

Ефективність застосування лікарського засобу аргінін-карнітину у пацієнтів із опіковими ранами

О.М. Линник^{1,2}, Г.П. Козинець^{1,2}, О.О. Дядик¹, О.І. Осадча², О.М. Коваленко³, В.І. Заріцька¹

¹Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна

²Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України, Київ, Україна

³Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

Анотація. *Мета:* вивчити дію комбінованого аргінін-карнітинового лікарського засобу у пацієнтів із опіковими ранами. *Об'єкт і методи дослідження.* Обстежено 41 пацієнта: 18 з основної групи і 23 — з групи порівняння. У пацієнтів основної групи додатково до загальноприйнятої схеми лікування застосовували комбінований аргінін-карнітиновий лікарський засіб. Усім пацієнтам проводили дослідження в капілярній крові зони опіку та в периферичній крові вмісту гомоцистеїну, ендотеліну-1 та фактора некрозу пухлини- α . Проведено патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження з визначенням віментину, CD31, VEGF та панцитокератину. Дослідження проводили на 2-гу–3-тю добу (вихідний рівень), на 8-му–10-ту добу (під час лікування препаратом) і на 12–14-ту добу після травми (після завершення курсу прийому препарату). *Результати.* Відмічене значне зниження рівня фактора некрозу пухлини- α у периферичній крові пацієнтів основної групи, достовірне зниження рівня гомоцистеїну в рановій крові на 8-му–10-ту і 12–14-ту добу та достовірне зниження рівня ендотеліну-1 у периферичній крові та капілярній крові рани. Імуногістохімічне дослідження показало підвищення експресії маркерів CD31, VEGF, віментину в зоні регенерації, виражену позитивну експресію епітеліальних клітин (панцитокератин) в основній групі. *Висновки.* Застосування комбінованого аргінін-карнітинового лікарського засобу в терапії опіків сприяє зниженню інтенсивності запального процесу в опіковій рані, ризику розвитку та маніфестації ендотеліальної дисфункції, забезпечує оптимізацію перебігу ранового процесу, створює сприятливі умови для процесів репаративної регенерації у пацієнтів з опіковими ранами.

Ключові слова: термічна травма, опіки, опікова рана, ендотеліальна дисфункція, аргінін, карнітин, імуногістохімічне дослідження.

Вступ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, термічні ураження є глобальною проблемою охорони здоров'я, що становить близько 180 тис. випадків смерті щорічно. Нефатальні опіки є основною причиною захворюваності, включаючи тривалу госпіталізацію, спотворення та інвалідність, і є однією з основних причин втрати років життя з поправкою на інвалідність (disability-adjusted life year — DALY) у країнах з низьким і середнім рівнем доходу [1]. Незважаючи на досягнення репаративної медицини, питання якнайшвидшого повного загоєння опікових ран залишається актуальним. Пацієнти з опіками втрачають основний бар'єр для інфекції — шкіру, тому ризик інфікування зберігається до тих пір, поки цей бар'єр відсутній [2]. Однією з основних причин у структурі летальності при глибоких опіках є розвиток вторинної бактеріальної інфекції [3]. Інфекційні ускладнення опікової травми є наслідком порушеного перебігу ранового процесу та пригнічення природних захисних систем організму. При цьому результати лікування пацієнтів з опіками безпосередньо залежать від можливості та термінів усунення токсичного вмісту опікової рани та процесу її загоєння [4]. Переривання, зміни або пролонгація процесу можуть призвести до затримки регенеративної репарації з подальшим рубцюванням або до хронічних пошкоджень, які не загоюються. Тому пошук нових лікарських засобів, призначених для корекції ранового процесу і лікування ран, є актуальним і своєчасним.

Тяжкі опіки викликають складну реакцію організму. Як правило, одразу після термічного пошкодження запальна реакція є першою фазою відповіді і запускається для сприяння процесу загоєння. У цю фазу активатор транскрипції (протеїн), нуклеарний фактор- κ B, активується для регулювання індукції кількох прозапальних медіаторів, включаючи фактор некрозу пухлини (tumor necrosis factor — TNF)- α і молекулу міжклітинної адресії-1. Ці медіатори активують нейтрофільні гранулоцити та моноцити і запускають антимикробну активність. Крім того, TNF- α відповідає за секрецію інших прозапальних медіаторів, включаючи інтерлейкіни-1 і -6 та індукцію клітинного апоптозу в ділянці рани. Термічні ураження посилюють гіперметаболізм, що призводить до збільшення продукції прозапальних цитокінів та активних форм кисню (АФК). При тяжких опіках запальний процес може бути поширеним і стати неконтрольованим, призводячи до збільшення вираженості запалення, яке викликає генералізований катаболічний стан і сповільнене загоєння. Виражена гіперметаболічна реакція пов'язана зі збільшенням числа випадків органної недостатності, інфекцій і навіть смерті [5, 6].

