5 ± 0.5 hours. The *B. clausii* + *B. subtilis* mixed culture was characterized by a longer lag period, 4.0 ± 0.2 hours. The triple mixed culture was in a lag period of 2.00 ± 0.25 hours. The average swarm expansion rates calculated for *B. clausii* + *B. coagulans*; *B. clausii* + *B. subtilis*; *B. coagulans* + *B. subtilis* and *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed cultures were ~ 5.2 mm/h, ~ 6.7 mm/h, ~ 4.8 mm/h and ~ 6.3 mm/h, respectively. As can be seen from the data presented in Fig. 4 B and C, after 16 hours of cultivation, the swarm formed by *B. clausii* + *B. coagulans* mixed culture covered the plate surface by 60.5 ± 8.0 % (which was significantly more than the swarm formed by *B. clausii* culture, but significantly less than the swarm formed by *B. coagulans* culture). The swarm formed by *B. clausii* + *B. subtilis* mixed culture covered the plate surface by 79.0 ± 7.9 % (which was significantly more than the swarm formed by *B. clausii* culture but did not significantly differ from the swarm formed by *B. subtilis* culture alone). The swarm formed by *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture covered the plate surface by 52.2 ± 7.4 %, which was significantly less than the swarms formed by each culture separately. The swarm formed by a mixture of three cultures covered the plate surface by 95.6 ± 4.3 %, which was significantly more than the swarms formed by *B. clausii* and *B. subtilis* cultures separately, but did not differ from the swarm formed by *B. coagulans* culture alone (Fig. 4A,B,C).

We also examined approach phenotypes between swarms of *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis*. At the meeting point of the studied swarms, we always observed a visible boundary (Fig. 5a, b). Between swarms of *B. subtilis* and *B. clausia* as well as between swarms of *B. subtilis* and *B. coagulans* were observed very striking and clear lines. They could be called "boundary" lines. Between swarms of *B. clausia* and *B. coagulans* we observed visible, but less bright lines. They could be called "intermediate" lines. We have not been able to detect mergers of swarms of different species.

Discussion

To expand the range, populate new ecological niches, adapt to adverse environmental factors, competitive or cooperative interaction with other species, bacteria use a number of well-regulated forms of population behavior [28,29].

Bacteria that have entered a common environment inevitably interact with each other. Such interaction leads to gradual adaptation to a complex life together [30]. Interactions between bacteria can change bacterial gene expression patterns and induce the secretion of various molecules that ensure survival in conditions of natural intraspecies and interspecies competition by suppressing or eliminating weak competing species or sub-populations [30,31]. The antagonistic activity of bacteria against closely related species or the entire genus is provided primarily by the production of bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) [32,33]. They are united in a heterogeneous group of bioactive peptides and proteins synthesized on bacterial ribosomes or produced via non-ribosomal synthesis, with different biochemical properties, molecular weight, amino acid sequence and mechanism of action [32,34,35]. These antimicrobial peptides can be bacteriostatic or bactericidal not only against closely related, but also against a wide range of unrelated to producer groups of microorganisms, including those resistant to antibiotics, which makes them a promising alternative to antibiotics [8,34,35,36,37].

Since the production and secretion of bacteriocins require high metabolic costs, bacteria have developed regulatory mechanisms for their generation only upon necessity [38]. As long as there are no competitors in the environment, the production of bacteriocins remains at a low level or may be gradually lost under favorable laboratory conditions. Bacteriocin-producing bacteria can be induced to increase the production of bacteriocins by bacteriocin-inducing microorganisms. Both bacteria and fungi can act as inducers of bacteriocin formation. For example, co-cultivation of *Wickerhamomyces anomalus* Y-5 and *Lactiplantibacillus plantarum* RX-8 can enhance the production of plantaricin by the

latter [39]. Co-cultivation with pathogenic *Listeria monocytogenes* or *Salmonella enterica* results in increased production of the more mature and active nisin by *Lactococcus lactis* [22].

Probably, inhibition of the growth of indicator cultures under the influence of test cultures of bacilli, observed in the study described here, was due to the action of inhibitory compounds of the bacteriocin class or BLIS. We assume that under conditions of co-cultivation, some species of bacilli could play the role of inducers or enhancers of bacteriocin production by other species of bacilli. Therefore, the combination of probiotic *Bacillus* species can increase their overall inhibitory potential against pathobionts and pathogenic bacteria. This assumption remains to be confirmed in further studies.

The results of the study of the inhibitory activity of *B. clausii* and *B. coagulans* by two different methods were similar. The inhibitory activity of *B. subtilis* was stronger when using the agar block method. Obviously, the reasons for this difference must be sought in the features of research methods. In the agar block method, a more mature test culture with an agar substrate impregnated with the products of its metabolism is planted on a freshly sown indicator culture lawn. A spot-on-lawn assay fundamentally differs from the agar block method by the simultaneous inoculation of indicator and test cultures on a nutrient medium. This means that the growth phases of both cultures pass synchronously and the *B. subtilis* test culture does not have time to synthesize a sufficient amount of inhibitory compounds.

Swimming and swarming motility is an important survival strategy that allows bacteria to move across surfaces to nutrient-rich niches with optimal conditions for growth and reproduction, successfully colonize the mucosa, establish a population, and interact with target host cells [24,40]. Motile cells with an intact chemotaxis mechanism ensure early colonization. Subsequently, part of the motile cells differentiates into non-motile cells capable of forming the extracellular matrix. The formation of a multicellular bacterial community covered by a self-secreting matrix, the so-called biofilm, is necessary for stable long-term colonization [41].

Swimming motility involves the movement of individual cells in a three-dimensional fluid space due to the rotation of the flagella [28]. The ability to actively move varies greatly between strains [42]. Bacteria in a common environment can affect each other's motility. For example, the swimming motility of *Methylobacterium* sp. ME121 was increased when co-cultivated with an immobile *Kaistia* sp. 32K, which produced a polysaccharide acceleration factor [21]. The motility of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* was either reduced or lost due to exposure to acidic metabolites of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during their co-cultivation [43]. *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis* are able to swim in a liquid environment due to peritrichally located flagella [26,44]. This study revealed the mutual influence of some studied species of bacilli on each other's swimming activity. Comparison of the growth rates of swimming halos formed by the *B. clausii* + *B. subtilis* mixed culture with halos formed by each culture separately led to the conclusion that one or both cultures stimulated the swimming motility of the other. The same could not be said about the *B. clausii* + *B. coagulans* or *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed cultures. It was found out that

the *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture was able to cover a significantly larger area of the swimming plate than any of the cultures for the same cultivation time.

Swarming motility is genetically distinct from swimming [44]. Swarming is an example of a multicellular coordinated population behavior, collective migration of bacteria consisting of the rapid movement of groups of flagellar cells in a thin liquid film on a semi-solid surface [28,29]. Contact with a harder surface slows the movement of flagella, cells undergo differentiation, becoming elongated serpentine or rod-like, the number of flagella increases [28,43]. In some species, the types of flagella used for swimming differ from those used for swarming motility [28]. Successive phases of swarming have certain spatio-temporal regularities. During several hours of the initial lag phase, the swarm does not migrate outward; there is a significant increase in cell density, the synthesis of additional flagella and the production of surfactin. Then there is a sharp transition to the phase of exponential swarm expansion, during which a collective movement in the form of cell rafts is observed inside the swarm [29]. Expansion rates can reach 5–36 mm/h and the swarm can cover the entire agar plate within hours or days [28]. The results of this study have demonstrated the mutual influence of some studied species of bacilli on each other's swarming ability. This is evidenced by the fact that the swarming potential of the *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture was significantly lower, and the swarming potential of the *B. clausii* + *B. subtilis* and the triple mixed cultures was significantly higher than theoretically expected.

The relatively high rate of swimming halos growth and the rapid swarm expansion of the *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture may indicate its high capacity for early colonization. Further *in vitro* and *in vivo* studies using animal models are necessary for the final determination of the colonization potential of this triple mixed culture.

When bacilli swarm in a common environment, a differentiated attitude of neighbors towards each other is revealed [27]. They are able to distinguish kin from nonkin depending on phylogenetic kinship. This phenomenon was called "kin discrimination". Genetically identical swarms show the ability to merge, while swarms composed of different strains form a visible boundary between themselves and do not merge. Belonging to different species explains the fact that the studied bacilli did not show the ability to merge swarms, but, on the contrary, their swarms at the point of contact formed visible "boundary" or "intermediate" lines, demonstrating the ability to identify nonself. The formation of a bright boundary line at the point of contact of two swarms indicates an antagonistic relationship between species. Antagonism between swarms may extend to other multicellular contexts [27]. Thus, the subsequent study of the mutual influence of the studied cultures in the process of biofilm formation is of scientific interest.

Conclusions

1. The obtained results indicate the ability of the probiotic species of bacilli: *B. clausii*, *B. coagulans* and *B. subtilis* to mutually influence growth, swimming and swarm motility.

2. The revealed moderate and weak inhibitory activity of some species of bacilli against others allows us to assume

that the overall inhibitory potential of mixed cultures of bacilli against pathobionts and pathogenic bacteria is higher than that of monocultures due to the mutual induction of the production of inhibitory compounds by bacilli. This assumption is subject to further confirmation.

3. The obtained relatively high rate of swimming halos growth and the rapid swarm expansion of the *B. clausii* + *B. coagulans* + *B. subtilis* mixed culture testify to its high ability for early colonization. Further *in vitro* and *in vivo* studies using animal models are necessary for the final determination of the colonization potential of this triple mixed culture.

Prospects for further research: obtained results will be used in the development of new probiotic preparations based on a combination of probiotic bacilli.

Funding

The study is a fragment of the research project of the State Institution "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" on topic: "Study of the stress factors influence on the antagonistic properties of spore-forming probiotic bacteria", state registration No. 0122U000422 (2022–2024).

Information about authors:

Knysh O. V., MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Leader Researcher of Laboratory and Clinical Department of Molecular Immunopharmacology, SI "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

ORCID ID: [0000-0002-4105-1299](https://orcid.org/0000-0002-4105-1299)

Martynov A. V., PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory and Clinical Department of Molecular Immunopharmacology, SI "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

ORCID ID: [0000-0003-1428-0085](https://orcid.org/0000-0003-1428-0085)

Pokhly S. I., MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Head of the Laboratory of New and Little-Explored Infections, SI "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

ORCID ID: [0000-0002-2298-9652](https://orcid.org/0000-0002-2298-9652)

Skliar N. I., MD, PhD, Senior Researcher, Deputy Director for Scientific Work, SI "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

ORCID ID: [0000-0002-8534-1431](https://orcid.org/0000-0002-8534-1431)

Відомості про авторів:

Книш О. В., д-р мед. наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

Мартинів А. В., д-р фарм. наук, професор, зав. лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

Похил С. І., д-р мед. наук, старший науковий співробітник, зав. лабораторії нових та маловивчених інфекцій, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

Скляр Н. І., канд. мед. наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

References

- Koopman N, Remijas L, Seppen J, Setlow P, Brul S. Mechanisms and applications of bacterial sporulation and germination in the intestine. *Int J Mol Sci.* 2022;23:3405. doi: [10.3390/ijms23063405](https://doi.org/10.3390/ijms23063405)
- Wang J, Wen B, Zeng Y, Wang H, Zhao W, Zhou Y, et al. Assessment the role of some *Bacillus* strains in improvement rex rabbits resistance against ETEC challenge. *Microb Pathog.* 2022;165:105477. doi: [10.1016/j.micpath.2022.105477](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105477)
- Egan M, Dempsey E, Ryan CA, Ross RP, Stanton C. The Sporobiota of the Human Gut. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1-17. doi: [10.1080/19490976.2020.1863134](https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1863134)
- Hatanaka M, Morita H, Aoyagi Y, Sasaki K, Sasaki D, Kondo A, et al. Effective bifidogenic growth factors cyclo-Val-Leu and cyclo-Val-Ile produced by *Bacillus subtilis* C-3102 in the human colonic microbiota model. *Sci Rep.* 2020;10(1):7591. doi: [10.1038/s41598-020-64374-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-64374-w)
- Costa N de A, Martins AFL, Guimarães ADB, Capela AP da, Magalhães IS, Arruda TR, et al. Probiotic and paraprobiotic potential of *Bacillus coagulans*: Impact of processing and storage on viability and resistance in the gastrointestinal tract. *Res Soc Dev.* 2022;11(8):e26211831013. doi: [10.33448/rsd-v11i8.31013](https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.31013)
- Ghelardi E, Abreu y Abreu AT, Marzet CB, Álvarez Calatayud G, Perez M, Moschione Castro AP. Current progress and future perspectives on the use of *Bacillus clausii*. *Microorganisms.* 2022;10(6):1246. doi: [10.3390/microorganisms10061246](https://doi.org/10.3390/microorganisms10061246)
- Khullar G, Det-udom R, Prombutar P, Prakitchaiwattana C. Probiogenomic analysis and safety assessment of bacillus isolates using omics approach in combination with *in-vitro*. *LWT.* 2022;159:113216. doi: [10.1016/j.lwt.2022.113216](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113216)
- Khatri I, Sharma G, Subramanian S. Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):307. doi: [10.1186/s12866-019-1680-7](https://doi.org/10.1186/s12866-019-1680-7)
- Poshadri A, Deshpande HW, Khodke UM, Katke SD. *Bacillus Coagulans* and its Spore as Potential Probiotics in the Production of Novel Shelf-Stable Foods. *Curr Res Nutr Food Sci.* 2022;10(3):858-70. doi: [10.12944/CRNFSJ.10.3.4](https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.3.4)
- Lee NK, Kim WS, Paik HD. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci Biotechnol.* 2019;28(5):1297-305. doi: [10.1007/s10068-019-00691-9](https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9)
- Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr.* 2019;10(suppl_1):S49-S66. doi: [10.1093/advances/nmy063](https://doi.org/10.1093/advances/nmy063)
- Cao J, Yu Z, Liu W, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *J Funct Foods.* 2020;64:103643. doi: [10.1016/j.jff.2019.103643](https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643)
- Aulitto M, Strazzulli A, Sansone F, Cozzolino F, Monti M, Moracci M, et al. Prebiotic properties of *Bacillus coagulans* MA-13: production of galactoside hydrolyzing enzymes and characterization of the transglycosylation properties of a GH42 β -galactosidase. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):71. doi: [10.1186/s12934-021-01553-y](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01553-y)
- Gubergrits NB, Byelyayeva NV. [Butterfly wings and intestinal microbiome, or megaevolution in the world of probiotics]. *Mod Gastroenterol.* 2020;0(2):47-59. Russian. doi: [10.30978/MG-2020-2-47](https://doi.org/10.30978/MG-2020-2-47)
- Chang HY, Chen JH, Chang JH, Lin HC, Lin CY, Peng CC. Multiple strains probiotics appear to be the most effective probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis and mortality: An updated meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171579. doi: [10.1371/journal.pone.0171579](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171579)
- McFarland LV, Huang Y, Wang L, Malfertheiner P. Systematic review and meta-analysis: multi-strain probiotics as adjunct therapy for *Helicobacter pylori* eradication and prevention of adverse events. *United European Gastroenterol J.* 2016;4(4):546-61. doi: [10.1177/2050640615617358](https://doi.org/10.1177/2050640615617358)
- Mazkour S, Shekarforoush SS, Basiri S. The effects of supplementation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* spores on the intestinal microflora and growth performance in rat. *Iran J Microbiol.* 2019;11(3):260-6.
- Knysh OV. Bifidogenic properties of cell-free extracts derived from probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri*. *Regul Mech Biosyst.* 2019;10(1):124-8. doi: [10.15421/021919](https://doi.org/10.15421/021919)
- Fijan S, Šulc D, Steyer A. Study of the *in vitro* antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(7):1539. doi: [10.3390/ijerph15071539](https://doi.org/10.3390/ijerph15071539)

