УДК 615.248:616.155.32:577.7

СПОНТАННИЙ АПОПТОЗ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ З РІЗНОЮ ЇЇ КОНТРОЛЬОВАНІСТЮ

Ю. І. Фещенко, І. Ф. Ільїнська, Л. М. Курик, Ю. О. Матвієнко, Л. В. Ареф'єва
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», Київ, Україна

Резюме. *Метою роботы* було вивчення особливостей спонтанного апоптозу лімфоцитів периферичної крові у хворих на бронхіальну астму (БА) з перебігом, що контролюється та не контролюється. *Матеріали та методи дослідження.* Було обстежено 27 хворих на БА, в тому числі 11 пацієнтів з контрольованою и 16 пацієнтів з неконтрольованою БА. Контрольну групу було сформовано з 11 волонтерів — умовно здорових осіб. Визначення спонтанного апоптозу лімфоцитів проводили проточною цитофлюориметрією після їх фарбування анексином 5 (An-5), кон'югованим з флюоресцеїн ізотіоцианатом (FITC), для оцінки раннього апоптозу лімфоцитів і 7-аміно-актиноміцином-D (7-Amino Actinomycin D — 7AAD) для оцінки пізнього апоптозу лимфоцитів. *Результати.* Отримані результати проведених досліджень свідчили про разнонаправлені зміни спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на БА, що залежали від контрольованості хвороби. В групі пацієнтів з контрольованою БА відмічалося виражене (на 317,3 %) посилення раннього апоптозу лімфоцитів, що було у переважної більшості (72,7 %) таких хворих. У групі пацієнтів з неконтрольованою БА відхилень середніх значень цього показника від референтних не відбувалося, частота підвищення раннього апоптозу лімфоцитів не перевищувала 18,8 %, а його вираженість була в 2,7 рази меншою. Відсутність посилення спонтанного апоптозу лімфоцитів або його пригнічення у пацієнтів з БА, що одержували інгаляційні та / або системні глюкокортикостероїди, може бути обумовлено їх стероїдорезистентністю, що зумовлює доцільність проведення подальших досліджень у цьому напрямку.
Ключові слова: бронхіальна астма, контрольованість, спонтанний апоптоз, лімфоцити.

Ю. І. Фещенко,
академік НАМН України, професор,
директор ДУ "Національний інститут фтизіатрії
і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України",
03038, Україна, м. Київ, вул. Амосова, 10
e-mail: admin@ifp.kiev.ua
Астма та Алергія, 2020, № 1, С. 5–13.

SPONTANEOUS LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN PATIENTS WITH DIFFERENT LEVEL OF BRONCHIAL ASTHMA CONTROL

Y. I. Feshchenko, I. F. Illyinskaya, L. M. Kuryk, Y. A. Matvienko, L.V. Arefyeva

Abstract. *The purpose of this study* was to estimate the features of spontaneous apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with bronchial asthma (BA) with controlled and uncontrolled course. *Materials and methods.* 27 patients with BA including 11 patients with controlled and 16 patients with uncontrolled asthma were examined. The control group was formed by 11 volunteers. Detection of spontaneous lymphocytes apoptosis was performed by flow cytofluorometry after annexin 5 (An-5) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) to evaluate early lymphocytes apoptosis and 7-amino-actinomycin-D staining to evaluate late lymphocytes apoptosis. *Results.* The obtained results of this study indicated multidirectional changes in spontaneous lymphocytes apoptosis in patients with BA that depended on the controllability of the disease. In the group of patients with controlled BA there was a significant increase in early lymphocytes apoptosis (by 317.3 %), which occurred in the vast majority (72.7 %) of these patients. In the group of patients with uncontrolled BA deviations of the mean values of this indicator from the reference did not occur, the incidence rate of early lymphocytes apoptosis did not exceed 18.8 %, and its severity was 2.7 times less. The absence of

© Фещенко Ю. І., Ільїнська І. Ф., Курик Л. М., Матвієнко Ю. О., Ареф'єва Л. В., 2020
www.search.crossref.org
DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13

increased spontaneous lymphocytes apoptosis or its suppression in patients with asthma receiving inhaled and/or systemic glucorticosteroids may be due to their steroid resistance, which makes it worthwhile to conduct further studies in this direction.
Key words: bronchial asthma, controllability, spontaneous apoptosis, lymphocytes.

Y. I. Feschenko,
Academican of NAMS of Ukrain, professor
Director of SO "National Institute of phthisiology and pulmonology named after F. G. Yanovskii NAMS of Ukraine"
M. Amosova str., 10, Kyiv, Ukraine, 03038
e-mail: admin@ifp.kiev.ua
Asthma and Allergy, 2020, 1, P. 5–13.

СПОНТАННЫЙ АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С РАЗНОЙ ЕЕ КОНТРОЛИРОВАННОСТЬЮ

Ю. И. Фещенко, И. Ф. Ильинская, Л. М. Курик, Ю. А. Матвиенко, Л. В. Арефьева

Резюме. *Целью работы* было изучить особенности спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных бронхиальной астмой с ее контролируемым и неконтролируемым течением. *Материалы и методы исследования.* Было обследовано 27 больных бронхиальной астмой (БА), в том числе 11 пациентов с контролированной и 16 пациентов с неконтролированной БА. Контрольная группа была сформирована из 11 волонтеров — условно здоровых лиц. Определение сонтанного апоптоза лимфоцитов проводили проточной цитофлюориметрией после их окрашивания анексином 5 (An-5), коньюгированным с флюоресцеин изотиоцианатом (FITC), для оценки раннего апоптоза лимфоцитов и 7-амино-актиномицином-D (7-Amino Actinomycin D — 7AAD) для оценки позднего апоптоза лимфоцитов. *Результаты.* Полученные результаты проведенных исследований свидетельствовали о разнонаправленных изменениях спонтанного апоптоза лимфоцитов у больных БА, которые зависели от контролируемости болезни. В группе пациентов с контролируемой БА отмечалось выраженное (на 317,3 %) усиление раннего апоптоза лимфоцитов, которое имело место у подавляющего большинства (72,7 %) этих больных. В группе пациентов с неконтролируемой БА отклонений средних значений этого показателя от референтных не происходило, частота повышения раннего апоптоза лимфоцитов не превышала 18,8 %, а его выраженность была в 2,7 раза меньше. Отсутствие усиления спонтанного апоптоза лимфоцитов или его подавление у пациентов с БА, получающих ингаляционные и / или системные глюкокортикостероиды, может быть обусловлено их стероидорезистентностью, что обусловливает целесообразность проведения дальнейших исследований в этом направлении.
Ключевые слова: бронхиальная астма, контролируемость, спонтанный апоптоз, лимфоциты.

Ю. И. Фещенко
академик НАМН Украины, профессор,
директор ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины»
ул. Амосова, 10, г. Киев, Украина, 03038
e-mail: admin@ifp.kiev.ua
«Астма и аллергия», 2020, № 1, С. 5–13.