Опікова травма зазвичай призводить до дистрибутивного шоку, аномального фізіологічного стану, при якому перфузія тканин і доставка кисню серйозно порушуються внаслідок значного капілярного витоку рідини з внутрішньосудинного в інтерстиціальний простір, що викликає глибокий набряк тканин і накопичення рідини. Ці ефекти, ймовірно, є результатом складної взаємодії між прямим впливом тепла на мікроциркуляцію та дією хімічних медіаторів, у тому числі АФК, які пошкоджують ендотелій

судин і викликають ендотеліальну дисфункцію (ЕД) [7]. Активована прозапальними цитокинами ендотеліальна клітина секретує білки теплового шоку, які, у свою чергу, посилюють продукцію прозапальних цитокинів [8]. Відбувається вивільнення ендотеліну, серед якого найбільшу вазоконстрикторну дію спричиняє ендотелін-1. На додаток до впливу ендотеліну-1 на клітини гладких м'язів судин пептид усе більше визнають прозапальним цитокином [9, 10]. Цей пептид також стимулює моноцити до вироблення простагландину E_2 , TNF- α , інтерлейкіну-6 та -8, а також речовин, які стимулюють вироблення супероксиду нейтрофільними гранулоцитами. Ендотелін-1 викликає агрегацію тромбоцитів і відіграє роль у підвищенні експресії молекул адгезії лейкоцитів, синтезі медіаторів запалення, що зумовлює судинну дисфункцію [11].

Численні дослідження свідчать, що гомоцистеїн чинить несприятливий вплив, порушуючи функцію ендотелію [12], в тому числі через опосередкування втрати критичних ендотеліальних антиоксидантних систем, і підвищує внутрішньоклітинну концентрацію АФК, що викликає оксидативний стрес [13, 14]. Гомоцистеїнемія важлива не лише як фактор пошкодження ендотелію, а й як негативний фактор, що спричиняє дисрегуляцію судинного тону, порушення ліпідного обміну та патологію судинно-тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу [13]. Одним із методів оцінки ЕД є визначення вмісту вазоактивних речовин у крові або визначення вмісту в крові факторів ендотеліального пошкодження, рівень яких корелює з ЕД [15].

В ендотеліальних клітинах оксид азоту необхідний для судинного гомеостазу. Зниження біодоступності оксиду азоту в результаті зниження його продукції та/або збільшення розпаду оксиду азоту супероксидним аніоном означає початок ЕД [16]. Оксид азоту також виконує життєво важливу роль у виживанні клітин шляхом поглинання вільних радикалів та інгібування бактеріальної інвазії. Оскільки АФК можуть взаємодіяти та інактивувати оксид азоту, судинний оксидативний стрес може призвести до зниження його біодоступності. Стимуляція синтезу оксиду азоту являє собою альтернативний і потенційно ефективний підхід до лікування, наприклад, шляхом забезпечення додаткових субстратів для NO-синтази.

Аргінін (L-аргінін) — амінокислота, яка бере участь у ряді біологічних процесів, включаючи біосинтез білків, імунну відповідь хазяїна, цикл сечовини та виробництво оксиду азоту [17]. Це напівнезамінна або умовно незамінна амінокислота, оскільки вона може бути синтезована здоровими людьми, але під час стресу чи хвороби ця амінокислота стає незамінною. Оскільки L-аргінін діє як субстрат для ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS), введення аргініну може посилити утворення оксиду азоту та запобігти ЕД. Додавання аргініну в схеми лікування випробувано при багатьох серцево-судинних захворюваннях, а також при лікуванні хронічних ран як потенційна терапевтична стратегія [18–20], проте недостатньо інформації про застосування аргініну в лікуванні опікових уражень.

Карнітин — гідрофільний четвертинний амін, який відіграє важливу роль в енергетичному метаболізмі шляхом перенесення довголанцюгових жирних кислот через внутрішню мітохондріальну мембрану для подальшого β -окиснення [21]. Нещодавні дослідження почали проливати світло на сприятливий вплив L-карнітину при застосуванні в різних клінічних методах лікування. Оскільки L-карнітин і його ефіри допомагають зменшити вираженість оксидативного стресу, вони були запропоновані для лікування багатьох станів, включаючи спричинені

не опіком клітинне та мітохондріальне пошкодження гепатоцитів і ниркових клітин тощо [22, 23].

На основі вивчених нами літературних даних досліджено параметри запалення, ЕД та порушення білкового обміну у пацієнтів з опіковими травмами. Відповідно до необхідності підвищення якості трансфузійної терапії при здійсненні хірургічного лікування в гострий період опікової хвороби нами розроблено патогенетично обґрунтовану схему лікування із застосуванням сучасного аргінін-карнітинового трансфузійного препарату.

Мета: вивчити дію комбінованого аргінін-карнітинового лікарського засобу у пацієнтів з опіковими ранами.

Об'єкт і методи дослідження

Для вивчення дії комбінованого аргінін-карнітинового препарату обстежено 41 пацієнта віком 19–58 років з опіками 20–45% (глибокі опіки до 10%), з них 18 пацієнтів основної групи та 23 — групи порівняння.

Критерії включення в дослідження: пацієнти з поверхневими та глибокими термічними опіками загальною площею від 10% поверхні тіла, чоловіки та жінки віком 18–65 років.