20. Bernatek M, Żukiewicz-Sobczak W, Lachowicz-Wiśniewska S, Piątek J. Factors determining effective probiotic activity: evaluation of survival and antibacterial activity of selected probiotic products using an "in vitro" study. *Nutrients*. 2022;14(16):3323. doi: [10.3390/nu14163323](https://doi.org/10.3390/nu14163323)
21. Usui Y, Wakabayashi Y, Shimizu T, Tahara YO, Miyata M, Nakamura A, et al. A factor produced by *Kaistia* sp. 32K accelerated the motility of *Methylobacterium* sp. ME121. *Biomolecules*. 2020;10(4):618. doi: [10.3390/biom10040618](https://doi.org/10.3390/biom10040618)
22. Abdollahi S, Ghahremani MH, Setayesh N, Samadi N. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* affect the expression of nisin gene and its production by *Lactococcus lactis*. *Microb Pathog*. 2018;123:28-35. doi: [10.1016/j.micpath.2018.06.024](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.024)
23. Fijan S. Antimicrobial effect of probiotics against common pathogens. In: Rao V, Rao LG, editors. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. InTech; 2016. doi: [10.5772/63141](https://doi.org/10.5772/63141)
24. Cao Y, Pi H, Chandransu P, Li Y, Wang Y, Zhou H, et al. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci Rep*. 2018;8(1):4360. doi: [10.1038/s41598-018-22782-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z)
25. Mazzantini D, Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Lupetti A, Senesi S, et al. FlhF is required for swarming motility and full pathogenicity of *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*. 2016;7:1644. doi: [10.3389/fmicb.2016.01644](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01644)
26. Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S, et al. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152831. doi: [10.1371/journal.pone.0152831](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152831)
27. Stefanic P, Kraigher B, Lyons NA, Kolter R, Mandic-Mulec I. Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(45):14042-7. doi: [10.1073/pnas.1512671112](https://doi.org/10.1073/pnas.1512671112)
28. Rütshlin S, Böttcher T. Inhibitors of bacterial swarming behavior. *Chemistry*. 2020;26(5):964-79. doi: [10.1002/chem.201901961](https://doi.org/10.1002/chem.201901961)
29. Jeckel H, Jelli E, Hartmann R, Singh PK, Mok R, Totz JF, et al. Learning the space-time phase diagram of bacterial swarm expansion. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116(5):1489-94. doi: [10.1073/pnas.1811722116](https://doi.org/10.1073/pnas.1811722116)
30. Rosenberg G, Steinberg N, Oppenheimer-Shaanan Y, Olender T, Doron S, Ben-Ari J, et al. Not so simple, not so subtle: the interspecies competition between *Bacillus simplex* and *Bacillus subtilis* and its impact on the evolution of biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:15027. doi: [10.1038/npjbiofilms.2015.27](https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.27)
31. Popp PF, Mascher T. Coordinated cell death in isogenic bacterial populations: sacrificing some for the benefit of many? *J Mol Biol*. 2019;431(23):4656-69. doi: [10.1016/j.jmb.2019.04.024](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.024)
32. Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, et al. Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Lab Anal*. 2022;36(1):e24093. doi: [10.1002/jcla.24093](https://doi.org/10.1002/jcla.24093)
33. Leite JA, Tulini FL, Reis-Teixeira FB dos, Rabinovitch L, Chaves JQ, Rosa NG, et al. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp. *LWT - Food Sci Technol*. 2016;72:261-6. doi: [10.1016/j.lwt.2016.04.058](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.058)
34. Meade E, Slattery MA, Garvey M. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(1):32. doi: [10.3390/antibiotics9010032](https://doi.org/10.3390/antibiotics9010032)
35. Ghazaei C. Study of the effect of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* strains on beta-lactamase-producing pathogenic bacteria. *J Clin Res Paramed Sci*. 2022;11(2). doi: [10.5812/jcrps-130208](https://doi.org/10.5812/jcrps-130208)
36. Knysh O, Martynov A. Nisin: prerequisites and prospects for application in the medical field. *Galician Med J*. 2023;30(1):E202316. doi: [10.21802/gmj.2023.1.6](https://doi.org/10.21802/gmj.2023.1.6)
37. Soltani S, Hammami R, Cotter PD, Rebuffat S, Said LB, Gaudreau H, et al. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(1):fuaa039. doi: [10.1093/femsre/fuaa039](https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039)
38. Kern L, Abdeen SK, Kolodziejczyk AA, Elinav E. Commensal inter-bacterial interactions shaping the microbiota. *Curr Opin Microbiol*. 2021;63:158-71. doi: [10.1016/j.mib.2021.07.011](https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.07.011)
39. Nie R, Zhu Z, Qi Y, Wang Z, Sun H, Liu G. Bacteriocin production enhancing mechanism of *Lactiplantibacillus paraplantarum* RX-8 response to *Wickerhamomyces anomalous* Y-5 by transcriptomic and proteomic analyses. *Front Microbiol*. 2023;14:1111516. doi: [10.3389/fmicb.2023.1111516](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1111516)
40. Schwenk V, Dietrich R, Klingl A, Märklbauer E, Jessberger N. Characterization of strain-specific *Bacillus cereus* swimming motility and flagella by means of specific antibodies. *PLoS One*. 2022;17(3):e0265425. doi: [10.1371/journal.pone.0265425](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265425)
41. Allard-Massicotte R, Tessier L, Lécuyer F, Lakshmanan V, Lucier J-F, Garneau D, et al. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *mBio*. 2016;7(6):e01664-16. doi: [10.1128/mbio.01664-16](https://doi.org/10.1128/mbio.01664-16)
42. Kudo S, Morimoto YV, Nakamura S. A lactose fermentation product produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, acetate, inhibits the motility of flagellated pathogenic bacteria. *Microbiology*. 2015;161(Pt 4):701-7. doi: [10.1099/mic.0.000031](https://doi.org/10.1099/mic.0.000031)
43. Losick RM. *Bacillus subtilis*: A bacterium for all seasons. *Curr Biol*. 2020;30(19):PR1146-R1150. doi: [10.1016/j.cub.2020.06.083](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.083)
44. Hayes EI, Patrick JE. *yozyG* is needed for swarming in the undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610. *Trans Mo Acad Sci*. 2022;49:27-35. doi: [10.30956/MAS-50](https://doi.org/10.30956/MAS-50)

Resonance frequency analysis – indicator of post-implantation morphology of mandibular bone tissue

A. P. Oshurko^{ID}*A-F, I. Yu. Oliinyk^{ID}A,C,E,F, N. B. Kuzniak^{ID}A,E,F, L. M. Herasym^{ID}B,C,D

Bukovinian State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Chernivtsi

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

mandible, bone tissue, short implants, resonance frequency analysis.

Ключові слова:

нижня щелепа, кісткова тканина, короткі імплантати, резонансно-частотний аналіз.

Надійшла до редакції /
Received: 05.07.2023

Після доопрацювання /
Revised: 01.09.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 11.09.2023

Конфлікт інтересів:
відсутній.

Conflicts of interest:
authors have no conflict
of interest to declare.

*E-mail:
anatoliystudent@gmail.com

This article describes the role of resonance frequency analysis (RFA) as an indicator of the quality of primary implant stability, which is the basis of the goal and confirmed by the results of a clinical case – odontological implantation on edentulous segments of atrophied bone tissue on the right side of the mandible, taking into account the topographic features of its canal, using ultra-short ($h = 5.5$ mm) implants.

Aim. To highlight the role of resonance frequency analysis during surgical interventions using short (ultrashort) implants in predicting their primary stability and preserving the normal morphology of the mandibular bone tissue.

Materials and methods. The primary stability of 17 dental implants in seven patients was determined using the Penguin Instruments (RFA) technique in declarative units of measurement – the implant stability quotient (ISQ). Values in the range of 75 ISQ meant that the implant had adequate primary stability and could receive and distribute the immediate load on the bone tissue of the edentulous segment.

Results. Following the stages of preparation, 17 ultra-short ($h = 5.5$ mm \times $b = 4.0$ mm) implants were placed on the edentulous segments of the mandible without an incisional osteotomy path according to the patient rehabilitation protocol. We used the method of resonance frequency analysis to obtain a value of high primary stability of two short subcortical implants in the projection of tooth 4.7 – 92 ISQ and the projection of tooth 4.6 – 90 ISQ. On the 3rd day of the clinical stage of fixation of the supraconstruction, RFA measurements were performed, the values of which showed a significant decrease in the stability quotient of the installed implants in the projection of tooth 4.7 – 61 ISQ and in tooth 4.6 – 74 ISQ. This result made it necessary to revise the rehabilitation plan, adjust the medical prescription sheet and decide to postpone the placement of the all-milled restorative structure on the implants.

Conclusions. The RFA study indicates not only the primary stability of implants but also a full-fledged stage-by-stage clinical prognosis of the further functionality of a prosthetic structure based on short implants with proper preservation of the morphological functionality of bone tissue.

Modern medical technology. 2023;(4):70-75

Резонансно-частотний аналіз – індикатор постімплантаційної морфології кісткової тканини нижньої щелепи

А. П. Ошурко, І. Ю. Олійник, Н. Б. Кузняк, Л. М. Герасим

Описано роль резонансно-частотного аналізу (РЧА) як індикатора якості первинної стабільності імплантатів, що покладено в основу мети та підтверджено результатами аналізу клінічного випадку: виконання одонтологічної імплантації на беззубих сегментах атрофованої кісткової тканини правого боку нижньої щелепи, враховуючи топографічні особливості її каналу та використовуючи ультракороткі ($h = 5,5$ мм) імплантати.

Мета роботи – висвітлити роль резонансно-частотного аналізу при хірургічних втручаннях із використанням коротких (ультракоротких) імплантатів у прогнозуванні їхньої первинної стабільності та збереженні нормальної морфології кісткової тканини нижньої щелепи.

Матеріали та методи. Первинну стабільність 17 дентальних імплантатів у семи пацієнтів визначали за допомогою техніки Penguin Instruments (РЧА) у декларативних одиницях вимірювання – коефіцієнт стабільності імплантата (КСІ). Значення в діапазоні 75 КСІ вказували, що імплантат має належну первинну стабільність, може отримувати й розподіляти негайне навантаження на кісткову тканину беззубого сегмента.

Результати. Дотримуючись етапів препарування та без проведення нарізного остеотомічного шляху, інстальовано 17 ультракоротких ($h = 5,5$ мм \times $b = 4,0$ мм) імплантатів на беззубих сегментах нижньої щелепи, відповідно до протоколу реабілітації пацієнтів. Застосували методику резонансно-частотного аналізу, одержали значення високої первинної стабільності двох коротких субкортикальних імплантатів у проєкції 4.7 зуба – 92 КСІ, у проєкції 4.6 – 90 КСІ. На третій день клінічного етапу фіксації супраконструкції виміряли РЧА, що показало суттєве зниження коефіцієнта стабільності у встановлених імплантатах: у

проекції 4.7 зуба – 61 КСІ, 4.6 – 74 КСІ. Такий результат спричинив необхідність переглянути план реабілітації, скорегувати листок лікарських призначень; крім того, ухвалили рішення про відтермінування етапу встановлення реставраційної суцільно фрезерованої конструкції на імплантати.

Висновки. Дослідження РЧА – індикатор не лише первинної стабільності імплантатів, але й повноцінного етапного клінічного прогнозу наступної функціональності протезної конструкції з опорою на короткі імплантати з належним збереженням морфологічної функціональності кісткової тканини.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 70-75

With the development of science and technology, minimally invasive research methods are becoming available. The implementation of these methods in practical medicine is taking place to rehabilitate patients with severe bone atrophy, taking into account its morphological characteristics and the laying of important anatomical structures. While earlier there were discussions about the feasibility of using short implants [1] to reduce the amount of surgical intervention and possible iatrogenic effects on the structures of the mandibular canal(s) [2,3,4], today ultra-short implants are widely used, which can receive loads with their distribution to bone tissue and fully restore the chewing efficiency of edentulous jaws [5,6,7].

In order to use the immediate loading technique, especially on short ($h = 5.5$ mm) implants, it is necessary to understand their primary stability in the morphological environment, which can change dynamically under the influence of factors of internal and external space. This implies that bone density, studied using computed tomography software, is not a stable phenomenon, i. e., it is also dynamic [8,9]. Although this method is characterized by its minimally invasive nature, it does not provide adequate predictions for determining the primary stability of the implant, even with high bone density in both layers. After all, high density can be provided by an auto-, allo-, or xenograft whose augmentation is formed from a solid base and has not undergone remodeling stages in time or for other reasons. Densitometric analysis can give a false impression of primary stability. This is unacceptable in the choice of rehabilitation methods with short and ultra-short implants taking into consideration the topographic features of the mandibular canal(s).

One of the reliable diagnostic methods is resonance frequency analysis (RFA). For the first time after many years of work, it was described by the progressive researcher Meredith in 1996 (Integrative Diagnostics, Sweden) for odontological intraoral use. The gradual improvement of resonance frequency analysis techniques has created modern diagnostic systems that have become a priority for dental surgeons to determine the primary stability of implants. The RFA study provides a prognosis not only for the further functionality of the implant-supported prosthetic structure but also for the proper physiological processes in the bone tissue with the preservation of its morphological functionality [10].

Aim

To highlight the role of resonance frequency analysis during surgical interventions using short (ultra-short) implants in predicting their primary stability and preserving the normal morphology of the mandibular bone tissue.

Materials and methods

The post-implantation stability of seventeen short and ultra-short implants was analyzed in seven patients with loss of the masticatory group of teeth, with mixed bone atrophy of the collar part and the body of the mandible acquired in different time intervals. The obtained values of high (92 ISQ) primary stability of two short subcortical implants placed on the edentulous segment of the human mandible on the right side of seven subjects did not provide a prognosis of its rehabilitation, taking into account the individual anatomical and topographic features of the canal(s), which we present in a detailed description of the clinical case as the results of this work.

The primary stability of implants was determined using the Penguin Instruments resonance frequency analysis (RFA) technique in declarative units of measurement – the implant stability quotient (ISQ). Values in the range of 75 ISQ meant that a short 6.5 mm implant (ultra-short 5.5 mm) was already so stable that it could receive and distribute the immediate load on the bone tissue of the edentulous segment. The evidence of such stability is the absence of a drop in ISQ within 14 days or a change in the range no more than 1–5 ISQ in the initial rehabilitation period.

Resonance frequency analysis was performed following the stated instructions of the above technique, with strict adherence to the methodological sequence, which requires attachment of the MulTipeg™ to the implant and its subsequent vibration due to the received wave of magnetic pulses generated by the device. The device measures the vibration frequency due to the rigidity in the contact zone between the bone and the implant surface and converts it into a scale value from 1 to 99 ISQ. The higher the ISQ is, the better its stability is. RFA measures implant stability as a function of boundary rigidity, which correlates with implant displacement, i. e., micro-mobility.

This work is a fragment of a clinical experiment of the planned research topic “Substantiation of rehabilitation of patients with bone atrophy complicated by topographic and anatomical features of the mandibular canal”, with mandatory review by the Biomedical Ethics Commission of Bukovinian State Medical University and approval in the form of Protocol dated 21.10.2021 No. 2. The clinical experiment was conducted after patients familiarized themselves with and signed informed consent to participate in research in compliance with the main provisions of the GCP (1996), the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine (dated 04.04.1997), the World Medical Association Declaration of Helsinki on ethical principles for conducting scientific medical research involving human subjects (1964–2013), order of the Ministry of Health of Ukraine dated 23.09.2009 No. 690.