Одним з важливих механізмів підтримки запалення є персистенція його клітин-ефекторів, зокрема лімфоцитів, внаслідок порушення їх елімінації шляхом пригнічення апоптозу. Апоптоз, як правило, визначається як генетична програма, що спрямована на елімінацію старих або пошкоджених клітин. Апоптоз — одна з форм програмованої (генетично детермінованої) клітинної смерті з характерними морфологічними і біохімічними ознаками, серед яких накопичення фосфатиділсерину в зовнішньому моношарі цитоплазматичної мембрани, конденсація хроматину, фрагментація ДНК, розпад клітин на апоптозні тільця є найбільш значущими [1]. Хоча терміни «апоптоз» та «програмована клітинна смерть» зазвичай використовуються як синоніми, насправді «програмована клітинна смерть» — це сукупність послідовних та складних біохімічних процесів, які відбуваються в клітині, а «апоптоз» - їх морфологічне втілення [2]. Втрата здатності лімфоцитів (Лф) хворих на БА до апоптозу багатьма дослідниками вважається одним із основних патогенетичних імунологічних механізмів дезадаптації, який сприяє концентрації мононуклеарних клітин в зоні алергічного запалення, у тому числі Лф. Саме

ISSN 2307-3373
DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13

тому дослідженням особливостей апоптозу Лф та його механізмам у хворих з різними варіантами БА у минулі два десятиріччя було присвячено чимало робіт. Але їх результати досить суперечливі.

Так, И. И. Нестерович (2005) при вивченні порушень апоптозу клітин-мішеней при різних варіантах БА було продемонстровано, що характерною особливістю алергічної БА було гальмування спонтанного апоптозу Лф периферичної крові (ПК), тоді як при неалергічній БА, навпаки, відбувалося його підвищення [3].

У той же час Ю. В. Скибо, Н. Ш. Курмаева (2012) при проведенні дослідження апоптичної активності Т-Лф у хворих на атопічну БА з легким та тяжким її перебігом було показано, що характер апоптичних змін Лф у групі хворих на легку БА співпадає з групою здорових осіб, а Лф хворих з тяжким перебігом хвороби навпаки проявляють резистентність до їх спонтанного апоптозу [4]. С. В. Чубаровою та співав. (2013) було продемонстровано, що при загостренні тяжкої БА відзначається гальмування спонтанного апоптозу Лф ПК у 2 рази у порівнянні із контролем і у 3 рази у порівнянні з цим показником при БА середньої тяжкості, а купування загострення як середньотяжкої, так і тяжкої БА нормалізує рівень спонтанного апоптозу Лф [5].

Складний стан рівноваги між проліферацією, диференціюванням та апоптозом клітин реалізується за рахунок регуляторного впливу еферентних сигналів. Відомо, що в активації і передачі сигналу апоптозу ключову роль відіграють рецептори FAS (*cell surface death receptor)*, а також молекули головного комплексу гістосумісності (МНС) I і II класів. Т. В. Мамонтовою при аналізі ролі рецепторів Fas, молекул МНС I і II класів у регуляції апоптозу Лф ПК при атопічній БА була виявлена стійкість цих клітин FAS- МНС I- і МНС ll-індукованого апоптозу, що, на думку автора, обумовлено впливом факторів сироватки хворих на атопічну БА й активацією антиапоптичного білка Bcl-2, які забезпечують виживаність Лф і персистенцію алергічного запалення [6].

Передачу апоптичного сигналу всередину клітини здійснюють кілька гомологічних рецепторів. Для активації сигналу ці рецептори повинні зв'язатися зі своїми лігандами. Так, рецептор FAS зв'язується з FAS-лігандом, рецептор TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor*) — з TNFα, рецептори TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand)* і TRAIL-R2 — з лігандом TRAIL і нарешті, DR3 (*death receptor* 3) — з лігандом TL1A (*ligand TNF-likelig ligand*). Найчастіше, щоб здійснити апоптоз, ліганди повинні знаходитися в мембранозв'язаній формі. Рецептори FAS і TNFR1 запускають апоптоз тільки в тому випадку, якщо інтерналізуются в цитоплазму клітини-мішені. Якщо FAS і TNFR1 не інтерналізуются, то вони запускають антиапоптичну програму. Рецептори TRAIL-R1, TRAIL-R2 і DR3 не потребують інтерналізації при запуску апоптозу. Відомі також рецептори TNFR2, TRAIL-R3 і TRAIL-R4, які активують антиапоптотичну програму. Апоптотичні сигнали починаються зі зборки комплексу DISC (*death inducing signaling complex*) на внутрішній стороні цитоплазматичної мембрани. До складу DISC обов'язково входять білки FADD (*Fas-associated death domain*) і прокаспаза-8, які зв'язуються з внутрішньоклітинним доменом апоптичного рецептора. Якщо комплекс DISC не формується, сигнал передається на NFκB-шлях (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) через каскад MAP-кінази (*mitogen-activated protein kinase*) та запускає антиапоптичну програму [7].

Дослідження вмісту в сироватці крові розчинних мембранних маркерів апоптозу — sCD95 (sAPO-1 / FAS), розчинного FAS ліганду (sFASL), що індукують апоптоз, TNF-залежного ліганду для рецепторів DR4 і DR5 TRAIL, свідків ранньої стадії ефекторного етапу апоптозу — ферменту, що перетворює IL1β, Caspase-1 / ICE (ICE–IL1β Converting Enzyme) і подальшої його стадії білку Annexin V, а також sCD30 і sCD40 — маркерів активації, які також модулюють процеси апоптозу, білку Annexin V, sCD30 і sCD40 — маркерів активації апоптозу було проведено В. А. Булгаковою (2009) [8]. Нею були встановлені достовірні відмінності концентрацій зазначених показників від їх референтних рівнів, які виявилися найбільш вираженими при тяжкому перебігу атопічної БА у дітей, а також при наявності у них супутньої вірусної і бактеріальної інфекції. Це свідчить про зміни процесу як FAS, так і TRAIL-індукованого апоптозу прозапальних та імунокомпетентних клітин при АБА. Між дослідженими показниками автором були встановлені множинні кореляційні взаємозв'язки, що вказує на взаємозумовленість процесів рецепції (активації) і елімінації (апоптозу) в патогенезі БА у дітей. Автором була виявлена стійкість імунокомпетентних клітин до апоптозу як у фазі ініціації, так і в ефекторній фазі, що підтверджує її патогенетичне значення в персистенції алергічного запалення.

А. П. Парахонским, С. В. Егоровою, С. С. Цыганок (2008) при вивченні механізмів програмованої смерті клітин ПК у хворих на БА теж було визначено, що розвиток БА пов'язаний з порушенням реалізації програмованої клітинної смерті, яке проявляється зниженням апоптозу [9]. Цими авторами було встановлено, що пригнічення механізмів апоптозу Лф реалізується через збільшення експресії мРНК антиапоптичних ефекторів по рецепторному і мітохондріальному шляхах. Зміна балансу між про- і антиапоптичними ефекторами в Лф крові при БА було асоційоване зі зниженням експресії гена і ДНК-зв'язуючої активності транскрипційного фактора p53 і стимуляцією активності транскрипційного фактора NF-kB у цих клітинах.