Критерії невключення в дослідження: відмова від участі в дослідженні, наявність супутніх захворювань у стадії декомпенсації, онкологічні захворювання, вік <18 років і >65 років, загальна площа опіків <10% поверхні тіла, хімічні опіки та загальна високовольтна електротравма, період вагітності та годування грудьми.

Під час дослідження виконані всі стандартні загальноприйняті схеми медикаментозного та хірургічного лікування пацієнтів з опіками залежно від площі та глибини ураження. До основних маніпуляцій і процедур при лікуванні опіків належать катетеризація вен, сечового міхура і шлунка за необхідності; накладання пов'язок на опікові поверхні, внутрішньовенне введення синтетичних плазмозамінників, плазми крові та препарату альбуміну, антибіотиків широкого спектра дії та знеболювальних препаратів. Також залежно від площі, глибини та загального стану опіку проводили оперативне лікування у вигляді розтину опікових поверхонь, видалення нежиттєздатних тканин для очищення рани та подальшої обробки у вигляді пересадки шкіри або тимчасового закриття шкіри замінниками з подальшою пересадкою шкіри.

В обох досліджуваних групах застосовували традиційні схеми лікування [24]. Відмінність основної групи від групи порівняння полягала в тому, що в ній, окрім наведеної схеми медикаментозного та хірургічного лікування, застосовували препарат аргінін-карнітину.

Усі пацієнти підписали інформовану згоду, яка передбачала заходи щодо дотримання принципів медичної етики та безпеки для здоров'я пацієнта, його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до Гельсінської декларації прав людини, Європейської конвенції Ради про захист прав людини прав і біомедицини та законів України.

Застосування препарату левокарнітину-аргініну розпочали з 2–3-ї доби після опікової травми протягом 5 днів внутрішньовенно крапельно, зі швидкістю до 30 крапель за 1 хв, в обсязі 100 мл 1 раз на добу. Комбінований препарат аргінін-карнітину, що містить 2,0 г левокарнітину та 4,2 г L-аргініну гідрохлориду в 100 мл, зареєстрований та схвалений Міністерством охорони здоров'я України. Препарат добре переносився пацієнтами, не викликав алергічних реакцій та місцевих чи загальних ускладнень.

Дослідження проводили в гострий період опікової хвороби: ранній післяшоковий період на 2-гу–3-тю добу (вихідний рівень), на 8-му–10-ту добу та на 12–14-ту добу після травми (після завершення курсу застосування препарату). В усіх пацієнтів досліджували рівень гомоцистеїну, ендотеліну-1 та TNF- α в капілярній крові зони термічного ураження та периферичній крові. Рівень гомоцистеїну та ендотеліну-1 в сироватці крові з трилоном-В визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою набору «Homocystein EIA kit 110-AXH00001» («Axis-Shield», Велика Британія) та з використанням сорбційних колонок «Amprer» на автоматичному імуноферментному аналізаторі «Immulaite-2000» [25–27].

Досліджуваним матеріалом були також фрагменти шкіри з прилеглою підшкіркою клітковиною, взяті в ділянці опікового ураження за допомогою одноразових пристроїв для punch-біопсії «EPITHEASY» діаметром 6,00–8,00 мм. Матеріал направляли на патоморфологічне дослідження, яке проводили на базі кафедри патологічної анатомії та судової медицини Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика. Фрагменти шкіри фіксували в 10% розчині нейтрального забуференого формаліну протягом 24–36 год. Після фіксування матеріалу проводили стандартну процедуру в апараті «Excelsior AS» («Thermo Fisher Scientific», Велика Британія). З отриманих парафінових блоків на ротаційному мікротомі HM 325 (ThermoShandon, Велика Британія) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 2–3 мкм, які забарвлювали гематоксиліном та еозином за ван Гізеном, для встановлення особливостей регенерації сполучнотканинного компонента [28, 29].

Проведено імуногістохімічне дослідження (ІГХД), яке виконували на адгезивних скельцях «Super Frost Plus» («Menzel», Німеччина). Використовували систему детекції «Master Polymer Plus Detection» («Peroxidase», хромоген ДАБ) («Master Diagnostica», Іспанія), для високотемпературної обробки епітопів антигенів цитратний буфер (pH 6,0), EDTA буфер (pH 8,0). Для визначення наявності, кількості, стану судин використовували мишачі моноклональні антитіла до CD31 (clone JC/7A); для визначення активності ангіогенезу досліджували судинний ендотеліальний фактор росту VEGF [30] з кролячим поліклональним антитілом («Thermo Scientific»); як критерій ефективності процесів регенерації використовували сполучнотканинний маркер кролячій моноклональні антитіла до віментину Ab-2 (Vimentin) (Clone SP20); оцінку регенерації епітеліальної тканини проводили за допомогою загального цитокератину (PanCK AE1/AE3, Clone Ab-1, «Master Diagnostica»,

Іспанія) [31, 32]. Оцінку вираженості експресії маркерів проводили напівкількісним методом [33].