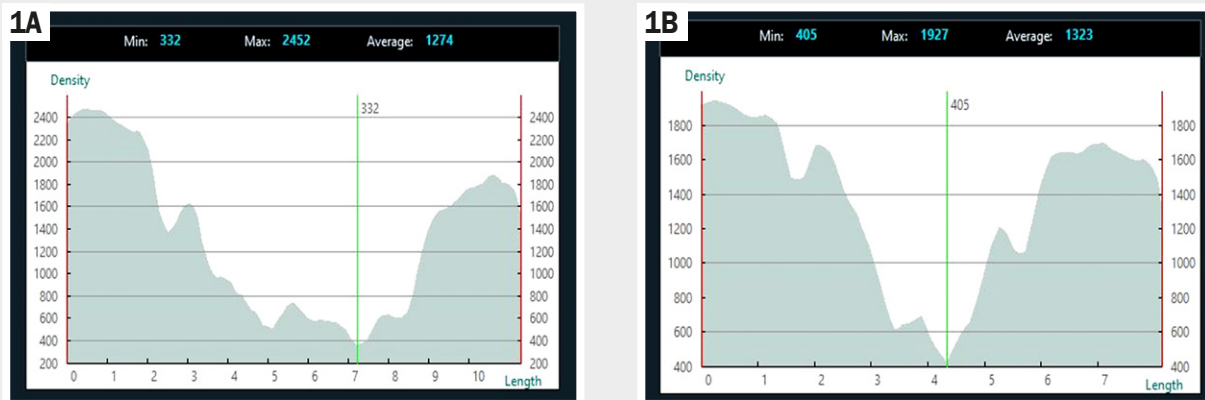


Fig. 1. Densitometric analysis of the bone tissue of the edentulous segment of the mandible on the right side at the stage of planning surgical interventions. **A:** projection of tooth 4.7; **B:** projection of tooth 4.6.

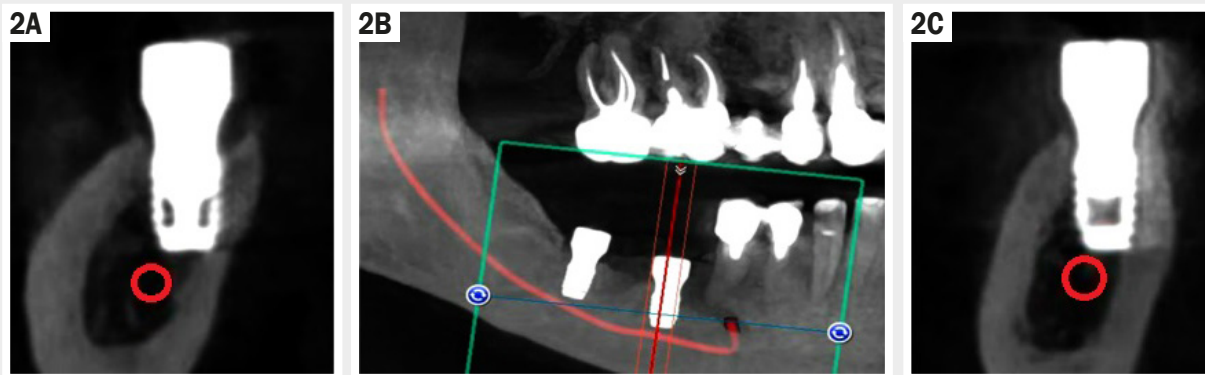


Fig. 2. Computed tomographic analysis after subcortical implant placement. **A:** Sagittal section showing the placed implant and gingival former in the projection 4.7 of the missing tooth with the marking of the mandibular canal; **B:** 2D image of the upper and lower jaws with the reconstruction of the mandibular canal and design of occlusal relations of the supraconstructions; **C:** Sagittal section showing the implant and gingival former in projection 4.6 of the missing tooth with the marking of the mandibular canal.

Results

Preliminary studies of the bone density of the acquired defect of the dentition on the right side of the mandible in projections 4.7 (Fig. 1A) and 4.6 (Fig. 1B) of the missing teeth showed high values with average values of 1274 conventional gray units (CGU) and 1323 CGU. The lowest mineralization in the trabecular layer was 4.7 + 332 CGU in the projection and 4.6 + 405 CGU in the projection. Such indicators give the right to draw up an initial plan for using the immediate loading protocol on implants.

To choose the implantation method, it is necessary to understand the topographic features of the mandibular canal and take into account its possible morphological variants, which determine the use of the proper size of the implants themselves and their positioning in the jaw body with the subsequent functional reproduction of the occlusal relations of the dentition, due to the superstructural elements.

Considering the above analysis, we chose a protocol for rehabilitating patients using subcortical implants with dimensions $h = 5.5 \text{ mm} \times b = 4.0 \text{ mm}$. Carefully observing the stages of preparation, without performing an incisional osteotomy path, these implants were placed on the edentulous segment on the right side of the mandible, and we used the method of resonance

frequency analysis to obtain a value of high primary stability of two short implants, in the projection of the 4.7 tooth – 92 ISQ and the projection of the 4.6 – 90 ISQ. Before the end of the operation, gingival formers of the corresponding standard system with a force of 15 N were installed, which were moved out of the occlusal relationship by 4–6 mm (Fig. 2).

On the 3rd day, a repeated resonance frequency analysis was performed, which showed a significant decrease in the stability quotient of the implants in the projection of tooth 4.7 – 61 ISQ and in tooth 4.6 – 74 ISQ. This result made it necessary to revise the rehabilitation plan, adjust the medical prescription sheet and decide to postpone the placement of the all-milled restorative structure on the implants.

Taking into account the subjective and objective history of the patient on day 7, after a clinical examination, the implant was found to be luxated in the projection of the 4.7 tooth, which was removed on the same day. The RFA in projection 4.6 dropped to 63 ISQ, which became a vector of alertness to the development of destructive changes. These assumptions were confirmed by the obtained values of densitometric analysis, which also differed significantly in the direction of a sharp decrease, indicating a violation of the structural organization of bone tissue compared to the

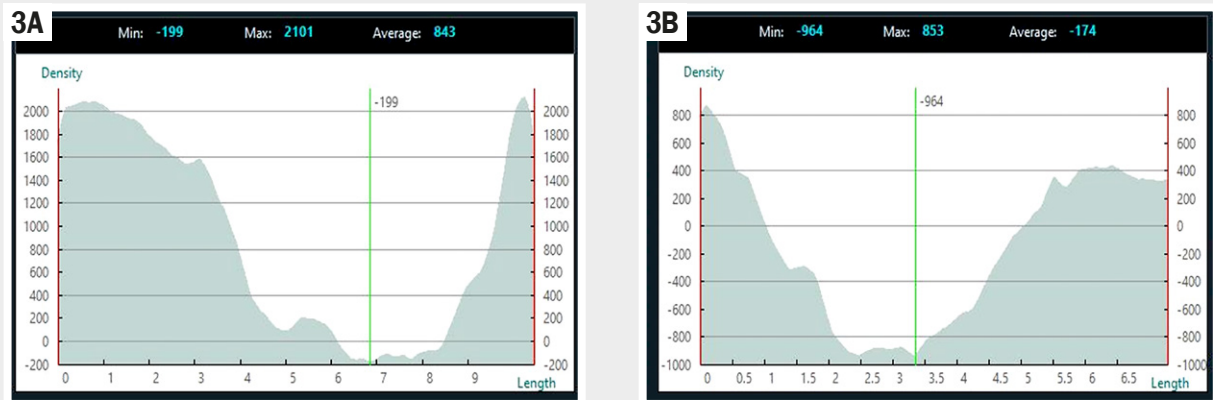


Fig. 3. Densitometric analysis of the bone tissue of the edentulous segment of the mandible on the right side, after and at the stage of implant removal. **A:** projection of tooth 4.7; **B:** projection of tooth 4.6.



Fig. 4. Radiographic control after fixation of supraconstructions on implants installed at the level of the cortical layer of atrophied bone tissue. **A:** Parallel placement of two implants and cemented prehensile fixation to analog (preparation) abutments on the left side of the mandible; **B:** Bilateral rehabilitation of a patient with final dentition defects, short and ultra-short implants, taking into account the topographic features of the mandibular canal; **C:** Divergent placement of two implants and cement prehensile fixation to analog (preparation) abutments on the left side of the mandible.

primary. In area 4.7 of the removed implant, the minimum density value was negative (-199 CGU), and on the proximal side of the bone implant bed 4.6, which corresponds to the largest zone of the lumen, it was (-964 CGU), indicating the active development of destructive processes in the distal direction of the edentulous segment of the mandible body (Fig. 3).

Due to complications and the lack of effect of anti-inflammatory and antibacterial therapy, based on the indicators of a decrease in the implant stability quotient (ISQ), the implant was removed in the 4.6 tooth projection with subsequent extraction of destructive trabecular islands, according to the operation protocols.

Discussion

ISQ values determine localized bone density and depend on clinician's compliance with implant placement techniques, implant design, and post-implant wound healing time. Implants with low and/or decreasing ISQ values pose an increased risk of rejection compared to implants with high and/or increasing values, as stated by the product manufacturer and, accordingly, the developer of this resonance frequency analysis (RFA, Meredith) technique.

Following the recommendations of the developer of the RFA technique, when determining the stability of an implant with values

above 70 ISQ, it is recommended that the clinical choice be made to use the one-stage or immediate loading technique. However, we did not take into account the design of the implants, which have a sloping shoulder, designed for subcortical crosslinking and the creation of a reliable rigid tissue barrier that provides long-term and stable protection not only from the external environment but also provides long-term and reliable stability of the implant, due to the high mineralization of the cortical layer.

Of course, medium and long implants $h > 7.0$ mm have an additional intercostal contact area, which compensates for the above-mentioned characteristic of the implant design. After all, ensuring osteointegration processes over time adds complete stability and functionality to the implant structure, which is ineffective for short subcortical implants $h = 5.5$ mm.

The preparation protocol provides a suitable cylindrical-conical implant bed concerning the size of the selected implant, and the formed space (distance) between its shoulder and the cortical layer of bone tissue significantly reduces stability during functional action, which cannot be stated in our case. After all, the implants have not yet been subjected to immediate loading.

Implants placed at the cortical layer's level are characterized by an extended external cone design and have an additional high primary stability due to their resistance to remodeling the

cortical layer of bone tissue. We prove this statement in the application of clinical protocols for the installation of (ultra-short) implants at the level of the cortical layer as a method of choice, taking into account the topographic features of the mandibular canal(s) in the case of bone atrophy and rapid (immediate) rehabilitation of patients, up to seven days, with the loss of the masticatory group of teeth, as shown in the images in Fig. 4. Their values were stable at all stages of the rehabilitation period and ranged from ± 7 ISQ.

The development of modern artificial intelligence technologies makes it possible to successfully implement a preclinical plan during controlled surgical interventions, including dental implantation, with proper primary stability [11]. However, it is programmatically impossible to determine the stability of implants as an indicator of their further functionality at the clinical stages – before fitting and fixation of the supraconstructions.

Presented as an electronic poster at the 2019 Annual Session of the American College of Orthopedic Surgeons in Miami, Florida, the authors' work was awarded second place for innovative research and offered a universal, non-odontic, open source program, 3D Slicer/Blender, which can be used to plan and perform a controlled implant placement operation taking into account the morpho-topographic features of the jaw structures, minimizing errors in the formation of the implant bed and, in fact, their angulation [12]. However, the lack of the possibility of applying it in the staged clinical analysis of implant stability requires additional paraclinical targeted research methods.

Modern original research aimed at achieving implant positioning accuracy, especially angular deviation, through introducing the THETA robotic system indicates that such achievements may become promising tools in dental implantation in the future. Nevertheless, further clinical analysis and research are needed to evaluate the current results [13].

A new view of the implementation of digital surgical templates provides a prediction of the primary stability of implants. It negates the use of navigation sleeve systems designed to create accurate osteotomy paths and, accordingly, the primary stability of implants. It lacks further clinical analysis of the course of early dynamic processes of bone tissue that may affect their functionality [14, 15].

Another factor for studying the subject of resonance frequency analysis and its application in odontological clinical practice is the overall ergonomic efficiency, simplicity of the technique, lack of consumables, and seconds of analysis time.

Conclusions

1. The pressure created during implant placement in high-density bone tissue, without an incisional osteotomy path, increasing the force from 75 N to “ ∞ ” from the value of the primary implant stability of 92 ± 8 ISQ, can lead to a temporary cessation of even diffuse nutrition and promote phagocytic activity in the dense trabecular layer of bone tissue and be considered as a patho-etiological factor.

2. Resonance frequency analysis is a priority and reliable technique, an effective indicator of the primary stability of short (ultra-short) implants at all stages of clinical rehabilitation of patients.

Prospects for further research include the study of possible morphological and histological changes in bone tissue around the installed short and ultra-short implants using the immediate loading technique.

Information about the authors:

Oshurko A. P., MD, PhD, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-3838-2206](https://orcid.org/0000-0002-3838-2206)

Oliinyk I. Yu., MD, PhD, DSc, Professor of the Department Pathological Anatomy, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-6221-8078](https://orcid.org/0000-0002-6221-8078)

Kuzniak N. B., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-4020-7597](https://orcid.org/0000-0002-4020-7597)

Herasym L. M., MD, PhD, Assistant of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0002-5902-6091](https://orcid.org/0000-0002-5902-6091)

Відомості про авторів:

Ошурко А. П., д-р філософії, докторант каф. хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії, Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна.

Олійник І. Ю., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії, Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна.

Кузніак Н. Б., д-р мед. наук, професорка, зав. каф. хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії, Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна.

Герасим Л. М., канд. мед. наук, асистентка каф. хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії, Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці, Україна.