Також були проведені дослідження механізмів спонтанного і індукованого апоптозу Лф ПК донорів і хворих на атопічну БА [10]. Апоптоз Лф оцінювали в динаміці за змінами мітохондріального потенціалу (МП), рівнями експресії фосфатидилсе-

DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13 ISSN 2307-3373

рину (ФС), а також фрагментації ДНК методом проточної цитофлюорометрії. В результаті цієї роботи було показано, що в Лф ПК хворих на атопічну БА, при їх інкубації в поживному середовищі (*in vitro*), фрагментація ДНК настає набагато пізніше і в меншій мірі в порівнянні з Лф донорів. Автором було зроблено висновок про те, що пригнічення механізмів програмованої смерті Лф хворих реалізується через збільшення експресії мРНК антиапоптичних факторів (Bcl-2, Bflj, Bcl-xL, c1AP1 та c1AP2). Ступінь порушення механізмів програмованої клітинної смерті Лф була асоційована з тяжкістю захворювання й активністю запалення при БА. Також було отримано дані, які свідчать про збільшення експресії мРНК і ДНК-зв'язуючої здатності нуклеарного фактора NF-kB та зниження експресії гена p53. Здатність транскрипційного фактора p53 зв'язувати ДНК також виявилася зниженою й корелювала з тяжкістю БА. В результаті цих досліджень було з'ясовано, що в імунокомпетентних клітинах хворих на БА збільшується активність антиапоптичних ефекторів, і не змінюється активність проапоптичних. Подібний дисбаланс в системі апоптозу, на думку Е. С. Агеевой (2006), може бути пов'язаний з генетичним дефектом в регуляторних генах, що призводить до формування антиапоптичного статусу. Таким регуляторним геном виступає білок p53, зниження функціональної активності якого призводить до високого рівня експресії антиапоптичних ефекторів.

Зниження мітохондріального потенціалу (МП) Лф і поява фосфатидилсерину (ФС) на їх поверхні виступають ранніми ознаками апоптозу і знаходяться в зворотній залежності один від одного. Зміна цих показників передує фрагментації ДНК Лф [11]. При вивченні цих показників у здорових осіб та хворих на атопічну БА відмінностей в спонтанних змінах величини МП і експресії ФС між двома групами — здорових осіб та хворих на атопічну БА знайдено не було. Це свідчить про те, що розпізнавання Лф, які піддаються апоптозу при атопічній БА, може не бути порушено, а фактором, необхідним для елімінації апоптичних Лф, є фрагментація їх ДНК. Тобто початкові етапи апоптозу при атопічній БА не відрізняються від контролю, а порушення апоптозу зачіпають лише його заключний етап на стадії деградації ДНК

Відомості про те, як саме зміни апоптозу Лф ПК у хворих на БА пов'язані з контрольованістю хвороби, практично відсутні У зв'язку з цим **метою даної роботи**, виконаної за кошти державного бюджету України, було вивчити особливості спонтанного апоптозу лімфоцитів периферичної крові у хворих на бронхіальну астму з її контрольованим та неконтрольованим перебігом.

Матеріали та методи досліджень

Було проаналізовано результати комплексного клініко-імунологічного обстеження 27 хворих з різним перебігом БА, які перебували на лікуванні в ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». Тяжкість та контрольованість БА оцінювали за рекомендаціями GINA 2014, 2018: за даними опитувальників ACT та ACQ-5, показниками функції зовнішнього дихання ($ОФВ_1$), частотою загострень БА та госпіталізацій з цього приводу за попередній рік, потребою в β_2-агоністах короткої дії, обсягом терапії, що проводилася, тощо [12, 13, 14, 15].

В групу хворих з контрольованою БА (табл. 1) було включено 11 осіб, у т.ч. 1 чоловік (9,1 %) та 10 жінок (90,9 %). Більшість хворих із контрольованою БА були працездатного віку: троє (36,3 %) — у віці 30–50 років і семеро (63,6 %) — 51–70 років. Середній вік пацієнтів складав (50,7 ± 3,6) років. У цій групі тяжку БА було визначено у 7 (63,6 %) пацієнтів, а у 4 хворих (36,4 %) була встановлена середня тяжкість хвороби. У групу хворих з неконтрольованою БА було включено 16 пацієнтів, у т.ч. двоє чоловіків та 14 жінок. Більшість із них 11 (68,8 %) належали до вікової групи 51–70 років. Середній вік пацієнтів складав (50,7 ± 3,6) років ($p > 0,05$). У цій групі БА середньої тяжкості було діагностовано у 2-х пацієнтів (12,5 %), а решта — 14 (87,5 %) хворих мали тяжку БА.

Таблиця 1. Розподіл здорових осіб хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю за статтю та віком

Групи обстежених		Стать			Вік				
		чоловіки	жінки	всього	до 30	31-50	51-70	>70	всього
Контрольна	n	3	8	11	1	8	2	0	11
	%	27,3	72,7*	100,0	9,1	72,7°	18,2°	0,0#$	100,0
З контрольованою БА	n	1	10	11	1	3	7	0	11
	%	9,1	90,9*	100,0	9,1	36,3 $	63,6$	0,0°#$	100,0
З неконтрольованою БА	n	2	14	16	1	3	11	1	16
	%	12,5	87,5*	100,0	6,3	18,8°#$&	68,8°$	6,3	100,0
Всього	n	3	24	27	2	6	18	1	27
	%	11,1	88,9*	100,0	7,4	22,2	66,7	3,7	100,0

Примітки: * — гендерні відмінності статистично підтверджено ($p < 0,05$); ° — різницю показника у порівнянні з показником відповідної групи обстежених віком до 30 років статистично підтверджено ($p < 0,05$); # — різницю показника у порівнянні з показником відповідної групи обстежених віком 31-50 років статистично підтверджено ($p < 0,05$); $— різницю показника у порівнянні з показником контрольної групи статистично підтверджено ($p < 0,05$); & — різницю показника у порівнянні з показником групи хворих з контрольованою БА статистично підтверджено ($p < 0,05$).

ISSN 2307-3373 DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13

Контрольну групу було сформовано з 11 волонтерів — осіб без клінічних ознак інфекційної та соматичної патології (умовно здорових). Їх розподіл за статтю та віком теж представлений у табл. 1. Як свідчать наведені дані, більшість з них (8 осіб — 72,7 %) належали до вікової групи 31-50 років, середній вік складав (45,7 ± 2,5) % ($p > 0,05$).