Морфометричне дослідження включало вимірювання кількості позитивних клітин на 100 клітин у 10 полях зору при збільшенні $\times 200$ та площі позитивних клітин. Мікроскопічне дослідження та фотоархівування проводили за допомогою світлових оптичних мікроскопів «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки даних «Axio Imager. A2» з об'єктивами 5x, 10x, 20x, 40x, біокулярною насадкою 1,5 та окулярів 10 з камерою «ERc 5s.» та «ZEISS» (Німеччина) з системою обробки даних «Primo Star» з планохроматичними об'єктивами ZEISS «Plan-Achromat» 4x, 10x, 40x з камерою «AxioCam 105color».

Статистичну обробку отриманих даних проведено за допомогою структурного та порівняльного аналізу з використанням комп'ютерних програм «Microsoft Excel», «Statistica 64» та «Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health». Дані подавали шляхом обчислення середнього значення та його помилки ($M \pm m$). Визначення нормальності вибірок проводили за допомогою тесту Шапіро — Вілкса. Результати обробляли із застосуванням методу варіаційної статистики за критерієм t Стьюдента для вибірок з нормальним розподілом з обчисленням показника довірчої ймовірності «р» (параметричний критерій).

Результати

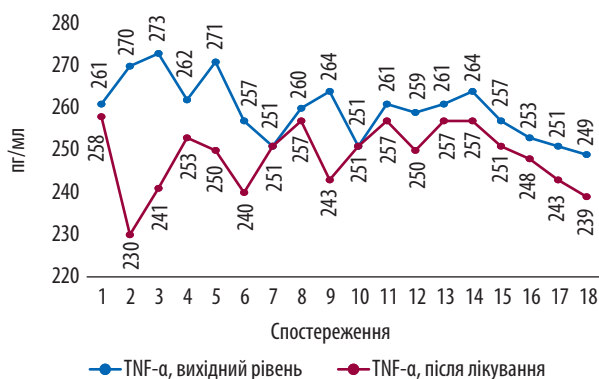
Особливе значення серед прозапальних цитокинів при опіковій травмі має TNF- α , який бере участь у вазодилатації та утворенні набряку та адгезії лейкоцитів до епітелію через експресію молекул адгезії, викликає метаболічне виснаження, мікросудинну гіперкоагуляцію та гемодинамічні розлади, зумовлює розвиток оксидативного стресу в осередках запалення. Рівень TNF- α є високоінформативним імунологічним показником наявності запального процесу.

Визначили початкові рівні TNF- α в сироватці крові та гомоцистеїну у крові опікової рани на 2–3-й день після опікової травми (до початку застосування препарату) та відповідні рівні показників після завершення курсу застосування препарату аргініну-карнітину у пацієнтів основної групи представлено на рис. 1.

На рис. 1 показано, що після курсу лікування аргінін-карнітиновим препаратом рівень TNF- α у периферичній крові значно знижується ($p=0,00041$). Після закінчення курсу прийому препарату виявили значне зниження рівня гомоцистеїну у крові з опікової рани ($p<0,0001$).

Встановлено, що у пацієнтів основної групи на 2-гу–3-тю добу після травми показники вмісту гомоцистеїну

Рисунок 1 Динаміка рівнів TNF- α в сироватці крові та гомоцистеїну у крові опікової рани до початку лікування препаратом (вихідний рівень) та після закінчення курсу застосування (після лікування) у 18 пацієнтів основної групи



Таблиця 1 Показники вмісту гомоцистеїну в капілярній крові зони ураження у пацієнтів з опіками, M±m

Показник	Строки дослідження, доба			Референтні значення
	2-га–3-тя	8-ма–10-та	12–14-та	
Основна група (n=18)				
Гомоцистеїн, мкмоль/л	44,4±1,8*	30,5±1,6***,****	22,7±1,5***,****	10,2±0,5
Група порівняння (n=15)				
Гомоцистеїн, мкмоль/л	43,3±1,7*	40,5±2,6*	38,2±2,4*	10,2±0,5

*Вірогідно порівняно з референтними показниками (p<0,0001); **вірогідно порівняно з показниками групи порівняння (p<0,0001); ***вірогідно порівняно з вихідними показниками (p<0,0001).

Таблиця 2 Показники вмісту ендотеліну-1 у периферичній та капілярній крові ураженої ділянки у пацієнтів основної групи (n=18) та групи порівняння (n=23), M±m

Показник	Основна група			Група порівняння			Референтні значення
	Доба після опікової травми						
	2-га–3-тя	8-ма–10-та	13–14-та	2-га–3-тя	8-ма–10-та	13–14-та	
Ендотелін-1, периферична кров, у.о.	3,43±0,56*	2,97±0,56***	2,27±0,46***	3,25±0,37*	5,20±0,44***,****	5,09±0,36***,****	0,9±0,1
Ендотелін-1, капілярна кров зони ураження, у.о.	5,17±0,22*	4,51±0,23***,****	3,43±0,25***,****	4,92±0,3*	7,9±0,2***,****	6,6±0,1***,****	0,9±0,1

*Вірогідно порівняно з референтними показниками (p<0,05); **вірогідно порівняно з показниками групи порівняння (p<0,05); ***вірогідно порівняно з вихідними показниками (p<0,05).