References

1. Kim SY, Ku JK, Kim HS, Yun PY, Kim YK. A retrospective clinical study of single short implants (less than 8 mm) in posterior edentulous areas. *J Adv Prosthodont.* 2018;10(3):191-6. doi: [10.4047/jap.2018.10.3.191](https://doi.org/10.4047/jap.2018.10.3.191)
2. Loskutov OY, Shponka IS, Bondarenko OO, Bondarenko NS, Bozhko AG. Histological and histochemical assessment of short-term events in peri-implant bone for osteoinductivity evaluation of functional-protective implant coatings. *Medychni perspektvy.* 2021;26(3):4-10. doi: [10.26641/2307-0404.2021.3.241875](https://doi.org/10.26641/2307-0404.2021.3.241875)
3. Dharmapala RMAU, Satharasinghe DM, Silva SPI, Jeyasugithan J. Medical Physics Determination of safe zone of the mandible for implant and bone harvesting (using CBCT) of mandible in a group of Sri Lankan subjects. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka,* 2022;50(1):65-72. doi: [10.4038/jnsfr.v50i1.10485](https://doi.org/10.4038/jnsfr.v50i1.10485)
4. Oshurko AP, Oliinyk IYu, Kuzniak NB. Morphological significance of bone atrophy for topographic features of the left mandibular canal. *World of Medicine and Biology.* 2021;(4):131-5. doi: [10.26724/2079-8334-2021-4-78-131-135](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2021-4-78-131-135)
5. Testori T, Clauser T, Scaini R, Wang HL, Del Fabbro M. Long-Term Results of Intraforaminal Immediately Loaded Implants and Posterior Mandibular Regrowth Evaluation in Severely Atrophic Mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2022;37(1):199-207. doi: [10.11607/jomi.9077](https://doi.org/10.11607/jomi.9077)
6. Ewers R, Marincola M, Perpetuini P, Morina A, Bergamo ETP, Cheng YC, et al. Severely Atrophic Mandibles Restored With Fiber-Reinforced Composite Prostheses Supported by 5.0-mm Ultra-Short Implants Present High Survival Rates Up To Eight Years. *J Oral Maxillofac Surg.* 2022;80(1):81-92. doi: [10.1016/j.joms.2021.09.018](https://doi.org/10.1016/j.joms.2021.09.018)
7. Amato F, Polara G, Spedicato GA. Immediate Loading of Fixed Partial Dental Prostheses on Extra-Short and Short Implants in Patients with Severe

- Atrophy of the Posterior Maxilla or Mandible: An Up-to-4-year Clinical Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(3):607-15. doi: [10.11607/jomi.7943](https://doi.org/10.11607/jomi.7943)
8. Fastovets OO, Sapalov SO, Shtepa VO. [Results of stress-strain states study in prosthetics of different types of atrophy of edentulous mandible]. *Medychni perspektyvy*. 2020;25(4):146-58. (Ukrainian). doi: [10.26641/2307-0404.2020.4.221411](https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.4.221411)
 9. Bouchard AL, Dsouza Ch, Julien C, Rummler M, Gaumont M-H, Cermakian N, et al. Bone adaptation to mechanical loading in mice is affected by circadian rhythms. *Bone*. 2022;(154):116218. doi: [10.1016/j.bone.2021.116218](https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116218)
 10. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Miki M, Nakajimaa Y, Babaa S. Trends in clinical trials on bone regeneration in dentistry-towards an innovative development in dental implant treatment. *J. of Oral Science & Rehabilitation*. 2019;5(4):8-17. Available from: <https://www.dtscience.com/wp-content/uploads/2020/01/>
 11. Mangano FG, Admakin O, Lerner H, Mangano C. Artificial intelligence and augmented reality for guided implant surgery planning: A proof of concept. *J Dent*. 2023;133:104485. doi: [10.1016/j.jdent.2023.104485](https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104485)
 12. Talmazov G, Bencharit S, Waldrop TC, Ammoun R. Accuracy of Implant Placement Position Using Nondental Open-Source Software: An In Vitro Study. *Journal of Prosthodontics*. 2020;29(7):604-10. doi: [10.1111/jopr.13208](https://doi.org/10.1111/jopr.13208)
 13. Chen J, Bai X, Ding Y, Shen L, Sun X, Cao R, et al. Comparison the accuracy of a novel implant robot surgery and dynamic navigation system in dental implant surgery: an in vitro pilot study. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):179. doi: [10.1186/s12903-023-02873-8](https://doi.org/10.1186/s12903-023-02873-8)
 14. Adams CR, Ammoun R, Deeb GR, Bencharit S. Influence of Metal Guide Sleeves on the Accuracy and Precision of Dental Implant Placement Using Guided Implant Surgery: An In Vitro Study. *J Prosthodont*. 2023;32(1):62-70. doi: [10.1111/jopr.13503](https://doi.org/10.1111/jopr.13503)
 15. Abduo J, Lau D. Seating accuracy of implant immediate provisional prostheses fabricated by digital workflow prior to implant placement by fully guided static computer-assisted implant surgery: An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32(5):608-18. doi: [10.1111/clr.13731](https://doi.org/10.1111/clr.13731)

Use of metabolites, metabolitotropic agents and nutritional supplements in sports and sports medicine: a modern view on the problem

I. F. Bielenichev  *^{1,A,C,D,F}, N. A. Gorchakova  ^{2,B,E}, E. Yu. Doroshenko  ^{1,B,E}, I. B. Samura  ^{1,B,D},
V. P. Ryzhenko  ^{1,B,D}, N. V. Bukhtiarova  ^{1,B,E}

¹Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine, ²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

sports, sport training, metabolite agents, metabolitotropic drugs, nutritional supplements.

Ключові слова:

спорт, тренувальний процес, метаболітні препарати, метаболітотропні препарати, харчові добавки.

Надійшла до редакції /
Received: 31.07.2023

Після доопрацювання /
Revised: 12.09.2023

Схвалено до друку /
Accepted: 20.09.2023

Конфлікт інтересів:
відсутній.

Conflicts of interest:
authors have no conflict of interest to declare.

***E-mail:**
i.belnichev1914@gmail.com

Aim. The purpose of this study was to conduct an up-to-date semantic analysis of the results of our own research and literature data on the medical and pharmacological characteristics of metabolites, metabolitotropic agents and nutritional supplements, the peculiarities of their use in sports practice and sports medicine.

Materials and methods. This study used bibliosemantic, analytical, logical, and generalization methods. The life sciences and biomedical information bibliographic databases MEDLINE, EMBASE, Medline (PubMed), Web of Science, and Cochrane Central were searched to find publications in English that matched the research keywords. The authors carried out an independent search and selection of articles, assessment of the quality of the data, compliance of the presentation and interpretation with the main idea of the study, with the formation of the final list of references.

Results. Based on the analysis of modern literature data and the results of our own studies, a generalized medical and pharmacological characteristic of metabolite agents, metabolitotropic drugs and nutritional supplements that can influence the main and compensatory mechanisms of macroergic phosphates production under the influence of physical activity is presented. The mechanisms of action, indications for use and main side effects of drugs and food additives based on ATP, malate, succinate, citrate, pyruvate, carnitine, carnosine, etc. are presented.

Conclusions. Semantic analysis data indicate that an urgent problem for sports medicine physicians and pharmacologists is the development and use of metabolites, metabolitotropic agents and nutritional supplements, as well as approaches to their rational combination to improve energy metabolism, replenish ATP reserves in the body that will help ensure the intensity muscular activity and simultaneously protect target organs.

Modern medical technology. 2023;(4):76-88

Застосування метаболітних, метаболітотропних препаратів і харчових добавок у спорті та спортивній медицині: сучасний погляд на проблему

I. Ф. Беленічев, Н. А. Горчакова, Е. Ю. Дорошенко, І. Б. Самура, В. П. Риженко, Н. В. Бухтіярова

Мета роботи – надати актуальний семантичний аналіз результатів власних досліджень і відомостей фахової літератури щодо медико-фармакологічних характеристик метаболітних, метаболітотропних фармакологічних препаратів і харчових добавок, а також особливостей їх використання у спортивній медицині.

Матеріали та методи. Під час дослідження використали бібліосемантичний, аналітичний, логічний методи, а також метод узагальнення. У бібліографічних базах даних наук про життя та біомедичної інформації MEDLINE, EMBASE, Medline (PubMed), Web of Science і Cochrane Central здійснили пошук англійських публікацій, що відповідають ключовим словам дослідження. Здійснили самостійний пошук і відбір статей, оцінювання якості даних, відповідності викладу та інтерпретації основній ідеї дослідження, сформували остаточний список літератури.

Результати. На основі аналізу відомостей сучасної фахової літератури, а також власних досліджень дали фармакологічну характеристику метаболітним, метаболітотропним препаратам і харчовим добавкам, що можуть впливати на основні механізми та компенсаторні шунти продукції макроергічних фосфатів під час тренувального процесу та фізичних навантажень. Наведено механізми дії, показання до застосування й основні побічні ефекти препаратів і харчових добавок на основі АТФ, малату, сукцинату, цитрату, пірувату, карнітину, карнозину тощо.

Висновки. Зважаючи на результати семантичного аналізу, актуальним завданням для спортивного лікаря та фармаколога є розроблення метаболітотропних препаратів і харчових добавок, а також підходів до їх раціонального комбінювання для покращення енергетичного обміну, поповнення запасів АТФ в організмі, що сприятиме забезпеченню інтенсивності м'язових скорочень та одночасному захисту органів-мішеней.

Сучасні медичні технології. 2023. № 4(59). С. 76-88

An urgent problem of modern sports science is the development and use of adequate pharmacological support to ensure and increase the parameters of the physical performance of athletes, accelerate the processes of adaptation of their body to high-intensity physical activity, prevent overtraining and sports injuries. In this context, pharmacological support of sports activity is a correction of functional adaptation capabilities, allowing to expand the body's ability to adapt to the maximum loads of high-performance sports [1]. The rational use of pharmacological and non-pharmacological agents in various periods of the training and competitive process contributes to the achievement of the highest possible sports results [2].

Currently, in the practice of pharmacological support of sports activities, two groups of non-doping pharmacological agents and food additives are widely used. These are pharmacological and non-pharmacological agents necessary for the rehabilitation of athletes after overtraining or illness, and agents that enhance the adaptation of athletes to physical activity (accelerate the recovery process and increase physical performance) [3].

The development of sports pharmacology has put experts before choosing a huge number of agents and nutritional supplements with various chemical structures, different (sometimes insufficiently known) mechanisms of action and unidentified adverse reactions [4]. All of the above can not only reduce the effectiveness of sports training, but also harm the health of the athlete.

Aim

This study aims to conduct an up-to-date semantic analysis of the results of our own research and literature data on the medical and pharmacological characteristics of metabolites, metabolitotropic agents and nutritional supplements, the features of their use in sports practice and sports medicine.

Materials and methods

This study used bibliosemantic, analytical, logical, and generalization methods. The life sciences and biomedical information bibliographic databases MEDLINE, EMBASE, Medline (PubMed), Web of Science, and Cochrane Central were searched to find publications in English that matched the research keywords.

The authors carried out an independent search and selection of articles, assessment of the quality of the data, compliance of the presentation and interpretation with the main idea of the study, with the formation of the final list of references [5].

Results

The main principles of pharmacological support of sports training are as follows:

- acceleration of recovery processes after training and competitive loads should be achieved by creating optimal conditions (including with the help of pharmacological agents) for their natural course;
- when prescribing pharmacological medicines, it is necessary to understand the purpose for which they are used, mecha-

nisms of their action and, on this basis, determine the nature of their influence on the effectiveness of the training process, as well as contraindications for use, possible complications, and the results of the interaction of some agents with others;

- taking into account urgent, remote and cumulative effects of pharmacological agents;
- differentiated influence on the parameters of physical performance: power, capacity, efficiency, mobilization and implementation;
- the degree of efficiency depending on the qualification level, the initial functional state of the body, the period of the training cycle, the energy nature of the current training and upcoming competitive loads [6,7].

Based on the above principles, the following variant of the classification of metabolite and metabolitotropic pharmacological agents, and nutritional supplements used in the practice of pharmacological support of sports training is proposed [8]:

1. Agents providing increased demands of the body in the main food ingredients (vitamins, amino acids, etc.) under conditions of intense muscular activity [9];
2. Artificially stimulating recovery processes after significant physical exertion by accelerating the excretion and binding of metabolic products (medicines that improve renal blood flow, amino acids, metabolites, hepatoprotectors) [10];
3. Improving adaptation to training and competitive loads due to:
 - reducing the formation of toxic metabolites (antioxidants) during intense muscle activity [11];
 - decreasing the injuring effect of these metabolites (antihypoxants and metabolites of plastic metabolism) [12];
 - preservation and urgent restoration of ATP reserves (substrates and metabolites of energy metabolism, macroergs, antihypoxants, mitoprotectors);
 - activation of stress-limiting systems (amino acids, antioxidants, regulators of transcription factors) [13].

Below is a brief description and the main mechanisms of action of these drugs.

Adenyl nucleotides are high-energy compounds that act as carriers of ATP phosphoryl groups, which is necessary for various reactions, including the synthesis of proteins and nucleic acids, and which serves as an energy source during muscle fiber contraction, and ensures the work of transmembrane ion pumps. The therapeutic efficacy of ATP is a result of its direct effect on purine receptors. ATP also takes part in the processes of neuromuscular transmission of impulses, acting as a modulator of synaptic transmission. At the same time, negative myotropic and chronotropic effects of adenosine and stimulation of glycogenolysis in the myocardium are the main factors that protect the myocardium from damage during intense muscle activity [14].

ATP-long is an original agent, a coordination compound used for optimization of the training process of highly qualified athletes [15]. The drug was synthesized in such a way that the macroergic phosphate, the amino acid histidine, magnesium and potassium salts included in its composition are coordinated, and its molecules are easily integrated into various metabolic processes due to structural similarity with cell membrane receptors. ATP-long produces the following pharmacological effects:

- cardioprotective action under conditions of ischemia and working hypoxia;
- increase of energy resources at the cellular level;
- inhibition of oxidative stress;
- increase in activity of ion transport systems, Na⁺/K⁺- and Ca²⁺-ATP-ases, and calcium-binding potential of cell membranes;
- normalization of potassium and magnesium levels in the myocardium;
- improvement of indicators of central and peripheral hemodynamics, coronary blood flow;
- optimization of the left ventricle functional state under conditions of ischemia and increased myocardial oxygen consumption [15].

The ergogenic properties of nutritional supplements containing ATP are manifested exclusively with a course intake, starting with a dose of 400 mg per day, and in combination with constant strength training loads. ATP in a single oral dose in the dose range of 150–225 mg/day has a weak ergogenic effect in the development of strength abilities. Dietary supplementation of ATP at a dose of 400 mg daily for 15 days has been shown to reduce muscle fatigue and increase performance in repetitive exhaustive exercise cycles by improving low-intensity movement performance. This can lead to an increase in the overall level of physical fitness. The ergogenic effect of a 12-week-long intake of ATP at a dose of 400 mg/day in combination with high-intensity regular power loads is universal: an increase in the strength abilities and power of skeletal muscles (from 30 % and above); hypertrophy of muscle fibers; inhibition of protein breakdown under the influence of physical activity; reduction of subjective feeling of fatigue at later stages of stress factor action; increased post-exercise blood flow to skeletal muscle, which may be responsible for reducing muscle fatigue and preventing loss of muscle strength during repeated cycles of high-intensity exercise [16].

In the initial (early) stages of physical activity, ATP dietary supplements have the potential to increase muscle excitability, and in the later stages (at the end of the loading period) to prevent its decrease [17]. Such properties of the oral form of ATP may be of the greatest practical importance in team sports (for example, basketball, football, hockey, etc.). The use of high doses of ATP in course use for a period of 14 days to 12 weeks is not only effective, but also safe.

The ergogenic effect of taking ATP food supplements develops not because of an increase in blood ATP levels due to an external source, but due to the inclusion and progressive increase in the synthesis of endogenous ATP as a response to biochemical signals from receptors on the outer surface of cell membranes. Such a signaling mechanism for stimulating endogenous ATP synthesis is polymodal and, theoretically, may include the following [18]:

1. “Gut-muscle axis” known in the scientific literature (gut-skeletal muscle axis) – the concept in which the processes occurring in the intestine activate/inhibit tissue metabolic processes in a neurohumoral way, including energy ones in muscle fibers;
2. Activation of purinergic receptors on the membrane of muscle cells by ATP metabolites, stimulation of intracellular processes of nucleotide synthesis, acceleration of anabolic reactions during the course intake of ATP. The implementation

of these trigger mechanisms occurs only under conditions of intense physical activity with all the accompanying physiological and biochemical changes in the body (hypoxia, sensitization of a number of receptor processes, etc.).

The universal character of the ergogenic action of dietary ATP supplements has served as the basis for the creation of combined forms of ATP with other pharmacological nutrients, such as beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and its free acid form (HMB-FA); leucine, isoleucine and valine (2:1:1); L-carnitine and electrolytes to enhance ergogenic properties. The combination of ATP with HMB has the highest degree of evidence [19].

The combined use of HMB-FA (3 g/day) and ATP (400 mg/day) for 12 weeks in high-class athletes in combination with systemic strength training has a pronounced anabolic effect, improves strength and power of skeletal muscles. These effects are complemented by the ability of this combination to prevent muscle strength decline and even ensure its further growth under conditions of extreme physical cyclic loads. The ergogenic properties of the combination of HMB-FA and ATP can be used in the training and competitive activities of professional athletes.