Визначення апоптозу лімфоцитів проводили шляхом інкубації цільної гепаринізованої крові у поживному середовищі RPMI 1640 з L-глютаміном, HEPES (Gibco™) і гентаміцином (KRKA, Словенія), без будь-яких додаткових речовин. Для цього по 500 мкл цільної гепаринізованої крові вміщували у пластикові пробірки ємністю 1,5–2,0 мл, додавали 500 мкл повного поживного середовища RPMI (з L-глютаміном, HEPES і 1 % гентаміцину). Пробірки щільно закривали пробками та проводили їх інкубацію протягом 48 годин при температурі 38° С. По завершенні інкубації проби центрифугували 10 хвилин при 100 g і температурі 4° С, відмивали льодяним поживним середовищем та тримали пробірки в ємності із льодом. Після цього для виявлення відсотку апоптичних лімфоцитів проводили їх фарбування люмінесцентними фарбниками [16, 17]: анексином 5 (An-5), кон'югованим із флюоресцеїн ізотіоцианатом (FITC), для визначення відносного вмісту лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу та 7-аміно-актіноміцином-D (7-Amino Actinomycin D – 7AAD) для визначення відносного вмісту лімфоцитів з пізніми ознаками апоптозу. Для цього супернатант видаляли, з верхнього шару осаду відбирали 100 мкл та ресуспендували його в 200 мкл зв'язуючого буфера, розведеного у 10 разів. Після цього 50 мкл розведеної буфером крові переносили у пробірки для проточного цитофлюориметру додавали 5 мкл An-5-FITC та 10 мкл 7AAD, проводили їх інкубацію 15 хвилин у холодильнику в ємності з льодом, після чого додавали 200 мкл зв'язуючого буфера, витримували 10 хвилин у холодильнику в ємності з льодом, лізували 2 мл стандартного лізуючого розчину 15 хвилин в темряві та проводили проточну цитофлюориметрію проб.

У кожній пробі визначали відсоток лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу (-Лф), з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (А5+/7AAD+-Лф) і пізніми ознаками апоптозу (7AAD+-Лф), відсоток усіх Лф з ранніми ознаками апоптозу (А5+ -Лф усі) та відсоток усіх Лф з пізніми ознаками апоптозу. Визначали їх суму — показник спонтанного апоптозу Лф, розраховували частоту та виразність змін цих показника (підвищення/зниження), співвідношення Лф з ранніми та пізніми ознаками апоптозу, а також питому кількість Лф з ранніми та пізніми ознаками апоптозу серед усіх апоптичних Лф та їхнє співвідношення.

Отриманий в ході дослідження цифровий матеріал у кожній окремій вибірці був перевірений на нормальне розподілення величин. Для перевірки нормальності розподілу даних використовували методику Лапач С. Н. та ін. (2001) (функція NORMSAMP-1, яка вбудовується в середовище Excel) [18]. За отриманими результатами визначали вибір методу подальшої статистичної обробки даних для підтвердження вірогідності результатів. Для оцінки достовірності відмінностей середніх значень показників у вибірках із нормальним розподілом використовували двохсторонній t-критерій Ст'юдента (для залежних та незалежних вибірок). За рівень вірогідності приймалося значення показника вірогідності (p) між групами, яке дорівнювало, або було меншим за 0,05. При відсутності нормальності розподілу для обчислювання вірогідності різниці середніх показників застосовувався двовибірковий критерій Уілкоксона, оцінка якого проводилась шляхом їх порівняння з максимальним та мінімальним критеріальними значеннями. При аналізі індивідуальних змін досліджуваних показників було застосовано метод альтернативного варіювання.

Результати досліджень зберігалися на паперовому та електронному носіях. Математична обробка отриманих даних проводилися за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входили до пакету Microsoft Office Professional 2007, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 43437596.

Результати та їх обговорення

Показники спонтанного апоптозу у хворих на контрольовану та неконтрольовану БА представлені у табл. 2. Аналіз цих даних продемонстрував суттєве підвищення середньої кількості Лф з ранніми ознаками апоптозу (А5+/7AAD–-Лф) у хворих з контрольованою БА, тоді як відхилень від референтних значень середньої кількості Лф з ранніми і пізніми (А5+/7AAD+-Лф) та пізніми (А5-/7AAD+-Лф) ознаками апоптозу визначено не було. Показник спонтанного апоптозу у цій групі в 3,2 рази перевищував такий показник в групі здорових осіб. У групі хворих на неконтрольовану БА зростання кількості апоптичних Лф виявлено не було (табл. 2).

Аналіз індивідуальних змін показників спонтанного апоптозу Лф підтвердив представлені вище дані. Відсоток хворих на контрольовану БА, у яких було зафіксоване підвищення кількості Лф з ранніми ознаками апоптозу (рис. 1), яке сягало 81,8 %, у хворих з неконтрольованим перебігом хвороби — у 2,2 рази менше (37,5 %, $p < 0,05$). Майже у третини хворих на контрольовану БА (27,3 %) мало місце підвищення відсотку Лф з ранніми та пізніми ознаками апоптозу, і тільки у кожного п'ятого – при неконтрольованій БА (18,8 %, $p < 0,05$). У 27,3 % пацієнтів з контрольованою БА було зафіксоване підвищення кількості Лф з пізніми проявами апоптозу, у групі хворих з неконтрольованим перебігом хвороби — у 12,5 % ($p < 0,05$). Отже, високі показники спонтанного апоптозу Лф були визначені у переважної більшості пацієнтів з контрольованою БА (81,8 %), і тільки у третини хворих на неконтрольованим її перебігом (31,3 %; $p < 0,05$).

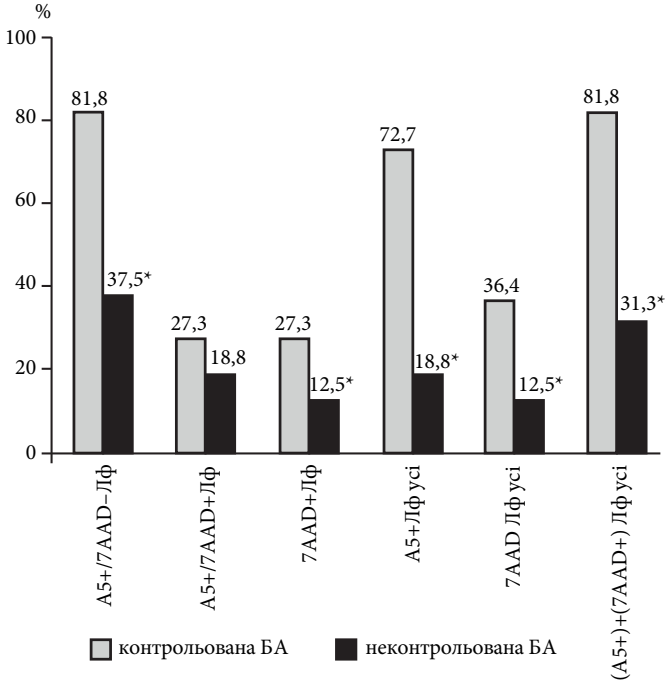
Зменшення відсотку Лф з пізніми ознаками

DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13 ISSN 2307-3373

Т а б л и ц я 2. Показники спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю

Показники спонтанного апоптозу лімфоцитів (%)	Групи обстежених		
	Здорові особи (n = 11)	Хворі на бронхіальну астму	
		контрольовану (n = 11)	неконтрольовану (n = 16)
	M ± m (%)	M ± m (%)	M ± m (%)
A5+/7AAD–- Лф	4,5 ± 1,9	38,3 ± 13,0*	7,9 ± 2,1#
A5 +/7AAD+- Лф	3,7 ± 1,2	5,9 ± 2,4	3,8 ± 1,3
7AAD+ -Лф	9,0 ± 2,6	10,1 ± 1,3	9,5 ± 3,1
A5 +-Лф усі	8,2 ± 2,8	44,2 ± 12,2*	11,8 ± 2,9#
7AAD+- Лф усі	12,7 ± 3,3	16,0 ± 4,8	13,3 ± 4,2
(A5 +-Лф) + (7AAD+) Лф усі	17,2 ± 2,4	54,3 ± 11,2*	21,3 ± 4,4#

П р и м і т к и: A5 +/7AAD- -Лф - лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+ -Лф — лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; A5 +/7AAD+ Лф — лімфоцити з ранніми та пізніми ознаками апоптозу; A5+-Лф усі — сумарна кількість лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+- Лф усі — сумарна кількість лімфоцитів з пізніми ознаками апоптозу; (A5+) + (7AAD+)-Лф — сумарна кількість лімфоцитів з ознаками апоптозу; * — різницю показників у порівнянні з референтними статистично підтверджено ($p < 0,05$); # — різницю показників у порівнянні з показником групи з контрольованою БА статистично підтверджено ($p < 0,05$).



П р и м і т к а (тут та на рис. 2–4): A5 +/7AAD– -Лф — лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+ -Лф — лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; A5 +/7AAD+ Лф — лімфоцити з ранніми та пізніми ознаками апоптозу; A5 +-Лф усі — сумарна кількість лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+-Лф усі — сумарна кількість лімфоцитів з пізніми ознаками апоптозу; (A5 +) + (7AAD+)-Лф — сумарна кількість лімфоцитів з ознаками апоптозу; * — різницю показників у порівнянні з показником групи з контрольованою БА статистично підтверджено ($p < 0,05$).

Рис. 1. Частота підвищення спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхвальну астму з різною її контрольованістю.

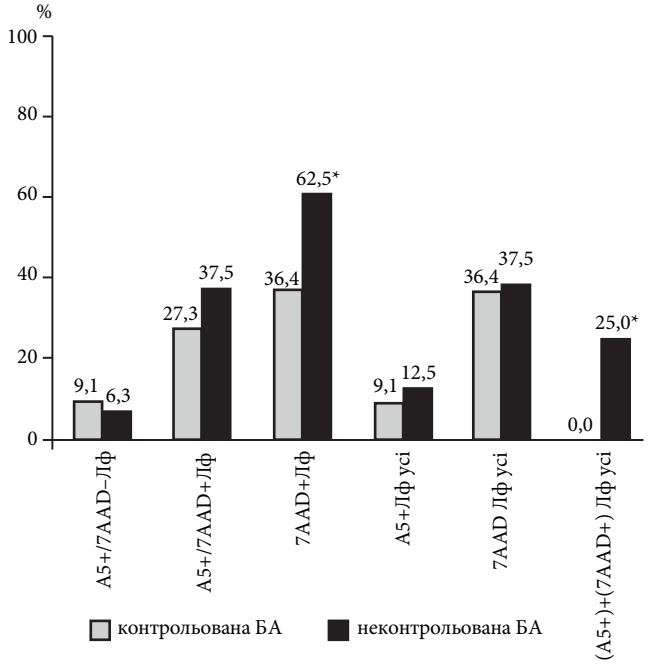


Рис. 2. Частота зниження спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю.

апоптозу Лф у хворих на контрольовану БА було встановлено у 36,4 % випадків, і в 1,7 частіше — при не контрольованій БА (62,5 %; $p < 0,05$).

При аналізі виразності підвищення спонтанного апоптозу Лф у хворих на БА (рис. 3) у групі пацієнтів з контрольованим перебігом хвороби було визначено посилення раннього апоптозу цих клітин у 4,6 разів у порівнянні з верхньою межею референтного діапазону (на 458,2 %; $p < 0,05$), а в групі пацієнтів з неконтрольованою БА це підвищення було у 4,2 рази менш виразним — в середньому на 108,4 % ($p < 0,05$). Зростання показників пізнього спонтанного апоптозу Лф, навпаки, виявилася більш виразним у хворих з неконтрольованою БА (у 2,9 разів: відповідно на 283,6 % та на 81,9 %, $p < 0,05$). Збільшення інтегрального показника спонтанного апоптозу Лф в середньому складало 144,0 % при контрольованій БА і тільки 67,6 % при неконтрольованій ($p < 0,05$).

Виразність зниження сумарного показника раннього апоптозу Лф у хворих на БА з контрольованою БА складала 98,1 %, а у пацієнтів з неконтрольованим перебігом хвороби була майже втричі меншою —

ISSN 2307-3373
DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13

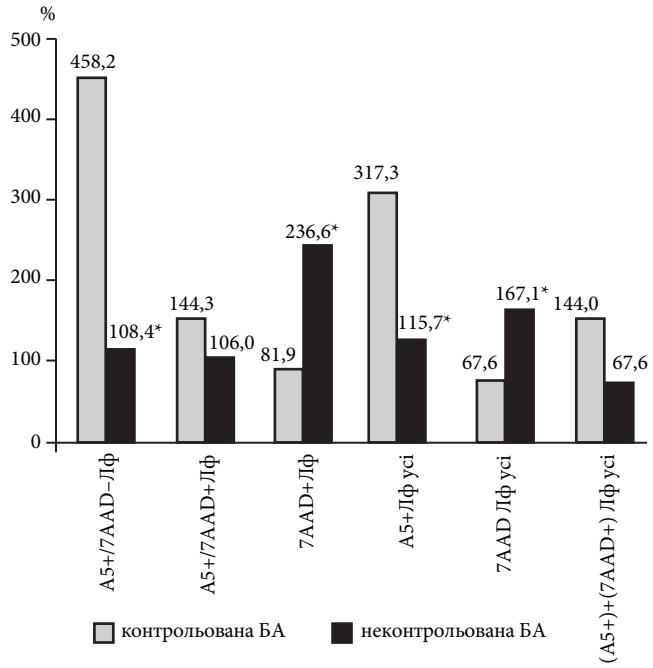


Рис. 3. Виразність підвищення спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю.