у капілярній крові опікової ділянки визначалися в межах 44,4±1,8 мкмоль/л (табл. 1).

При визначенні вмісту гомоцистеїну на 8-му–10-ту добу після травми в пацієнтів основної групи встановлено зниження його концентрації відносно вихідних значень у 1,46 раза (p<0,0001). При цьому у пацієнтів групи порівняння показники вмісту гомоцистеїну в капілярній крові зони опіку перевищували значення основної групи в 1,33 раза (p<0,05). На 12–14-ту добу після травми відмічена тенденція до подальшого зниження вмісту гомоцистеїну в капілярній зоні ураження у пацієнтів основної групи по відношенню до вихідних значень. Досліджувані показники були в 1,96 раза нижчими (p<0,0001) за вихідні у пацієнтів основної групи та в 1,13 раза — групи порівняння.

Вивчена динаміка рівня такого маркера ЕД, як ендотелін-1, у периферичній крові та капілярній крові опікової рани, як при використанні основної схеми терапії (група порівняння), так і при додатковому застосуванні аргінін-карнітинового препарату (основна група) показана на рис. 2.

Вихідний рівень ендотеліну-1 в опіковій рані перевищував початковий рівень у периферичній крові як в основній групі, так і в групі порівняння. У подальшому при застосуван-

ні аргінін-карнітинового препарату відмічена виражена динаміка зниження ендотеліну-1 як у периферичній крові, так і в капілярній крові опікової рани, тоді як у групі хворих, де застосовували лише базисну терапію, таких змін не виявили.

Рівень ендотеліну-1 у периферичній крові в основній групі мав тенденцію до зниження на 8-му–10-ту добу після опікової травми та продовжував знижуватися на 13–14-ту добу, тоді як у групі порівняння — достовірно підвищувався порівняно з вихідним рівнем. Рівень ендотеліну-1 у капілярній крові ділянки ураження в основній групі достовірно знижувався на 8-му–10-ту та 13–14-ту добу, тоді як у групі порівняння — достовірно підвищувався порівняно з вихідним рівнем. При порівнянні показників ендотеліну-1 периферичної крові та капілярної крові зони ураження в основній групі з відповідними показниками ендотеліну-1 на 8-му–10-ту добу відмічено, що в групі порівняння рівні ендотеліну-1 були в 1,75 раза вищими. На 13–14-ту добу рівень ендотеліну-1 капілярної крові рани в основній групі був в 1,92 раза нижчим за відповідний показник групи порівняння, а периферичної крові — у 2,24 раза нижчим, ніж у групі порівняння.

Для підтвердження ефективності аргінін-карнітинового препарату проведено ІГХД фрагментів шкіри з підшкірною клітковиною, взятих у ділянці опіку. Дослідження проводили в динаміці курсу лікування препаратом. Динаміку вмісту віментину, що відображає частку позитивно забарвлених клітин, можна продемонструвати на прикладі пацієнта П., 41 рік (рис. 3).

Як представлено на рис. 4, на 7-му добу після опікової травми (що відповідає 5-му дню застосування препарату аргінін-карнітину) виявлено значне збільшення (у 2 рази) частки віментинпозитивно забарвлених клітин та динаміку до підвищення цього показника на 14-ту добу після травми.

У дослідженні також вивчали динаміку PECAM-1 (відомого як CD31), який значно експресується в міжклітинних з'єднаннях ендотеліальних клітин. Особливості експресії CD31 в зоні регенерації у пацієнта основної групи наведено на рис. 5.

Динаміку експресії CD31 (PECAM-1), що відображає позитивне забарвлення ендотеліальних клітин судин дрібного та середнього калібру, продемонстровано на прикладі пацієнта С. (рис. 6). На рис. 6 показано, що на 8-му

Рисунок 2 Динаміка рівня ендотеліну-1 у периферичній крові та капілярній крові опікової рани пацієнтів основної групи та групи порівняння

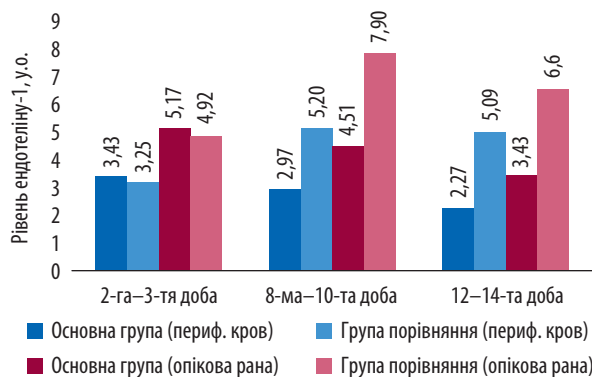


Рисунок 3 Дифузно-вогнищева експресія в дермі, навколо судин рецепторів віментинпозитивних клітин на 5-ту добу лікування препаратом. ІГХД з моноклональними антитілами до віментину. Збільшення $\times 200$