ATP-propionyl-L-carnitine. Food supplement based on L-carnitine derivative (propionyl-L-carnitine – PLC) and ATP. Biochemical studies have shown that PLC increases the levels of ATP in the body, including in the myocardium [20]. It is recommended to take one capsule twice daily on an empty stomach. At the same time, as noted above, the effective dose of ATP is at least 400 mg per day, which should be taken into account by sports medicine physicians and coaches.

Ready forms of ATP with electrolytes. AIM Peak Endurance® commercial ready-to-use blend is based on the same form of ATP, PEAK ATP®. The finished mixture contains, in addition to 200 mg of ATP, the main electrolytes (sodium, potassium, chlorine, calcium, magnesium, phosphorus) with the addition of vitamins C and group B: B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ and B₁₂. Thus, two recommended servings of AIM Peak Endurance® per day provide 400 mg of ATP required for ergogenic action in combination with essential minerals and vitamins. Magnesium is a key component of more than 300 enzymes including ATPase and enzymes involved in the metabolism of muscle glucose and glycogenesis [7].

Magnesium ions, a natural antagonist of calcium ions, provide a negative inotropic effect on the myocardium, thereby reducing its oxygen consumption; reduce peripheral resistance by reducing the tone of smooth muscle structures of blood vessels. Magnesium also inhibits the processes of deamination and dephosphorylation. Potassium ions maintain osmotic and acid-base homeostasis of cells, take part in providing a transmembrane potential (electrical gradient), and activate the synthesis of ATP and creatine phosphate. This powder composition meets the modern requirement for polyionic solutions to compensate for the loss of water and electrolytes (compensation not only for sodium, potassium and chlorine) in the training and competitive process.

It is recommended to take one rounded scoop (8.33 g) of the mixture, diluted in 100–200 ml of water, twice daily, on an empty stomach and before meals. The standard dose of 300 g of the mixture (*package*) after dilution gives an average of 21 liters of the finished drink.

Phosphocreatine (Creatine phosphate, Neoton), the phosphorylated form of creatine, is a key substrate in the system of macroergic compounds transport to their disposal sites, where it plays a critical role as a rapidly acting energy buffer for muscle cell actions like contractions via its ability to regenerate ATP from ADP. Phosphocreatine improves myocardial energy metabolism, intracellular energy transport, and inhibits the destruction of the sarcolemma of ischemic cardiomyocytes [18]. Phosphocreatine stimulates microcirculation, reduces the size, and prevents the expansion of the zone of necrosis and ischemia. Under conditions of ischemia and postischemic reperfusion injury, Neoton exhibits an antiarrhythmic effect: it suppresses the ectopic activity of the ventricles without disturbing the conduction of the Purkinje fibers.

Biochemical mechanisms of phosphocreatine action [21] include:

1. Inhibition of platelet aggregation by removing ADP during the extracellular creatine kinase reaction;
2. Phosphocreatine penetration of into cells and participation in the energy transport system by maintaining high local concentrations of ATP;
3. Inhibition of adenyl nucleotides degradation at the level of the 5-nucleotidase reaction occurring in the sarcolemmal membrane of cardiomyocytes;
4. Inhibition of the accumulation of lysophosphoglycerides in the myocardium during physical exertion and ensuring the safety of the structure of the sarcolemma of myocardiocytes;
5. Protection of cardiomyocytes membranes and skeletal muscle cells because of electrostatic interaction between the drug molecule and phospholipids in the presence of Ca^{2+} .

In sports medicine, phosphocreatine is used to prevent the development of overtraining syndrome and improve adaptation to extreme physical exertion, as well as an effective cardioprotector for hypoxic and metabolic myocardial disorders. To prevent the overtraining syndrome and improve adaptation to extreme physical conditions, phosphocreatine is administered at doses of 1–8 g in 200 ml of saline or 5 % glucose solution.

Creatine. According to the modern concept, creatine belongs, on the one hand, to the group of myostatin inhibitors, and on the other hand, to protectors of mitochondrial function. Myostatin is an extracellular cytokine most abundant in skeletal muscle which plays a critical role in negative regulation of skeletal muscle mass by inhibiting skeletal muscle cells growth and differentiation. Increasing muscle creatine through creatine supplementation may increase the availability of phosphocreatine and accelerate the rate of ATP resynthesis during and after high-intensity short training sessions. In 2007, the nine main points were formulated regarding the use of creatine supplements in sports [7]:

1. Creatine monohydrate (CM) is the most effective ergogenic supplement available to athletes in terms of increasing their ability to tolerate high intensity training and increase body weight;
2. CM has a high safety profile for an athlete with long-term use;
3. CM can serve as an alternative (with precautions and medical supervision) to potentially dangerous and prohibited by WADA steroidal drugs;
4. CM is currently the most extensively studied and clinically effective form of creatine for use as a dietary supplement to increase muscle strength and exercise capacity;

5. When combined with carbohydrates or carbohydrate / protein supplements, CM promotes creatine retention in the muscles, although the overall effect on fitness with such combinations may not be greater than the use of CM alone [17];

6. The fastest way to increase muscle creatine stores is to take a loading dose of CM of approximately 0.3 g/kg/day for 3 days followed by a maintenance (of muscle creatine stores) dose of 3–5 g per day. Taking smaller doses of CM (2–3 g/day) will take approximately 3–4 weeks to increase muscle creatine depot, but this regimen has less support in the scientific community;

7. Products containing creatine are available as dietary supplements and are regulated by the FDA (USA). The special law of 1994 (the Dietary Supplement Health and Education Act, DSHEA) prohibits listing specific diseases or syndromes as indications for nutritional supplements;

8. CM, as noted in several publications, has a positive effect in some clinical situations that is a separate scientific direction and requires special research.

In addition to CM, there are other nutritional supplements based on creatine such as creatine pyruvate; creatine citrate; creatine malate, creatine phosphate, and creatine orotate, as well as other combined formulations: Creatine + HMB; Creatine + Sodium bicarbonate; Chelate compound of creatine with Magnesium; Creatine + Glycerol; Creatine + Glutamine; Creatine + beta-alanine; Creatine ethyl ester; Creatine + Cinnuline extract.

Riboxin. The active substance is the purine nucleoside inosine, part of the RNA macromolecules that deliver oxygen to muscle cells, participates in the formation of ATP molecules, which provide energy for intracellular processes, including the contraction of muscle fibers. Due to the ability to increase ATP synthesis, inosine exhibits anti-ischemic, cardioprotective and actoprotective properties. The drug normalizes the heart rate, improves the oxygen regime of myocardial tissues, increases the force of heart contractions, stroke volume of blood, optimizes the cardiac cycle; activates the metabolism in heart tissues, accelerates their regeneration and reduces the risk of blood clots by reducing platelet aggregation [22].

The anabolic properties of riboxin are used to train athletes in the group of strength sports: weightlifting, powerlifting, bodybuilding etc. [23]. Riboxin promotes an increase in the ratio of "protein – free amino acids" and the inclusion of amino acids in protein synthesis. Riboxin doesn't exhibit steroid hormone properties, it has an immunomodulating effect, increases interferon synthesis, positively affects tissue regeneration, accelerates wound healing, and reduces the expression of pro-inflammatory cytokines and mediators. In the training process in power sports, riboxin not only helps to increase muscle mass, but also protects the heart of athletes from overload, showing cardioprotective properties. The recommended daily dose of Riboxin is from 0.6 g (1 tablet 0.2 g thrice a day) to 2.4 g (4 tablets 0.2 g thrice a day), depending on the purpose. For cardioprotection during intensive training, 0.8 g/day (0.2 g 4 times a day) is administered. For a noticeable anabolic effect, accelerating the growth of strength abilities and muscle mass, riboxin is administered at a dose of up to 0.2–0.3 g per 10 kg of athlete's body weight. In this case, the dose is increased stepwise: 0.2 g added to each dose every 2–3 days.

Energostim is a metabolitotropic drug, which includes nicotinamide dinucleotide, cytochrome-C and inosine, which increase the contractile activity of the myocardium and prevent the development of metabolic disorders in toxic-allergic myocarditis. Energostim is used orally in tablets 600–800 mg/day or parenterally. If the drug is well tolerated, the dose is gradually increased over 2–3 days: first to 1.2 g/day (2 tablets thrice a day), then to 2.4 g/day (4 tablets thrice a day). Energostim can be given by intravenously either as a bolus or infusion (40–60 drops/min): initially 200 mg (10 ml of 2 % solution) once a day, then, if well tolerated, up to 400 mg 1–2 times a day. Intravenous (IV) injection of 200–400 mg in a single dose (10–20 ml of a 2 % solution) may be used for arrhythmias. Energostim is diluted for IV infusion in 5 % glucose solution or in isotonic sodium chloride solution.

L-carnitine, refers to agents with anabolic action, acts as the main cofactor in the metabolism of fatty acids in the myocardium, liver and skeletal muscles, plays the role of the main transporter of fatty acids into mitochondria, where they are beta-oxidized to acetyl-CoA, which is a substrate for ATP formation in the Krebs cycle [9]. L-carnitine promotes the release of metabolites and toxic substances from the cytoplasm, improves metabolic processes, increases efficiency, appetite, accelerates growth, causes weight gain, reduces the functional activity of the thyroid gland, and contributes to the normalization of basal metabolism in hyperthyroidism [24].

L-carnitine reduces the symptoms of physical and mental overstrain, produces neuro-, hepato- and cardioprotective action, lowers cholesterol levels, slows down the formation of vascular atherosclerotic plaques, helps to reduce myocardial ischemia and limit the post-infarction zone, stimulates cellular immunity, eliminates functional disorders of the nervous system in patients with chronic alcoholism and neurological diseases [25]. Carnitine produces actoprotective action by stimulating the use of fats for energy production, reducing the rate of glycogen consumption in muscles, activating the use of glucose in muscles as an energy substrate with simultaneous decline of lactic acidosis, reducing muscle fatigue and increasing endurance [15]. The optimal recommendation for carnitine is 0.5–2.0 g/day (the usual single dose is 500 mg or 750 mg thrice a day, or 1000 mg twice a day). There is no point in exceeding 2 g, as studies have not shown any benefit of higher doses. L-carnitine is taken in the morning on an empty stomach and 30 min before training. On days free from training, the drug is also taken in the morning and afternoon between meals on an empty stomach, because L-carnitine is most active in the morning hours and during physical activity.

L-lysine is an essential amino acid that takes part in all processes of assimilation and growth, promotes ossification and growth of bone tissue, stimulates cell mitosis, and supports female sexual function. L-lysine increases the affinity of inhibitory GABA receptors and has anticonvulsant, anxiolytic, neuroprotective, and stress-protective properties. L-lysine normalizes the “eNOS – iNOS” ratio and promotes endothelial protection [26], improves microcirculation and has capillary protective action, accelerates recovery processes in muscles after strength training. The modulating effect of lysine supports a positive nitrogen metabolism and the structure of muscle proteins. Muscle protection and nutrition are the two main functions of lysine in athletic training [27]. In

addition, lysine strengthens the tendon corset and the skeletal system, which reduces the risk of sports injuries and speeds recovery. Dosage: up to 1000 mg per day with meals.

Taurine, a naturally occurring sulfur-containing amino acid, called a “miracle molecule”, particularly concentrated in the brain, heart, eyes, and muscles, promotes axonal growth and transport, improves the transmission of nerve impulses in synapses. Taurine is known to have an antioxidant effect, it inhibits the processes of peroxidation and oxidative modification of proteins during exercise, and improves cognitive functions – memory, mental activity, attention, orientation, concentration, and visuospatial skills; and accelerates the reduction of neurological disorders [28]. Taurine significantly reduces hormonal and metabolic disorders during stress and exercise [29,30]; exhibits hepatoprotective properties, improves the detoxifying functions of the liver; regulates atrioventricular conduction, reduces the refractory period of the myocardium, and normalizes cardiac hemodynamics parameters during exercise [31]. In sports nutrition, the common dosage range for taurine is 400–1000 mg.

Glutamic acid is actively involved in energy, protein, and fat metabolism. The protective effect of glutamic acid is based on its influence on biosynthetic processes and an increase in muscle mass. The antihypoxic effect of glutamic acid is realized primarily at the level of energy homeostasis and changes in the metabolic properties of mitochondria [18].

Glutamic acid is actively involved in the regulation of energy metabolism since it can serve as a source of succinic acid under hypoxic conditions and trigger oxidative phosphorylation. The preventive effect of glutamic acid under hypoxic conditions is also associated with an increase in the concentration of α -ketoglutaric acid, followed by the accumulation of oxalic acid in tissues, which creates conditions for the lactate and other underoxidized metabolic products participation in the Krebs cycle.

The use of glutamic acid during hypoxia and exercise prevents the accumulation of lactate and pyruvic acid in the blood and maintains the glycogen content in the liver and muscles at higher level [32]. The antioxidant activity of glutamic acid is associated not only with its participation in the glutathione metabolism, but also with the intensive conversion of the latter through succinic semialdehyde into β -hydroxybutyric acid, that lowers cholesterol levels, and corrects acid-base balance.

Glutamic acid produces actoprotective, anabolic and cardioprotective effects. The cardioprotective action is manifested during physical exertion. The most common dosage is 10–15 g (sports dose), or 1 g per day (therapeutic dose). Calcium preparations with glutamic acid are available. Calcium and magnesium glutamate is recommended for the treatment of neuropsychiatric disorders and normalization of peripheral blood parameters [28].

Aspartic acid has a positive effect on indices of collateral coronary circulation and partial pressure of oxygen (pO_2) indicators in myocardial ischemia. The protective effect of aspartate on the body during the action of a closed space is associated with its rapid inclusion in tissue metabolism [15].

Aspartic acid can be included in the malate-aspartate energy shunt and contribute to a significant acceleration in the rate of elimination of ischemic damage indicators in organs and tissues during working hypoxia and a significant increase in the

contractile function of the heart [29]. Aspartic acid enhances the speed of interneuronal interaction and increases the rate of the reaction.

The specificity of the neurotropic action of aspartic acid is explained by the presence in the synaptic endings of enzyme systems for their synthesis and systems that ensure their release into the synaptic cleft under the influence of certain stimuli.

Aspartic acid is involved in the regulation of the endocrine system. Thus, the L-aspartic acid can be converted into the D-aspartic acid, which interacts with certain parts of the hypothalamus and enhances the secretion of gonadotropin-releasing hormone, which indirectly increases testosterone production through the expression of gonadotropin. D-aspartic acid is involved in the release of testosterone and progesterone by the testicles [33]. Aspartic acid is administered at a dose of 3 g/day orally in 2–3 divided doses for 3–5 weeks.

Thiotriazolin (morpholinium 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate; thioazotate). The drug exhibits antioxidant, anti-ischemic, and cardioprotective effects. Under conditions of acute working hypoxia, the use of thiotriazolin makes it possible to reduce the formation of lactate due to its utilization and formation of pyruvic acid, as well as activation of the malate-aspartate shunt in mitochondria [34]. Thiotriazolin normalizes the Krebs cycle, enhances ATP production in the myocardium and liver during exercise.

Thiotriazolin exhibits the properties of reactive oxygen species scavenger, inhibits lipid peroxidation reactions, stabilizes cell membranes, and enhances the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase. It is known that thiotriazolin activates the mechanisms of endogenous cyto- and cardioprotection during ischemia and hypoxia, increasing the expression of the 70 kDa heat shock protein (HSP₇₀), which prolongs the action time of hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α), and also independently maintains the expression of NAD-MDH-mx activity; thereby maintaining the activity of the malate-aspartate shuttle mechanism for a long time [35,36].