33,5 % (p < 0,05). Виразність зниження сумарного показника спонтанного апоптозу при неконтрольованій БА дорівнювала 53,1 % (p < 0,05), тоді як при контрольованому її перебігу зниження цього показника взагалі зафіксовано не було (рис. 4).

При визначенні питомої кількості лімфоцитів з ранніми та пізніми ознаками апоптозу серед усіх апоптичних Лф у хворих з контрольованою та неконтрольованою БА було встановлено достовірне збільшення відсотку Лф з ранніми ознаками апоптозу у пацієнтів обох груп (відповідно 72,0 % та 63,3 % у порівнянні з 47,0 % у групі здорових осіб (p < 0,05). Зміни питомої кількості лімфоцитів з пізніми ознаками апоптозу мали протилежний характер (рис. 5): у хворих на контрольовану та неконтрольовану БА — 44,5 % та 56,4 %, відповідно у порівнянні з 73,0 % у групі здорових осіб (p < 0,05). Ці результати підтверджувалися даними розрахунку співвідношення Лф з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (рис. 6). Як свідчили отримані дані, у групі здорових осіб превалювання ранніх ознак апоптозу над пізніми (співвідношення більше 1,0) відзначалося у 27,3 % випадків, а у двох групах хворих на БА — відповідно у 63,6 % та 62,5 %, (p < 0,05). Превалювання

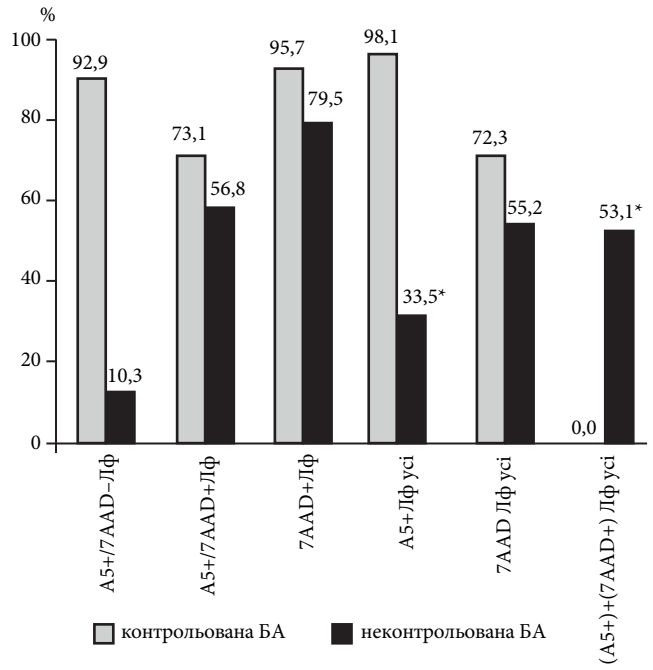
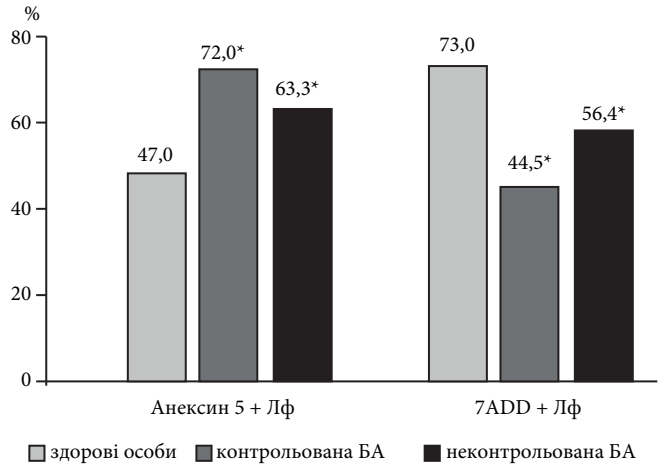
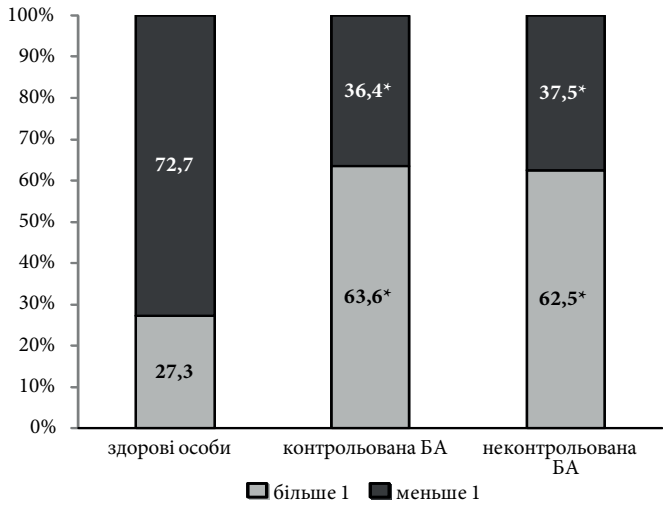


Рис. 4. Виразність зниження спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю.



Примітки: Аннексин 5+ Лф — лімфоцити з ранніми ознаками апоптозу; 7AAD+ Лф — лімфоцити з пізніми ознаками апоптозу; * — різницю показника у порівнянні з показником групи з здорових осіб статистично підтверджено (p > 0,05).

Рис. 5. Питома кількість лімфоцитів з ранніми та пізніми ознаками апоптозу серед усіх апоптичних лімфоцитів у хворих з контрольованою та неконтрольованою БА.



Примітка (тут та на рис. 2–4): * — різницю показника у порівнянні з показником групи з здорових осіб статистично підтверджено (p > 0,05).

Рис. 6. Відсоток осіб з різним співвідношенням ранніх та пізніх ознак спонтанного апоптозу лімфоцитів у групах здорових осіб та хворих на бронхіальну астму з її контрольованим та неконтрольованим перебігом.

DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13
ISSN 2307-3373

пізніх ознак спонтанного апоптозу над ранніми (співвідношення менше 1,0) відзначалося у 72,7 % представників з групи здорових осіб, а у хворих на контрольовану та неконтрольовану БА — у 36,4 % та 37,5 %, відповідно ($p < 0,05$). Відмінностей між групами пацієнтів з контрольованою та неконтрольованою БА знайдено не було.

Звертає на себе увагу те, що отримані в результаті проведення цих досліджень дані не співпадають з даними інших дослідників, які відзначали пригнічення спонтанного апоптозу Лф при БА. На наш погляд, це пояснюється методичними відмінностями визначення апоптозу Лф в представленому дослідженні: використання авторами цільної крові попереджає втрату Лф, яка має місце при їх виділенні на градієнті щільності та неодноразовому відмиванні, а відсутність у поживному середовищі ембріональної телячої сироватки з присутністю ростових, тобто антиапоптичних факторів, виключає дію цих факторів на клітини. Крім того, плазма цільної крові хворих містить комплекс ендогенних та екзогенних речовин з апоптичною та антиапоптичною активністю, у т.ч. глюкокортикостероїди, високі дози яких використовуються в лікуванні хворих з тяжким перебігом БА. Варто зазначити, що посилення спонтанного апоптозу Лф при БА можна віднести до адаптаційних імунологічних механізмів. У той же час відсутність посилення спонтанного апоптозу Лф або його пригнічення при БА може бути обумовлено їх резистентністю до стероїдів, але це має бути підтверджено подальшими дослідженнями.