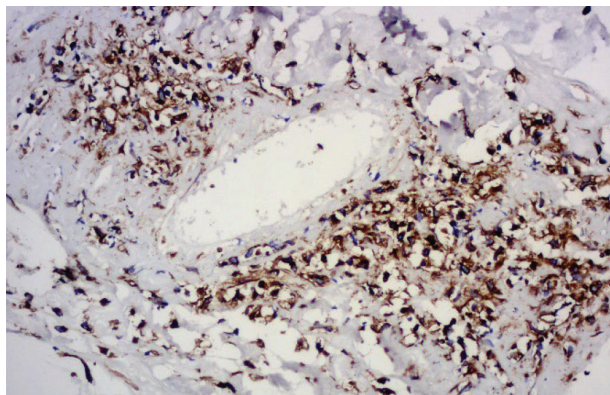
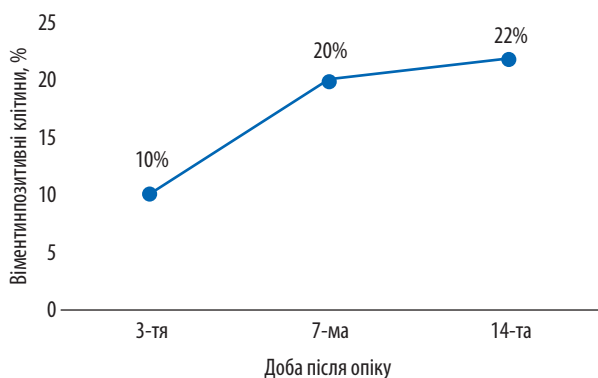


Рисунок 4 Динаміка вмісту віментинпозитивних клітин у пацієнта П. у процесі лікування досліджуванним препаратом



добу після опікової травми при лікуванні препаратом зафіксовано збільшення середньої кількості судин у полі зору, на 12-ту добу вміст CD31 позитивних клітин збільшився у 1,3 раза порівняно з вихідним рівнем.

При визначенні активності ангиогенезу на 7–8-му добу після дії термічного чинника досліджували ендотеліальний фактор росту VEGF, встановлено позитивно забарвлені клітини в поверхневих відділах дерми та навколо придатків шкіри (рис. 7).

Так, за результатами ІГХД встановлено, що кількість судин з урахуванням мікроциркуляторного русла має тенденцію до збільшення, про що свідчить експресія маркера мікроциркуляторного русла CD31 — від 14,2 на 2-гу–3-тю добу до 16,0 позитивно забарвлених клітин у полі зору на 7–8-му добу, а маркер ангиогенезу VEGF — від 12,4% на 2-гу–3-тю добу до 13,0% забарвлених клітин у полі зору на 7–8-му добу.

Для відображення особливостей регенерації епітеліальної тканини проведено ІГХД з маркером загального цитокератину (PanCK), що представлено на рис. 8 на 4-ту та 9-ту добу від початку лікування препаратом аргінін-карнітину.

Проведене ІГХД з маркером епітеліальних клітин — загальним цитокератином (PanCK AE1/AE3), дозволило показати можливості регенерації епітелію на різних термінах лікування.

У пацієнтів основної групи середня загальна площа опікового ураження становила $26,56 \pm 12,53\%$ поверхні тіла, у пацієнтів групи порівняння — $22,36 \pm 9,92\%$ п.т. При проведенному

аналізі визначено, що лікування із застосуванням комбінованого аргінін-карнітинового лікарського засобу на додаток до стандартної терапії у пацієнтів основної групи забезпечило значне зменшення площі глибоких опіків, яка становила $8,6 \pm 5,70\%$ порівняно з $9,59 \pm 7,25\%$ групи порівняння за рахунок ендотеліотропної дії препарату. При цьому також відмічене зниження в 1,27 раза середньої площі висічення глибоких опіків у пацієнтів основної групи ($5,52 \pm 2,17\%$) порівняно з $7,0 \pm 4,14\%$ групи порівняння ($p < 0,05$), що, відповідно, потребувало зменшеної площі закриття ранової поверхні при аутодермопластиці $3,77 \pm 1,36\%$ в основній групі та $4,06 \pm 2,06\%$ у групі порівняння ($p < 0,05$). У групі порівняння середня кількість хірургічних втручань становила 3,9 на одного пацієнта, з них 1,38 некретомії та 2,52 АДП. В основній групі середня кількість хірургічних втручань становила 3,17 на одного пацієнта (що в 1,2 раза менше за відповідний показник групи порівняння), з них 1,3 — некретомії (ранні та етапні) та 1,83 АДП. Середній термін перебування пацієнта в стаціонарі в групі порівняння становив 61,43 доби, в основній групі — 45,13 доби, що в 1,36 раза менше групи порівняння ($p = 0,042$).