The mechanism of thiotriazolin effect on physical (including sports) performance has been studied since the 1980s. It is known that preliminary (30 min before exercise in the form of swimming or running) intraperitoneal administration of thiotriazolin (50 mg/kg) to rat produces a cardioprotective effect, increasing overall and speed physical endurance due to an increase in ATP levels in the myocardium, a decrease in lactate levels, oxidative stress inhibition and improving ECG parameters [37,38]. There are no opportunities for effective use of thiotriazolin in the practice of sports medicine at the research level. It is known that a single oral intake of thiotriazolin by cyclists-racers at a dose of 200 mg 3 hours before training contributes to a greater use of carbohydrate reserves in working muscles, increases the indicators of maximum oxygen consumption, improves aerobic efficiency, and decreases blood lactate and malondialdehyde levels [35].

L-arginine is the main source of the molecular messenger nitric oxide (NO), which is synthesized under the influence of three forms of NO synthase (NOS): two constitutional – endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS), and one inducible (iNOS). The vasodilating effect of L-arginine mediated by NO contributes to the maintenance of vascular tone, normalization of blood pressure, cardio- and systemic hemodynamics [36].

L-arginine has endothelial protective, antioxidant, cardioprotective, hepatoprotective, neuroprotective effects due to the production of NO [28]. Arginine produces an antioxidant effect due to participation in the transamination cycle and excretion of nitrogen waste products, including ammonia, urea and uric acid, which are the breakdown products of protein metabolism, from the body. The ability to synthesize urea and remove protein waste depends on the power of the cycle ornithine – citrulline – arginine. However, NO formed from L-arginine under conditions of liver pathology is rapidly destroyed by free radicals reducing the clinical efficacy of L-arginine [14].

The search for ways to enhance the protective properties of L-arginine by combining it with substances that can improve the energy supply of ischemic myocardium and increase the bioavailability of NO formed from L-arginine is of indisputable interest. These substances include thiotriazolin, which can enhance the cardio- and hepatoprotective effects of L-arginine during physical exertion [28].

The combined action of L-arginine and thiotriazolin, aimed at the synthesis, stabilization and increase in the bioavailability of NO [32,35,36], can be used in the correction of disorders, caused by NO deficiency (physical and mental fatigue, erectile dysfunction, decrease in the reaction rate, etc.).

L-arginine plays an important role in protein synthesis, increasing muscle mass, improving muscle recovery after training, accelerating injury healing and waste removal, optimizing the functioning of the immune system, and increasing the production of growth hormone [29]. Recommended doses of arginine for gaining muscle mass range from 3 g to 9 g per day. The higher the dose, the more noticeable the effect, but exceeding a dose of 10 g is not recommended. Taking the medication is started with the lowest dose and then it is gradually increased. Powder forms are dissolved in water (1 glass), tablets are taken with a glass of water.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory mediator in the nervous system producing anxiolytic, sedative, anticonvulsant, hypnotic, anti-ischemic, nootropic and vasodilator effects. GABA enhances blood circulation in the cerebral vessels that is accompanied by a decrease in the tone of arteries and arterioles, and practically does not affect venous tone, because GABA receptors are located in the cerebral vessels, in contrast to extracranial vessels [39].

Exogenous introduction of GABA improves the functional state of neurons, although it is known that only a 2 % GABA solution can penetrate the brain tissue. GABA increases ATP levels by being incorporated into a compensatory GABA shunt. As a therapeutic agent, GABA is used under the name aminalon. In addition, GABA is included in the structure of some medications such as picamilon, phenibut (noofen), pantogam [40]. The dosage of GABA is at least 2 g/day. The optimal dose is 3.75 g per day (after training). Small doses of GABA are useless, as only a small portion enters the brain through the blood-brain barrier.

GABA intake is best combined with vitamin B₆, which is a limiting cofactor in the synthesis of neurotransmitters such as dopamine, serotonin, GABA, norepinephrine, and the hormone melatonin. A moderate deficiency of vitamin B₆ can cause inhibition of neuronal GABA activity, various sleep and behavioral

disorders, increased cardiovascular risk, and a decrease in hypothalamic-pituitary hormonal secretion [8,40].

D-gluconic acid is a substrate of the pentose phosphate pathway of glucose oxidation and, after phosphorylation, turns into a phosphoric ester of gluconic acid, which is an important product of cell vital activity [41]. D-gluconic acid regulates the restoring synthesis of plastic processes and energy metabolism, has antihypoxic and antitoxic properties, enhances the properties of antioxidants, including glutathione [29]. It has immunomodulating, wound healing and regenerating activity.

The pharmacological agent **Membratron** is a representative of this class of therapeutic and prophylactic agents, the active ingredients of which are GABA and magnesium compounds of gluconic acid. Doses: 600-1000 mg per day.

Glycine, a CNS inhibitory transmitter, regulates NMDA receptor-mediated neurotransmission in the brain. Glycine produces neuroprotective, anxiolytic, hypnotic, and anti-ischemic effects [42]. Glycine can regulate cerebral circulation due to its effect on α_1 -adrenergic receptors. Glycine enhances biotransformation and excretion of products of proteins oxidative modification and other toxic products from the body during oxidative stress caused by ischemia, hypoxia, and exercise. Glycine regulates the synthesis of creatine, which is involved in muscle contraction during intense exercise and frequent training. Glycine improves well-being, boosts physical and mental energy, motivation, relieves tension and mental stress, and normalizes sleep during intense training process. Doses: 100–300 mg per day for 2–5 weeks.

N-acetylcysteine, a derivative of the amino acid cysteine, has mucolytic, detoxifying, antioxidant, and anti-inflammatory effects, utilizes reactive oxygen and nitrogen species, inhibits the initiation of oxidative and nitrosative stress. It also promotes the synthesis of glutathione, an important component of the antioxidant system and chemical detoxification of the body. It inhibits the expression of iNOS and has an anti-inflammatory effect [2,37]. N-acetylcysteine increases resistance to muscle fatigue, which allows increasing the duration of one training session during high- and low-intensity competition preparation. The daily dose is 300–600 mg.

Methionine has a lipotropic effect, promoting the synthesis of choline, the deficiency of which is associated with impaired synthesis of phosphatidylcholine; participates in the production of adrenaline and creatine; activates hormones, vitamins B₁₂, C, and B₆; increases the detoxification potential of the liver: it is used for toxic injury and liver diseases, chronic alcoholism, diabetes, and radiation pathology. Giving a methyl group, methionine stimulates the mobilization of fat from the liver and its oxidation (destruction), which leads to a decrease in the total percentage of fat in the body. Methionine reduces blood cholesterol and normalizes the balance of phospholipids/cholesterol. It has immunomodulating properties, increases body tone and promotes faster recovery after physical exertion [43]. It produces immunostimulating, antioxidant and hepatoprotective activity during physical exertion [44]. The daily dose is 1000 mg per day during active sports. Daily dosages up to 1250 mg per day are acceptable.

Tryptophan is involved in the formation of two biologically active substances that the body needs for normal functioning. Firstly, vitamin B₃ (Niacin), which is formed from tryptophan in

the liver, regulates the metabolism of fats and carbohydrates, plays an important role in the metabolism of amino acids, and takes part in redox reactions [45]. Secondly, tryptophan is a precursor of serotonin, a compound involved in many physiological processes. Serotonin acts as a neurotransmitter, affects the secretion of a number of hormones, regulates vascular tone and permeability, affects cellular immunity and controls bowel function. Most of serotonin reserves are located in the mucous membrane of the gastrointestinal tract. Tryptophan may help improve mood, normalize appetite and sleep after maximum physical exertion. Tryptophan is used at all training stages to accelerate recovery after strength training, get rid of excess fat and effectively gain muscle mass [29]. The daily dose is 600–800 mg.

Carnosine, a dipeptide beta-alanyl-histidine made up of the amino acids: beta-alanine and histidine. It is highly concentrated in muscles, heart, and brain tissues. It exhibits the properties of an active antioxidant, regulates the expression of antioxidant enzymes, and has cardioprotective and neuroprotective properties [46]. Carnosine increases myocardial contractile activity, limits the intensity of oxidative stress, anaerobic glycolysis and glycogenolysis in the myocardium under conditions of working hypoxia [47]; it exhibits a wound healing effect, accelerates reparative processes by activating fibroblast proliferation [48]. Carnosine has antiaging, retinoprotective, and immunomodulating properties [33]. The main area of use of L-carnosine is professional sports. For heavyweight athletes and bodybuilders, the substance is valuable because it provides the following biological effects: increased endurance during anaerobic loads, increased overall working power of training, and reduced rest time [49]. Carnosine is used to increase endurance during physical exertion; it is also effective in inflammatory processes; and as a wound healing and stress-protective agent [49]. The common dosage is 500 mg (1 capsule) daily with meals, and if necessary – 1000–1500 mg (2–3 capsules). Course 1–2 months. The course can be repeated 2–3 times a year.

L-carnosine provides muscle protection during increased physical exertion and helps to increase their performance; enhances contractions of tired muscles with further prolonged muscle work [22]. L-carnosine also accelerates wound healing, promotes the fusion of bone fragments after injuries [50]. Under the influence of the drug, the physical capabilities of a person increase, especially in extreme situations. L-carnosine also normalizes the function of the central nervous system and exhibits neuroprotective properties. The drug is included in the complex therapy of traumatic brain injuries, and is administered to increase concentration, improve memory, and complex thought processes. The course of treatment is 8–10 weeks. The recommended daily dose is 500 mg 1 hour before meals with a glass of clean water. If necessary, the dose may be increased to 1000 mg. Sometimes the daily dosage is 2500 mg. It all depends on the specific situation.

Nicotinamide is a catalytically active group of nicotinamide coenzymes, which plays an important role in almost all energy-dependent processes and exhibits antihypoxic, cytoprotective, and anti-ischemic effects [34]. Nicotinamide is a prosthetic group of the nicotinamide coenzymes codehydrase I (diphosphopyri-

dine nucleotide, nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) and codehydrase II (3-phosphopyridine nucleotide, NADP), which carry hydrogen and carry out redox processes associated with energy production. Nicotinamide in small doses increases glucose utilization and activates glycogenase, but at high dose levels, this effect of nicotinamide is not realized.

Nicotinamide may increase appetite and promote weight gain due to two-phase fluctuations in blood glucose and insulin levels. Despite this, the drug can be found in fat burners and pre-workout nutritional supplements. Nicotinamide normalizes insulin and glucagon levels during working hypoxia; at high dose levels, it inhibits lipolysis in adipose tissue, reduces the levels of atherogenic lipoproteins in the blood; and may reduce the atherogenic effect of steroid drugs. Nicotinamide increases the rate of mitochondrial oxidation and phosphorylation processes and leads to an increase in ATP levels in the muscles. Nicotinamide can potentiate the energotropic action of L-carnitine by regulating mitochondrial palmitic pore activity.

Nicotinamide, together with GABA, significantly increases the rate of cerebral blood flow, which leads to an improvement in the cognitive-memory functions of the CNS. Due to its positive effect on energy metabolism and mitoprotective activity, nicotinamide can be useful in bodybuilding and other sports as a substance that increases the performance of the training process [29]. Doses: 20–500 mg per day.

Succinic acid (succinate) is the most important participant in the tricarboxylic acid cycle, or the Krebs cycle. External addition of succinate activates the Krebs cycle. Succinic acid exhibits antihypoxic, anti-ischemic, cytoprotective, adaptogenic, actoprotective and antioxidant effects. Succinic acid provides efficient transport of electrons and protons into mitochondria and increases the reduction of ubiquinone [16]. The antihypoxic and anti-ischemic effects of succinic acid may be associated with the activation of succinate dehydrogenase oxidation and the restoration of the cytochrome oxidase, the key enzyme of the mitochondrial redox chain redox chain.

A combination of **sodium succinate** and **cytochrome C** is promising from the point of view of energy-tropic and anti-ischemic action. Sodium salts of succinate are effective in reducing metabolic acidosis due to intracellular oxidation with the replacement of one hydrogen molecule by sodium with the formation of bicarbonate [8, 19].

The antioxidant effect of succinates is realized due to the inhibition of the production of reactive oxygen species by energy-producing reactions of mitochondria (Castell et al., 2015). The antioxidant effect of succinate is manifested in the reduction of oxidative stress products, in particular carbonylated proteins. Succinic acid activates the synthesis of the endogenous antioxidant glutathione [51].

Succinates stimulate erythropoiesis. When using low doses about 50 mg/day, the activation of synthesis and action of adrenaline, norepinephrine and dopamine can be the leading mechanism. Due to this, succinate also has a psychostimulating, normothymic and antidepressant action, which is most pronounced in ammonium succinate. At the same time, ammonium succinate causes an acceleration of recovery after intense exercise. Succinic acid exhibits detoxifying and anti-hangover

properties, accelerating the biotransformation of acetaldehyde [52]. In sports medicine, succinic acid is used for extreme physical and psycho-emotional training and competitive loads, during the recovery period of the training process, if necessary, to produce an anti-ischemic and anti-hypoxic effects. Constant courses that gently support regulatory mechanisms should be based on doses of 50-100 mg per day; at the same time, intermittent courses (a few days of admission, a few days of rest, e. g., modes 5–2, 7–3) should be used. Sometimes the dose of succinic acid should be increased to 1–2 g. Succinic acid is administered with caution in diseases of the digestive system.

Malate is a dicarboxylic acid that provides the body with the necessary energy. During the synthesis of dicarboxylic acid, oxidative phosphorylation and ATP breakdown occur; and free energy necessary to maintain metabolic processes begins to be released. Malate has a stimulating effect on the Krebs cycle [53], that reduces the content of lactate in tissues and blood and increases energy production in cells. In addition, ATP level increases and lactic acidosis does not develop. Malate provides power to the compensatory cytosolic-mitochondrial shunt mechanism, the malate-aspartate shunt. The malate-aspartate shunt mechanism carries out the transfer of reduced equivalents formed in the cytoplasm during glycolysis to mitochondria under conditions of ischemia [8].

NADH⁺ formed in cytoplasm under conditions of low oxygen content is used to convert oxaloacetic acid to malate, which penetrates the mitochondria and participates in the transport of α -ketoglutarate [54]; in mitochondria it turns into oxaloacetic acid with the formation of NADH, available for the electron transport chain (3 ATP molecules are formed from 2 protons). Oxaloacetic acid formed from malate is converted into α -ketoglutarate and aspartate. Alpha-ketoglutarate comes from the mitochondria in exchange for malate, and aspartate is exchanged for glutamate; transport occurs due to the glutamate gradient and the high intramitochondrial glutamate-aspartate ratio. The malate-aspartate shunt provides ATP to organs and tissues under conditions of ischemia and significant physical exertion [55].

Malate-aspartate shunt is active in the heart, muscles, and brain. Due to this, malate produces antihypoxic, anti-ischemic, cardioprotective and actoprotective effects. Malate is administered for asthenic syndrome, emotional exhaustion, diabetic asthenia, asthenic syndrome in athletes due to prolonged physical exertion; severe fatigue, overwork; muscle cramps; sexual asthenia; alcohol withdrawal syndrome; pain after exercise; after heavy physical exertion, which causes overload of the body [56]; to alleviate myalgia in athletes after intense training and to correct acidosis [22]. Malate is available as Magnesium malate, Calcium malate, and Citrulline malate. The common dosage is 400–800 mg 2–3 times a day.

Citrate, a salt or ester of citric acid, creates ergogenic potential by increasing the pH gradient between blood and muscles and interacting with hydrogen ions. Citrate penetrates muscle fibers and can influence glycolysis reactions [57]. In alpine skiing, before difficult and long training tasks (two-minute descent at maximum intensity), sodium citrate should be taken to reduce the degree of muscle acidification [55]. There is evidence that citrate does not affect the amount of work performed and can lead to alkalosis.