Висновки. Отримані результати проведених досліджень свідчать про різноспрямовані зміни спонтанного апоптозу лімфоцитів у хворих на БА, які залежать від контрольованості хвороби. У групі пацієнтів з контрольованою БА відзначається виразне (на 317,3 %) посилення раннього апоптозу лімфоцитів ($p < 0,05$), яке має місце у переважної більшості (72,7 %) цих пацієнтів. У групі пацієнтів з неконтрольованою БА відхилень середніх значень цього показника від референтних не відбувається, частота підвищення раннього апоптозу Лф не перевищує 18,8 %, а його виразність у 2,7 разів менша, ніж при контрольованій БА ($p < 0,05$). Відсутність посилення спонтанного апоптозу Лф або його пригнічення у пацієнтів з БА, які отримують інгаляційні та/або системні глюкокортикостероїди, може бути обумовлена їх стероїдорезистентністю, що обумовлює доцільність проведення подальших досліджень в цьому напрямку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барышников АЮ, Шишкин ЮВ. Иммунологические проблемы апоптоза. Москва: Эдиториал УРСС; 2002. 320 с.
2. Ільїнська ІФ. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді (аналітичний огляд). Лаб. діагностика. 2002;3:66-72.
3. Нестерович ИИ. Нарушения апоптоза клеток-мишеней при различных вариантах бронхиальной астмы: дис. … д-ра мед. наук: 14.00.43. Санкт-Петербург. 2005. 292 с. URL: https://www.dissercat.com/content/narusheniya-apoptoza-kletok-mishenei-pri-razlichnykh-variantakh-bronkhialnoi-astmy (дата звернення 06.10.2019).
4. Скибо ЮВ., Курмаева НШ. Особенности апоптоза лимфоцитов у больных легкой и тяжелой атопической бронхиальной астмой. Практическая медицина. 2012;61(6):62-68. URL: http://en.pmarchive.ru/osobennosti-apoptoza-limfocitov-u-bolnyx-legkoj-i-tyazheloj-atopicheskoj-bronxialnoj-astmoj (дата звернення 06.10.2019).
5. Чубарова СВ, и др. Апоптоз лимфоцитов периферической крови при бронхиальной астме различной степенп тяжести. Бюл. физиологии и патологии дыхания. 2013;48:28-33. URL http://medical-diss.com/medicina/vzaimosvyaz-kliniko-funktsionalnyh-parametrov-ekspressii-r-glikoproteina-i-apoptoza-limfotsitov-perifericheskoy-krovi-pri#ixzz6BgcU1aht (дата звернення 10.12.2019).
6. Мамонтова ТВ. Атопическая бронхиальная астма и устойчивость к апоптозу Актуальні проблеми сучасної медицини. 2008;8(4):171. URL: http://elib.umsa.edu.ua/handle/umsa/1751 (дата звернення 10.10.2019).
7. Мисюрин ВА. Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза. Рос. биотерапевт. журн. 2015;14(2):23-30. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/struktura-i-svoystva-osnovnyh-retsepto rov-i-ligandov-vneshnego-puti-apoptoza (дата звернення 15.10.2019).
8. Булгакова ВА. Клиническое значние маркеров активации и апоптоза иммунокомпетентных клеток при атопической бронхиальной атме у детей. Педиатрия. 2009;87(2):12-18. URL:https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskoe-znachenie-izucheniya-markerov-aktivatsii-i-apoptoza-immunokompetentnyh-kletok-pri-atopicheskoy-bronhialnoy-astme-u-detey (дата звернення 12.10.2019).
9. Парахонский АП, Егорова СВ, Цыганок СС. Механизмы программируемой гибели клеток периферической крови у больных бронхиальной астмой. Успехи современного естествознания. 2008;8:107–108.

REFERENCES

1. Baryshnikov AY, Shishkin YV. Immunologicheskiye problemy apoptoza (Immunological problems of apoptosis). Moscow: Editorial URSS; 2002. 320 p.
2. Il'yins'ka IF. Apoptoz, apocytosis ta yikh rol v imunniy vidpovidi (analitychnyy ohlyad) (Apoptosis, apocytosis and their role in the immune response (analytical review)). Lab diagnostics. 2002;3:66-72.
3. Nesterovich II. Narusheniya apoptoza kletok-misheney pri razlichnykh variantakh bronkhial'noy astmy (Violations of apoptosis of target cells in various variants of bronchial asthma): dis. … d-ra med. nauk: 14.00.43. St. Petersburg. 2005. 292 p. URL: https://www.dissercat.com/content/narusheniya-apoptoza-kletok-mishenei-pri-razlichnykh-variantakh-bronkhialnoi-astmy (last accessed 06.10.2019).
4. Skibo YV, Kurmayeva NS. Osobennosti apoptoza limfotsitov u bol'nykh legkoy i tyazheloy atopicheskoy bronkhial'noy astmoy (Features of lymphocyte apoptosis in patients with mild and severe atopic bronchial asthma). Practical medicine. 2012;61(6):62-68. URL: http://en.pmarchive.ru/osobennosti-apoptoza-limfocitov-u-bolnyx-legkoj-i-tyazheloj-atopicheskoj-bronxialnoj-astmoj (last accessed 06.10.2019).
5. Chubarova SV, i dr. Apoptoz limfotsitov perifericheskoy krovi pri bronkhial'noy astme razlichnoy stepenp tyazhesti. Byul. fiziologii i patologii dykhaniya (Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in bronchial asthma of varying severity). 2013;48:28-33. URL http://medical-diss.com/medicina/vzaimosvyaz-kliniko-funktsionalnyh-parametrov-ekspressii-r-glikoproteina-i-apoptoza-limfotsitov-perifericheskoy-krovi-pri#ixzz6BgcU1aht (last accessed 10.12.2019).
6. Mamontova TV. Atopicheskaya bronkhialnaya astma i ustoychivost k apoptozu (Atopic bronchial asthma and resistance to apoptosis). Actual problems of modern medicine. 2008;8(4):171. URL: http://elib.umsa.edu.ua/handle/umsa/1751 (last accessed 10.10.2019).
7. Misyurin VA. Struktura i svoystva osnovnykh retseptorov i ligandov vneshnego puti apoptoza (The structure and properties of the main receptors and ligands of the external apoptosis pathway). Russian biotherapeutic magazine. 2015;14(2):23-30. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/struktura-i-svoystva-osnovnyh-retsepto rov-i-ligandov-vneshnego-puti-apoptoza (last accessed 15.10.2019).
8. Bulgakova VA. Klinicheskoye znachniye markerov aktivatsii i apoptoza immunokompetentnykh kletok pri atopicheskoy bronkhial'noy atme u detey (The clinical significance of markers of activation and apoptosis of immunocompetent cells in atopic bronchial atma in children). Pediatrics. 2009;87(2):12-18. URL:

ISSN 2307-3373 DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13

10. Агеева ЕС. Механизмы программируемой гибели лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов у больных бронхиальной астмой: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.16. 08.00.04. Томск. 2006. 162 с. URL: http://medical-diss.com/medicina/mehanizmy-programmiruemoy-gibeli-limfotsitov-eozinofilov-i-neytrofilov-u-bolnyh (дата звернення 16.10.2019).
11. Водунон Сирил Джуниор Алоде. Особенности апоптоза лимфоцитов при атопической бронхиальной астме: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. Казань. 2008. 157 с. URL: https://www.dissercat.com/content/osobennosti-apoptoza-limfotsitov-pri-atopicheskoi-bronkhialnoi-astme (дата звернення 18.10.2019).
12. Global Initiative for Asthma. Workshop Report, 2014. URL: http:www.ginasthma.com/download.asp?intId=217 (дата звернення: 08.07.2018).
13. 2018 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. URL : http://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention. (дата звернення: 08.07.2018).
14. Наказ МОЗ України від 08.10.2013 № 868 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при бронхіальній астмі». Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Бронхіальна астма». Київ: МОЗ України; 2013. 54 с.
15. Фещенко ЮІ, Ільїнська ІФ, Ареф'єва ЛВ, Курик ЛМ. Неконтрольована бронхіальна астма: сучасний стан проблеми. Астма та алергія. 2018;2:20-25. DOI: 10.31655/2307-3373-2018-2-20-25.
16. Ткач АВ, Иванова ЛА, Стеценко ЮВ. Методы обнаружения и количественной оценки апоптоза (обзор литературы). Медицина труда и промышленная экология. 2008;12:28-35. URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=12196179 (дата звернення 18.04.2017).
17. Войткова ВВ. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуриметрии. Вестник ВСНЦ СО РАМН. 2010;76(6):220-225. URL: https://cyberleninka.ru/article/v/izuchenie-apoptoza-metodom-protochnoy-tsitofluorimetrii-obzor-literatury (дата звернення 18.04.2017).
18. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: МОРИОН; 2000. 320 с.

https://cyberleninka.ru/ article/n/klinicheskoe-znachenie-izucheniya-markerov-aktivatsii-i-apoptoza-immunokompetentnyh-kletok-pri-atopicheskoy-bronhialnoy-astme-u-detey (last accessed 12.10.2019).
9. Parakhonskiy AP, Yegorova SV, Tsyganok SS. Mekhanizmy programmiruyemoy gibeli kletok perifericheskoy krovi u bolnykh bronkhialnoy astmoy (The mechanisms of programmed death of peripheral blood cells in patients with bronchial asthma). The successes of modern science. 2008;8:107–108.
10. Ageyeva YS. Mekhanizmy programmiruyemoy gibeli limfotsitov, eozinofilov i neytrofilov u bol'nykh bronkhial'noy astmoy (The mechanisms of programmed death of lymphocytes, eosinophils and neutrophils in patients with bronchial asthma): dis. ... kand. med. nauk: 14.00.16. 08.00.04. Tomsk. 2006. 162 p. URL: http://medical-diss.com/medicina/ mehanizmy-programmiruemoy-gibeli-limfotsitov-eozinofilov-i-neytrofilov-u-bolnyh (last accessed 16.10.2019).
11. Vodunon Siril Dzhunior Alode. Osobennosti apoptoza limfotsitov pri atopicheskoy bronkhial'noy astme (Features of apoptosis of lymphocytes in atopic bronchial asthma: dis. ... cand. biol. Sciences: 03.00.04): dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.04. Kazan. 2008. 157 p. URL: https://www.dissercat.com/content/osobennosti-apoptoza-limfotsitov-pri-atopicheskoi-bronkhialnoi-astme (last accessed 18.10.2019).
12. Global Initiative for Asthma. Workshop Report, 2014. URL: http:www.ginasthma.com/download.asp?intId=217 (last accessed 08.07.2018).
13. 2018 GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. URL: http://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention. (last accessed 08.07.2018).
14. Nakaz MOZ Ukraïni vid 08.10.2013 № 868 "Pro zatverdjennya ta vprovadjennya mediko-tehnologichnih dokumentiv zi standartizatsiï medichnoï dopomogi pri bronhialniy astmi. Unifikovaniy klinichniy protokol pervinnoï, vtorinnoï (spetsializovanoï) medichnoï dopomogi «Bronhialna astma» (Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 08.10.2013 № 868 «On Approval and Implementation of Medical-Technological Documents for the Standardization of Medical Aid in Bronchial Asthma». Unified clinical protocol for primary, secondary (specialized) medical care «Bronchial asthma»). Kiïv: MOZ Ukraïni. 2013;54.
15. Feschenko YuI, Ilyïnska IF, Arefieva LV, Kurik LM. Nekontrolovana bronhialna astma: suchasniy stan problemi (Uncontrolled bronchial asthma: the current state of the problem). Astma and alergy. 2018;2:20-25. DOI: 10.31655/2307-3373-2018-2-20-25.
16. Tkach AV, Ivanova LA, Stetsenko YV. Metody obnaruzheniya i kolichestvennoy otsenki apoptoza (obzor literatury) (Methods of detection and quantification of apoptosis (literature review)). Occupational medicine and industrial ecology. 2008;12:28-35. URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=12196179 (last accessed 18.04.2017).
17. Voytkova VV. Izucheniye apoptoza metodom protochnoy tsitofluorimetrii (The study of apoptosis by flow cytometry). Bulletin of the VSNS SB RAMS. 2010;76(6):220-225. URL: https://cyberleninka.ru/article/v/izuchenie-apoptoza-metodom-protochnoy-tsitofluorimetrii-obzor-literatury (last accessed 18.04.2017).
18. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodyi v medikobiologicheskih issledovaniyah s ispolzovaniem Excel (Statistical methods in biomedical research using Excel). K.: MORION. 2000;320.

Надійшла до редакції 19.11.2019 р.
Прийнято до друку: 21.01.2020 р.

Ю. І. Фещенко
ORCID ID
https://orcid.org/0000-0002-8933-8811

И. Ф. Ильинская
ORCID ID
https://orcid.org/0000-0001-8300-1567

Л. М. Курик
https://orcid.org/0000-0001-7873-8951

Ю. О. Матвієнко
ORCID ID
https://orcid.org/0000-0002-8539-8999

Л. В. Арефьева
ORCID ID
https://orcid.org/0000-0002-8171-0738

DOI: 10.31655/2307-3373-2020-1-5-13
ISSN 2307-3373