Обговорення

За результатами дослідження, у групі пацієнтів, в яких застосовували курс препарату аргініну-карнітину, відміче-

Рисунок 5 У зоні регенерації виражена позитивна експресія ендотеліальних клітин судин мікроциркуляторного русла, вогнищево судин середнього калібру, зони неоангіогенезу в дермі, сегментарно позитивні клітини в дермі на 5-ту добу лікування препаратом (8-ма доба з моменту травми). ІГХД з моноклональними антитілами до CD31. Збільшення $\times 100$

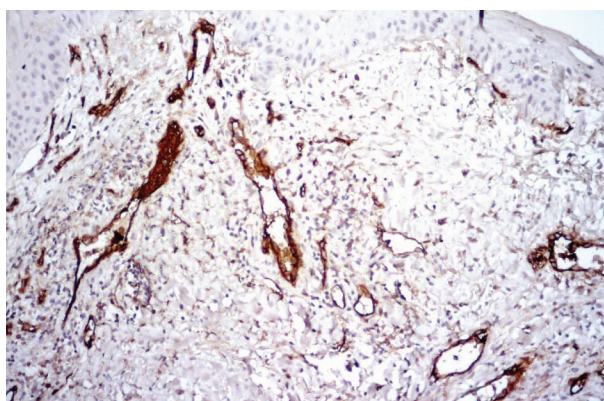


Рисунок 6 Динаміка вмісту CD31-позитивних клітин у пацієнта С. під час лікування препаратом

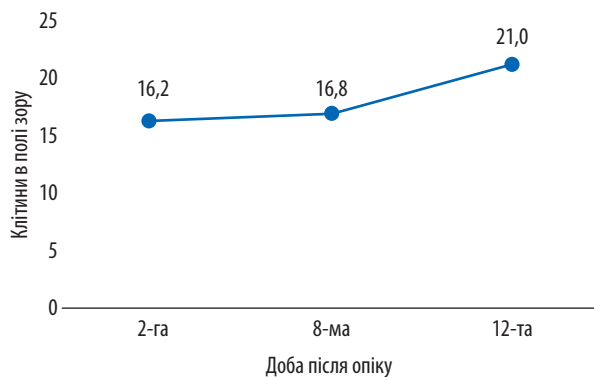


Рисунок 7 Експресія судинного ендотеліального фактора росту в глибоких відділах дерми на 8-му добу після травми (5-та доба застосування препарату). ІГХД до VEGF. Збільшення $\times 200$

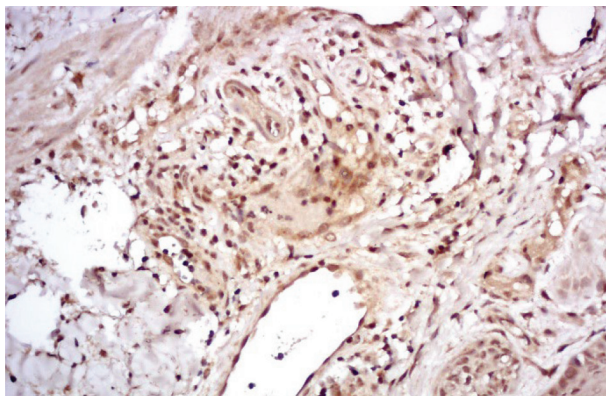
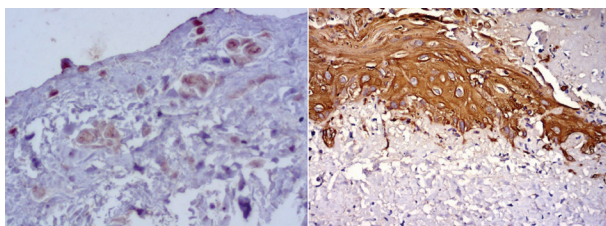


Рисунок 8 Позитивна експресія поодиноких епітеліальних клітин у зоні початку епідермізації на 4-ту добу лікування препаратом (7-ма доба після травми) (ліворуч). ІГХД з МКА до PanCK (AE1/AE3). Збільшення $\times 400$. Виражена позитивна експресія шару епітеліальних клітин в зоні епідермізації на 9-ту добу від початку лікування (праворуч). ІГХД з МКА до PanCK (AE1/AE3). Збільшення $\times 200$



но зниження рівня прозапального цитокіну TNF- α в периферичній крові, що свідчить про зниження інтенсивності запального процесу. Визначені вихідні рівні гомоцистеїну у пацієнтів основної групи та групи порівняння, і в обох групах значення перевищували референтні в 4,3 раза.

Гомоцистеїн — проміжний продукт, який утворюється в процесі метаболізму амінокислоти метіоніну та є фактором ризику розвитку судинних ускладнень. Підвищена концентрація гомоцистеїну чинить цитотоксичну дію. При окисненні гомоцистеїну в плазмі периферичної крові утворюється велика кількість кисневих радикалів, що суттєво пошкоджує ендотелій судин, підвищує агрегацію тромбоцитів і не тільки викликає пошкодження ендотелію, але й впливає на формування та підтримку системної запальної відповіді та пов'язане з підвищенням концентрації в крові основних маркерів запалення (фібриногену, інтерлейкіну-6 і CRP) [34]. Гомоцистеїнемія супроводжується значним підвищенням продукції тканинного фактора, зниженням активності природних антикоагулянтів і тканинного активатора плазміногену, що має суттєве значення в розвитку ускладнень у пацієнтів з опіками. Гомоцистеїн чинить як пряму цитотоксичну дію на ендотелій, так і має здатність пошкоджувати опосередковано через інші молекули. Він провокує перекисне окиснення ліпідів під дією вільних радикалів і пошкодження апопротеїнів [35]. Окиснені ліпіди стимулюють експресію прозапальних цитокінів, безпосередньо інактивують оксид