Rehydron, a complex preparation of electrolytes with carbohydrates for oral rehydration, contains potassium chloride 2.5 g; sodium chloride 3.5 g; sodium citrate 2.9 g; and anhydrous glucose 10 g. Rehydron is administered to restore water and electrolyte balance, correct acidosis in acute diarrhea, mild and moderate dehydration (for example, loss of 3–9 % of body weight in children), with thermal injuries accompanied by impaired water and electrolyte metabolism. With a preventive purpose, rehydron is used for thermal and physical exertion, leading to intense sweating. Content of 1 sachet of Rehydron is dissolved in 1 L newly boiled water, cooled at room temperature, taken orally, or administered through a nasogastric tube.

Pyruvate is a key metabolite of carbohydrate metabolism and is involved in the Krebs cycle, a process in which cells produce energy in the form of ATP through acetylation with acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). As the body's main chemical fuel, ATP drives key vital body functions, including muscle movement.

Pyruvate is also important in other metabolic processes, including fat and protein metabolism, glycogen storage, and promotes the activation of lipolytic enzymes. Therefore, pyruvate quickly replenishes the supply of cellular fuel and contributes to energy production. Pyruvate is an intermediate in gluconeogenesis and glycogen storage. Pyruvate can be converted to alanine, an amino acid that is a source of glucose.

Calcium pyruvate is a supplement that was first introduced in the late 1990s, based on data that its administration at a dose of 16–25 g per day, together with dihydroacetone phosphate, contributed to weight loss in patients undergoing treatment for obesity. The mechanism of action of calcium pyruvate may be based on appetite suppression and/or influence on carbohydrate and fat metabolism. Calcium pyruvate is an extremely expensive supplement, so some researchers have been trying to figure out if smaller doses (6–16 g per day) can affect changes in body structure. Pyruvate salts are widely used by bodybuilders, cyclists, runners, and soccer players [22].

It has been established that pyruvate, together with L-carnitine, increase endurance during aerobic exercise by enhancing lipolysis by shifting the energy preferences of mitochondria towards fatty acids and increasing ATP production [55]. Pyruvate also increases skeletal muscle glucose transport. As an ergotropic agent, pyruvate has found use in those sports that require significant endurance including running and swimming. It has been experimentally found that pyruvate has antioxidant and anti-aging properties [58]. Pyruvate is available in 1000 mg tablets, and solution of potassium pyruvate with vitamin C is available in ampoules. Sometimes pyruvate is included in the composition of megapackets and protein complexes but the concentration of pyruvate there is insufficient for a daily therapeutic dose.

Beta-alanine, a naturally occurring amino acid, is a component of many proteins, connective tissue, it is also a part of vitamin B₅ (pantothenic acid). In the human body, beta-alanine is synthesized from carnosine. Alanine can also be converted from leucine, isoleucine and valine. In sports, beta-alanine is positioned as an ergogenic drug (along with creatine and arginine) increasing overall efficiency. Alanine can also be synthesized from branched chain amino acids such as leucine, isoleucine, and valine.

Beta-alanine supplementation is mainly administered to increase muscle endurance, improve exercise capacity, par-

ticularly when performing short bursts of high-intensity exercise. Beta-alanine effectively eliminates muscle pain after training and speeds up recovery from injuries. Beta-alanine is necessary for athletes facing anaerobic stress, including bodybuilders, as it helps to increase the intensity of training, and hence the growth of muscles. Studies have shown that beta-alanine is of no value to track and field athletes. It does not affect blood hormone levels (testosterone, cortisol) in exercising athletes [59]. It was shown that a 4-week course of taking beta-alanine had no effect on mental activity, but increased static endurance, aiming speed, and shooting accuracy. There is evidence of some positive changes and the effectiveness of the practical use of beta-alanine and various aspects of its action over the past 10 years [29] including the following:

- beta-alanine exerts its activity by increasing the concentration of carnosine in the muscles, acting as an intracellular pH buffer. A decrease in lactate content and pH correction accelerates the recovery process after exercise. To increase carnosine levels in the body, a course intake of beta-alanine at a dose of 4–6 g per day (about 4 weeks) is required;

- beta-alanine increases the efficiency of performing high-intensity physical exercises lasting more than 60 sec, and the duration of training to failure (to exhaustion);

- during physical exertion that requires a very high proportion of the aerobic pathway of energy production, beta-alanine improves the recorded performance indicators in the process of the load testing;

- beta-alanine can produce an antioxidant effect;

- taking beta-alanine supplements at doses of 4–6 g per day for 2–4 weeks improves physical fitness, with the most pronounced effect when performing tasks lasting from one to four minutes;

- beta-alanine reduces neuromuscular fatigue, especially in older people;

- when solving tactical problems performing physical exertion, beta-alanine contributes to their more successful implementation.

- the combined use of beta-alanine with other single or complex nutritional supplements may have certain advantages, subject to the sufficiency of its dose and course appointment;

- the daily dose of alanine for people involved in bodybuilding, fitness, weightlifting is 3–6 g per day (1–2 g thrice a day). The course is 8–12 weeks. People who do not lead an active lifestyle are recommended up to 1 g per day.

Many studies have shown that taking even high doses of beta-alanine is not capable of causing any health problems.

After the combined administration of beta-alanine with sodium bicarbonate or creatine, there is a moderate increase in the ergogenic effect compared with the separate use of these substances. The combination of these components in one dietary supplement to increase physical fitness can be effective if the duration of use is sufficient to increase the level of carnosine in the muscles, and the complex product is used for at least 4 weeks.

Despite some limited evidence to date, there is a consolidated view of the safety of beta-alanine when used in healthy individuals at recommended doses. Side effects (paresthesia) do not affect the result of the application, are transient and significantly reduced during course use.

Cytochrome-C has significant antihypoxic activity and anti-ischemic effect [60]. It has been shown that cytochrome-C during hypoxia contributes to the normalization of energy-producing oxidative phosphorylation, increases the endurance and performance of the body. In bodybuilding cytochrome-C is used as a special purpose food supplement that increases the rate of chemical reactions in cells.

Cytochrome-C is recommended to be taken a week before the start of the competition. Bodybuilding with increased loads has a stressful effect, and the agent, which affects the processes of tissue respiration, enhances oxidative reactions, and helps to endure physical activity without consequences for the body. Cytochrome-C is recommended for use by beginner athletes working to improve their endurance levels. It is especially effective for recovery strategies in athletes with elevated blood lactate levels [2]. In bodybuilding, the common dosage for cytochrome-C is 15–20 mg orally 4 times a day for 50 days. Parenterally, cytochrome-C is used at the end of a workout for accelerated recovery and rest of athletes, since after an increased load, the body does not have time to recover on its own before the start of the next load. In this case, 15 mg of cytochrome-C is administered intramuscularly for 10 days.

Quercetin is one of the most powerful antioxidants not only among flavonoids, but also among compounds of other groups. Quercetin is superior to alpha-tocopherol and retinol in its antioxidant properties. In the most general terms, the bioflavonoid quercetin can be characterized as a powerful antioxidant, an inhibitor of leukotriene synthesis, a complex signal conduction and realization blocker in the calcium-mobilizing phosphatidylinositol cycle, and an activator of the adenylate cyclase signaling cascade.

These mechanisms determine most of the pharmacotherapeutic effects of quercetin. It has been established that the antihypoxic effect of quercetin is directly related to its antioxidant properties [28]. It has been shown that quercetin prevents the disturbance of the body's oxidative homeostasis, which underlies the pathogenesis of hypoxic syndrome. The protective effect of quercetin has been established under the combined action of hypoxia and hyperthermia on the body [34].

Quercetin has a vasodilator property due to several mechanisms of action. At the level of vascular smooth muscle cells, quercetin prevents vasoconstriction by disrupting calcium entry into the cell. This is due to the blockade of the processes of protein kinase phosphorylation and, ultimately, the function of calcium ATPase. Acting at the level of the endothelium, quercetin inactivates the enzyme adenosine deaminase. This increases the content of endogenous adenosine in endothelial cells and leads to vasodilation. In addition, quercetin enhances endothelial production of nitric oxide, a potent vasorelaxant mediator. Possible mechanisms of the antiplatelet action of quercetin include inhibition of leukotriene synthesis, inhibition of Ca^{2+} influx into platelets, and blockade of phospholipase D [29]. The anticoagulant effect of quercetin, which manifests in the inhibition of the catalytic activity of thrombin in the fibrinogen binding reaction, may be important.

Due to its antioxidant properties, quercetin and its complexes are used in sports. Quercetin is often used in bodybuilding and included in sports nutrition. The studies showed that quercetin

increased energy expenditure in mice and improved exercise tolerance. This may indicate that quercetin can be used in fat-burning complexes, as well as to increase physical performance. Quercetin is recommended to be combined with vitamin C, since these substances potentiate the positive effects of each other; and with bromelain, which increases quercetin absorption [2].

Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) is a relatively new nutritional supplement that is gaining interest in sports medicine. HMB-FA (acid form of HMB) and HMB-Ca (calcium salt of HMB) are structural analogues of butyric acid and butyrate, which have a hydroxy and a methyl groups at the β -carbon atom.

The mechanism of action of HMB is closely related to the metabolism of leucine. It is known that oral administration of a course of the branched-chain amino acid (BCAA) leucine during constant training can increase strength and lean body mass (LBM) while reducing fat body mass (FBM). Leucine reduces soreness of skeletal muscles during ultra-intense exercise, prevents a decrease in circulating testosterone and the decrease in of skeletal muscle force after ultra-high exercise, and provides additional adaptation to strength training due to the activation of skeletal muscle signaling pathways related to protein synthesis [18]. It has been established that the effects are mediated by specific leucine metabolites, one of which is HMB [29]. There is a lot of evidence of a diverse positive influence (ergogenic effect) of HMB in sports such as acceleration of recovery after physical exertion, an increase in skeletal muscle force, body weight; a decrease in body fat, and an increase- in physical strength when performing aerobic and anaerobic movements [7]. The position in relation to the HMB boils down to the following:

- HMB can be used to improve recovery processes by reducing muscle damage during training in both trained and untrained individuals;

- the effectiveness of oral intake of HMB is manifested exclusively in direct connection with the training cycle;

- HMB is most effective when used with a course appointment 2 weeks before the end of training;

- a daily dose 38 mg/kg is considered effective in increasing muscular strength and power, and skeletal muscle hypertrophy in both trained and untrained individuals, provided an adequate training program is followed. This means that the total daily dose of HMB is about 3 g divided into 2 doses;

- oral intake of HMB combined with structured training programs can significantly reduce FBM;

- the mechanism of action of HMB during exercise includes suppression of proteolysis and activation of protein synthesis;

- chronic (permanent) use of HMB is safe both in young and older adults.

The effective use of HMB (3 g per day) requires 2 or more weeks, shorter periods are ineffective. Thus, the intake of Ca-HMB is optimal if it is used 2 weeks before the start of a new training cycle, and 60 min before physical activity.

Discussion

It is known that from 40 % to 88 % of athletes take metabolotropic and metabolite agents and nutritional supplements for special purposes. Aggressive marketing has spurred millions

of amateur and elite athletes to use these products in hopes of improving athletic performance. In the USA alone, more than 3 million people use them on their own.

However, to date there is no evidence base for efficacy and safety for most of these supplementary agents. The most studied among them are metabolitotropic agents that improve energy metabolism and are either macroergic compounds, substrates, intermediates of energy metabolism, or pharmacological modulators of subtle links of energy metabolism [2,6,10,19,33,60].

All discussed pharmacological agents perform a task on increasing the physical performance in athletes, accelerating the processes of their body adaptation to high-intensity physical activity by replenishing ATP reserves. There are convincing data on the effectiveness of metabolite drugs based on succinate, malate, pyruvate, GABA, creatine phosphate and ATP; and metabolite agents such as L-carnitine, riboxin, and thiothiazoline.

Additional experimental and clinical studies of efficacy and safety require pharmacological agents and nutritional supplements based on amino acids, HMB, etc. Sports physicians working with athletes should have accurate information about metabolite and metabolitotropic drugs, and nutritional supplements; know their mechanisms of action, desired effects in sport and side effects, and whether the supplement is prohibited by leagues or organizations in which athletes compete. Also, sports coaches, strength and conditioning coaches, and sports nutritionists, who are important sources of information for athletes about the pharmacological properties of these agents, should receive knowledge not from the Internet or from sales representatives (which is the reason for inconsistency regarding medical recommendations), but from scientific and methodological manuals and articles. All this will provide a scientific basis for the rational use of metabolites, metabolitotropic agents and nutritional supplements that can affect the main and compensatory mechanisms of macroergic phosphates production under the influence of physical activity.

Conclusions

Thus, based on the semantic analysis of data currently available, the necessary task of sports doctors and pharmacologists is the development of metabolitotropic agents and nutritional supplements, and approaches to their rational combination in order to improve energy metabolism and replenish ATP reserves in the body to ensure the high intensity of muscle contractions and at the same time protect target organs.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge the Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University for providing some facilities in carrying out the research.

Information about the authors:

Bielenichev I. F., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Medical Formulation with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-1273-5314

Gorchakova N. O., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pharmacology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0002-7240-5862

Doroshenko E. Yu., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Physical Rehabilitation, Sports Medicine, Physical Education and Health, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-7624-531X

Samura I. B., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Medical Formulation with Course of Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0001-5352-3209

Ryzenko V. P., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Medical and Pharmaceutical Informatics and Advanced Technologies, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-3466-7148

Bukhtiiarova N. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostic, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.
ORCID ID: 0000-0003-3499-3111

Відомості про авторів:

Беленічев І. Ф., д-р біол. наук, професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Горчакова Н. О., д-р мед. наук, професор каф. фармакології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

Дорошенко Е. Ю., д-р наук з фіз. виховання та спорту, професор, зав. каф. фізичної реабілітації, спортивної медицини, фізичного виховання та здоров'я, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Самура І. Б., канд. мед. наук, доцент каф. фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Риженко В. П., канд. мед. наук, доцент каф. медичної та фармацевтичної інформатики і новітніх технологій, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

Бухтіярова Н. В., канд. мед. наук, доцент каф. клінічної лабораторної діагностики Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

References

- Orchard JJ, Maddocks D, Carneiro E, Orchard JW. A review of legal, ethical, and governance issues for team doctors. *Clin J Sport Med.* 2022;32(3):248-55. doi: 10.1097/JSM.0000000000000986
- Gunina LM, Shustov YB, Belenichev IF, Vysochina NL, Golovashchenko RV, Morozova OV. Specialized nutrition for athletes: evaluation of ergogenic action using the principles of evidence-based medicine. *Pharmacia.* 2022;69(1):37-44. doi: 10.3897/pharmacia.69.e76599
- Abbey EL, Wright CJ, Kirkpatrick CM. Nutrition practices and knowledge among NCAA Division III football players. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:13-22. doi: 10.1186/s12970-017-0170-2
- Baltazar-Martins G, de Souza DB, Aguilar-Navarro M, Muñoz-Guerra J, Plata MD, Del Coso J. Prevalence and patterns of dietary supplement use in elite Spanish athletes. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019;16(1):e30. doi: 10.1186/s12970-019-0296-5
- Greg A, Alan MN. Statistical methods for assessing measurement error (reliability) in variables relevant to sports medicine. *Sports Med.* 1998;26(4):217-38. doi: 10.2165/00007256-199826040-00002
- Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD, editors. *Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements.* Washington, DC: The National Academies Press. 2006 [cited 2023, Jun 28]. Available from: http://nap.edu/openbook.php?record_id=11537
- Thomas DT, Erdman KA, Burke LM. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medi-

- cine: Nutrition and Athletic Performance. *J Acad Nutr Diet*. 2016;116(3):501-28. doi: [10.1159/000345862](https://doi.org/10.1159/000345862)
8. Belenichev IF, Chernii VI, Kolesnik YM, Pavlov SV. [Rational neuroprotection]. Donetsk: ID Zaslavskii; 2009. Russian.
 9. Close GL, Hamilton DL, Philp A, Burke LM, Morton JP. New strategies in sport nutrition to increase exercise performance. *Free Radic Biol Med*. 2016;98:144-58. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.016](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.016)
 10. Belenichev I, Gorchakova N, Kuchkovskiy O, Ryzhenko V, Varavka I, Varvanskyi P, et al. Principles of metabolitotropic therapy in pediatric practice. Clinical and pharmacological characteristics of modern metabolitotropic agents (part 1). *Phytotherapy. Journal*. 2022;3:6-26. doi: [10.33617/2522-9680-2022-3-6](https://doi.org/10.33617/2522-9680-2022-3-6)
 11. Ahmad NS, Abdul Aziz A, Kong, KW, Hamid MSA, Cheong JPG, Hamzah SH. Dose-response effect of tualang honey on postprandial antioxidant activity and oxidative stress in female athletes: A pilot study. *J Altern Complement Med*. 2017;23(12):989-95. doi: [10.1089/acm.2017.0129](https://doi.org/10.1089/acm.2017.0129)
 12. Mazur I, Belenichev I, Kucherenko L, Bukhtiyarova N, Puzyrenko A, Khromylova O, et al. Antihypertensive and cardioprotective effects of new compound 1-(β-phenylethyl)-4-amino-1,2,4-triazolium bromide (Hypertril). *Eur J Pharmacol*. 2019;853:336-44. doi: [10.1016/j.ejphar.2019.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.013)
 13. Belenichev IF, Cherniy VI, Nagornaya EA, Bukhtiyarova NV, Kucherenko VI. [Neuroprotection and Neuroplasticity]. Kiev: Logos; 2015. Russian.
 14. Abel T, Knechtel B, Perret C, Eser P, von Arx P, Knecht H. Influence of chronic supplementation of arginine aspartate in endurance athletes on performance and substrate metabolism – a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int J Sports Med*. 2005;26(5):344-9. doi: [10.1055/s-2004-821111](https://doi.org/10.1055/s-2004-821111)
 15. An D, Zeng Q, Zhang P, Ma Z, Zhang H, Liu Z, et al. Alpha-ketoglutarate ameliorates pressure overload-induced chronic cardiac dysfunction in mice. *Redox Biol*. 2021;46:102088. doi: [10.1016/j.redox.2021.102088](https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102088)
 16. Xu G, Yuan Y, Luo P, Yang J, Zhou J, Zhu C, et al. Acute succinate administration increases oxidative phosphorylation and skeletal muscle explosive strength via SUCNR1. *Front Vet. Sci*. 2022;8:808863. doi: [10.3389/fvets.2021.808863](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.808863)
 17. Burke LM. Practical issues in evidence-based use of performance supplements: supplement interactions, repeated use and individual responses. *Sports Med*. 2017;47(Suppl. 1):79-100. doi: [10.1007/s40279-017-0687-1](https://doi.org/10.1007/s40279-017-0687-1)
 18. Hunter GR, Fisherm G, Neumeier WH, Carter SJ, Plaisance EP. Exercise training and energy expenditure following weight loss. *Med Sci Sports Exercise*. 2015;9:1950-7. doi: [10.1249/MSS.0000000000000622](https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000622)
 19. Hunina LM, Ataman YO, Belenichev IF, Voitenko VL, Nosach OV. Laboratory monitoring i netrytyvno-metabolichna pidtrymka protsesu pidhotovky sportsmeniv [Laboratory monitoring and nutritional and metabolic support of the training process of athletes]. Sumy: SumDU; 2023. Ukrainian. https://essuir.sumdu.edu.ua/bitstream-download/123456789/91724/3/Hunina_nutrytyvno_metabolichna_pidtrymka.pdf
 20. Belenichev IF, Aliyeva OG, Bukhtiyarova NV, Popazova OO, Ryzhenko VP. Positive Pharmacological Modulation of Hsp70 in Recovery of Brain Energy Metabolism in Various Models of Cerebral Ischemia. *Biol Life Sci Forum*. 2022;20(1):24. doi: [10.3390/IECBM2022-13511](https://doi.org/10.3390/IECBM2022-13511)
 21. Anders JPV, Neltner TJ, Smith RW, Keller JL, Housh TJ, Daugherty FJ, et al. The effects of phosphocreatine disodium salts plus blueberry extract supplementation on muscular strength, power, and endurance. *J Int Soc Sports Nutr*. 2021;18(1):60. doi: [10.1186/s12970-021-00456-y](https://doi.org/10.1186/s12970-021-00456-y)
 22. Wu Y, Liu H, Wang X. Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Life Sci*. 2021;264:118628. doi: [10.1016/j.lfs.2020.118628](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118628)
 23. Blomstrand E, Mooren FC, Krüger K, Kavazis AN, Quindry JC, Senchina DS, et al. Consensus statement immunonutrition and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2017;23:8-50.
 24. Shu J, Shi J, Gu Y, Deng L, Zhao C, Wu C, et al. Levocarnitine regulates the growth of angiotensin II-induced myocardial fibrosis cells via TIMP-1. *Open Life Sci*. 2023;18(1):20220554. doi: [10.1515/biol-2022-0554](https://doi.org/10.1515/biol-2022-0554)
 25. Emran T, Chowdhury NI, Sarker M, Bepari AK, Hossain, M., Rahman GMS, et al. L-carnitine protects cardiac damage by reducing oxidative stress and inflammatory response via inhibition of tumor necrosis factor-α and interleukin-1β against isoproterenol-induced myocardial infarction. *Biomed Pharmacother*. 2021;143:112139. doi: [10.1016/j.biopha.2021.112139](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112139)
 26. Belenichev IF, Vizir VA, Mamchur VI, Kuriata OV. [Place of thiotriazoline in the gallery of modern metabolitotropic medicines]. *Zaporozhye Med J*. 2019;21(1):119-28. Russian. doi: [10.14739/2310-1210.2019.1.155856](https://doi.org/10.14739/2310-1210.2019.1.155856)
 27. Jin CL, Ye JL, Yang J, Gao CQ, Yan HC, Li H.C, et al. mTORC1 mediates lysine-induced satellite cell activation to promote skeletal muscle growth. *Cells*. 2019;8(12):1549. doi: [10.3390/cells8121549](https://doi.org/10.3390/cells8121549)
 28. Belenichev IF, Reznichenko YG, Reznichenko NY, Ryzhenko OI. [Perinatal lesions of the nervous system]. Zaporozhye: Prosvita; 2020. Russian.
 29. Castell LM, Stear SJ, Burke LM, editors. *Nutritional supplements in sport, exercise and health: An A-Z Guide*. London: Routledge; 2015. doi: [10.4324/9781315772509](https://doi.org/10.4324/9781315772509)
 30. Belenichev IF, Nagornaya EA, Gorbacheva SV, Gorchakova NA, Bukhtiyarova NV. [Thiol-disulfide system: role in endogenous cyto- and organoprotection, pathways of pharmacological modulation]. Kyiv: Euston Publishing House; 2020. Russian.
 31. Kurtz JA, VanDusseldorp TA, Doyle JA, Otis JS. Taurine in sports and exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. 2021;18(1):39. doi: [10.1186/S12970-021-00438-0](https://doi.org/10.1186/S12970-021-00438-0)
 32. Parkhomenko D, Belenichev I, Bukhtiyarova N, Kuchkovskiy O, Gorchakova N, Diachenko V, et al. Pharmacocorrection of Disturbances in the NO System in Experimental Chronic Generalized Periodontitis. *Open Access Maced J Med Sci*. 2023;11(A):47-52. doi: [10.3889/oamjms.2023.10717](https://doi.org/10.3889/oamjms.2023.10717)
 33. Drake KJ, Sidorov VY, McGuinness OP, Wasserman DH, Wikswow JP. Amino acids as metabolic substrates during cardiac ischemia. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012;237(12):1369-78. doi: [10.1258/ebm.2012.012025](https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012025)
 34. Belenichev IF, Chekman IS, Mazur IA, Gorchakova NA, Voloshin NA, Kucherenko LI. [Metabolitotropic drugs]. Zaporozhye: Pechatnyi Dom, 2007. Russian.
 35. Belenichev IF, Aliyeva OG, Popazova OO, Bukhtiyarova NV. Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Front Cell Neurosci*. 2023;17:1-16. doi: [10.3389/FNCEL.2023.1131683](https://doi.org/10.3389/FNCEL.2023.1131683)
 36. Maslennikov SO, Golovakha ML, Belenichev IF, Makyeyeva LV. Regenerative properties of polypropylene mesh coated with thiotriazoline and L-arginine. *Biomed Pharmacol J*. 2022;15(4). doi: [10.13005/BPJ/2537](https://doi.org/10.13005/BPJ/2537)
 37. Belenichev I, Gorbachova S, Pavlov S, Bukhtiyarova N, Puzyrenko A, Brek O. Neurochemical status of nitric oxide in the settings of the norm, ischemic event of central nervous system, and pharmacological intervention. *Georgian Med News*. 2021;315:169-76.
 38. Belenichev I, Kucherenko L, Pavlov S, Bukhtiyarova N, Popazova O, Derevianko N, et al. Therapy of post-COVID-19 syndrome: improving the efficiency and safety of basic metabolic drug treatment with thiotriazoline. *Pharmacia*. 2022;69(2):509-16. doi: [10.3897/pharmacia.69.e82596](https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e82596)
 39. Zacharopoulos G, Sella F, Cohen Kadosh K, Hartwright C, Emir U, Cohen Kadosh R. Predicting learning and achievement using GABA and glutamate concentrations in human development. *PLoS Biol*. 2021;19(7):e3001325. doi: [10.1371/journal.pbio.3001325](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001325)
 40. Burke LM, Castell LM, Case DJ, Close GC, Costa RJ, Desbrow B, et al. International Association of Athletics Federations Consensus Statement 2019: Nutrition for athletics. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2019;29(2):73-84. doi: [org/10.1123/ijsnem.2019-0065](https://doi.org/10.1123/ijsnem.2019-0065)
 41. Son H, Han SU, Lee K. 2,5-Diketeto-D-Gluconate Hyperproducing Glucobacter sphaericus SJF2-1 with Reporting Multiple Genes Encoding the Membrane-Associated Flavoprotein-Cytochrome c Complexed Dehydrogenases. *Microorganisms*. 2022;10(11):2130. doi: [10.3390/MICROOR-GANISMS10112130](https://doi.org/10.3390/MICROOR-GANISMS10112130)
 42. Maughan RJ, Burke LM, Dvorak J, Larson-Meyer DE, Peeling P, Phillips SM, et al. IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *British J Sports Medicine*. 2018;52(7):439-55. doi: [10.1136/bjsports-2018-099027](https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099027)
 43. Chen H, Wang Z., Wang Z, Dou J, Zhou C. Improving methionine and ATP availability by MET6 and SAM2 co-expression combined with sodium citrate feeding enhanced SAM accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(4):56. doi: [10.1007/s11274-016-2010-y](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2010-y)
 44. Hariharan S, Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology*. 2020;28(3):667-95. doi: [10.1007/s10787-020-00690-x](https://doi.org/10.1007/s10787-020-00690-x)
 45. Gonzalez MJ, Miranda-Massari JR. Diet and stress. *Psychiatr Clin North Am*. 2014;37(4):579-89. doi: [10.1016/j.psc.2014.08.004](https://doi.org/10.1016/j.psc.2014.08.004)
 46. Renner C, Asperger A, Seyffarth A, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F, Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. *Neurol Res*. 2010;32(1):101-5. doi: [10.1179/016164109X12518779082237](https://doi.org/10.1179/016164109X12518779082237)

47. Garthe I., Maughan RJ. Athletes and supplements: Prevalence and perspectives. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2018;28(2):126-38. doi: [10.1123/ijsem.2017-0429](https://doi.org/10.1123/ijsem.2017-0429)
48. Shen Y, Yang J, Li J, Shi X, Ouyang L, Tian Y, et al. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS One*. 2014;9(8):e104632. doi: [10.1371/journal.pone.0104632](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104632)
49. Varanoske AN, Hoffman JR, Church DD, Wang R, Baker KM, Dodd SJ, et al. Influence of skeletal muscle carnosine content on fatigue during repeated resistance exercise in recreationally active women. *Nutrients*. 2017;9(9):988. doi: [10.3390/nu9090988](https://doi.org/10.3390/nu9090988)
50. Kalbe C, Metzger K, Gariépy C, Palin MF. Effect of muscle fibre types and carnosine levels on the expression of carnosine-related genes in pig skeletal muscle. *Histochem Cell Biol*. 2023;160:63-77. doi: [10.1007/s00418-023-02193-6](https://doi.org/10.1007/s00418-023-02193-6)
51. Gunina LM. [A validity of the use of compositions on the basis of succinic acid in higher achievements sports]. *Pedagog psychol med-biol probl phys train sports*. 2012;5:50-4. Ukrainian. <https://www.sportpedagogy.org.ua/html/journal/2012-05/html-en/12gimhas.html>
52. Rosenbloom C. Protein power: answering athletes' questions about protein. *Nutr Today*. 2015;50(2):72-7. doi: [10.1097/NT.0000000000000083](https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000083)
53. Gleeson M. Immunological aspects of nutrition. *Review. Immunol Cell Biol*. 2016;94(2):117-23. doi: [10.1038/icb.2015.109](https://doi.org/10.1038/icb.2015.109)
54. Alves PM, Nunes R, Zhang C, Maycock CD, Sonnewald U, Carrondo MJ et al. Metabolism of 3-(13)C-malate in primary cultures of mouse astrocytes. *Dev Neurosci*. 2000;22(5-6):456-62. doi: [10.1159/000017475](https://doi.org/10.1159/000017475)
55. Van Remoortel H, De Buck E, Compemolle V, Deldicque L, Vandekerckhove P. The effect of a standard whole blood donation on oxygen uptake and exercise capacity: a systematic review and meta-analysis. *Transfusion*. 2017;57(2):451-62. doi: [10.1111/trf.13893](https://doi.org/10.1111/trf.13893)
56. Stellingwerff T, Morton JP, Burke LM. A framework for periodized nutrition for athletics. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2019;29(2):141-51. doi: [10.1123/ijsem.2018-0305](https://doi.org/10.1123/ijsem.2018-0305)
57. Fry L, Madden AM, Fallaize R. An investigation into the nutritional composition and cost of gluten-free versus regular food products in the UK. *J Hum Nutr Diet*. 2018;31(1):108-20. doi: [10.1111/jhn.12502](https://doi.org/10.1111/jhn.12502)
58. Logan SW, Kipling Webster E, Getchell N, Pfeiffer KA, Robinson LE. Relationship between fundamental motor skill competence and physical activity during childhood and adolescence: A systematic review. *Kinesiol Rev*. 2015;4(4):416-26. doi: [10.1123/kr.2013-0012](https://doi.org/10.1123/kr.2013-0012)
59. Van Loon LJ, Tipton KD. Concluding remarks: nutritional strategies to support the adaptive response to prolonged exercise training. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2013;75:135-41. doi: [10.1159/000345862](https://doi.org/10.1159/000345862)
60. Gretchen V, Heather R. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Dietary Fatty Acids for Healthy Adults Academy of Nutrition and Dietetics. *J Acad Nutr Diet*. 2014;114(1):136-53. doi: [10.1016/J.JAND.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/J.JAND.2013.11.001)