азоту і є цитотоксичними для ендотеліальних клітин [36]. При цьому зростає споживання оксиду азоту, який використовується для нейтралізації гомоцистеїну. Невикористаний гомоцистеїн піддається окисненню з утворенням H_2O_2 , супероксидних і гідроксильних радикалів, які пошкоджують ендотелій. Після закінчення курсу застосування препарату у пацієнтів основної групи зафіксоване значне зниження рівня гомоцистеїну у крові з опікової рани ($p < 0,0001$), що свідчить про зменшення вираженості його цитотоксичної дії та відновлення проникності судин. Також у пацієнтів основної групи під час лікування відмічено достовірне зниження вмісту гомоцистеїну в капілярній крові зони термічного ураження, тоді як у групі порівняння високий рівень гомоцистеїну залишався без достовірних змін, що свідчить про значну ендотеліотропну дію застосовуваного аргінін-карнітинового препарату.

При вивченні динаміки рівня такого маркера ЕД, як ендотелін-1, у периферичній крові та капілярній крові опікової рани визначено достовірне зниження (в 1,51 раза на 13–14-ту добу після травми) його рівня у пацієнтів основної групи, в той час як у групі порівняння виявлено значне підвищення його рівня як у периферичній крові, так і капілярній крові рани. Таким чином, при застосуванні аргінін-карнітинового препарату в основній групі зафіксоване виражене зниження рівня прозапального та вазоконстрикторного цитокіну ендотеліну-1 в периферичній крові та в капілярній крові рани, що призводить до збільшення перфузії в зоні опіку і може сприяти покращанню ангиогенезу та процесів репаративної регенерації.

Як критерій ефективності процесів регенерації використали визначення віментину, що відіграє суттєву роль у численних клітинних процесах, таких як клітинна адгезія, міграція та інвазія, передача сигналів, диференціювання, цитоскелетні перебудови та регуляція клітинної морфології та пластичності. Таким чином, він має визначену роль у розвитку шкіри та процесах загоєння ран [32]. У дослідженні встановлено, що при застосуванні препарату аргінін-карнітину експресія сполучнотканинного маркера віментину зростає вдвічі з 10 до 20% позитивно забарвлених клітин загального поля зору, з чого можна зробити висновок про створення сприятливих умов для процесів регенерації, для яких провідним фактором є адекватна васкуляризація.

Виявлена динаміка PECAM-1 (CD31), який значно експресується в міжклітинних з'єднаннях ендотеліальних клітин, функціонує як механосенсор, підтримує цілісність з'єднань між ендотеліальними клітинами, пригнічує активацію тромбоцитів, пригнічує цитокінову продукцію та відповідь [37, 38], відмічена динаміка до збільшення вмісту CD31-позитивних клітин при застосуванні препарату аргінін-карнітину, що відіграє значну роль у регуляції запального процесу в опікових ранах. Також встановлено, що при застосуванні препарату аргінін-карнітину як донатора оксиду азоту забезпечується експресія VEGF, який є ключовим елементом ангиогенезу. Проведене ІГХД з маркером епітеліальних клітин — загальним цитокератином (PanCK AE1/AE3), дало змогу показати можливість регенерації епітелію на різних термінах лікування у пацієнтів основної групи.

Висновки

1. Застосування в терапії опіків комбінованого препарату аргінін-карнітину сприяє зниженню інтенсивності запального процесу в опіковій рані, ризику розвитку та мані-



фестації ЕД, що підтверджено вірогідним зниженням рівня TNF- α в периферичній крові, рівнів гомоцистеїну та ендотеліну-1 в периферичній крові та капілярній крові опікової рани.

2. Встановлено за допомогою ІГХД з маркерами загального цитокератину та віментину, що під час лікування із застосуванням препарату відбуваються епідермізація ранової поверхні, відновлення підлеглих структур у дермі, що забезпечує оптимізацію перебігу ранового процесу.

3. Отримані результати проведеного ІГХД з використанням судинних маркерів CD31, VEGF дозволили встановити, що застосування препарату аргінін-карнітину створює сприятливі умови для процесів репаративної регенерації, для яких адекватна васкуляризація є провідним фактором.

4. Застосування в комплексному лікуванні пацієнтів з опіками комбінованого аргінін-карнітинового лікарського засобу пригнічує надмірне запалення, сприяє гальмуванню розвитку дисфункції ендотелію у пацієнтів у ранній період опікової хвороби, що в подальшому сприяє покращанню результатів хірургічного лікування опікових ран, зменшенню кількості хірургічних втручань, поліпшенню приживлення та загоєння ран, зменшенню терміну перебування пацієнтів у стаціонарі.

Перспективи подальших досліджень

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні вивчення дії ендотеліотропних лікарських засобів (в тому числі препарату аргінін-карнітину) у пацієнтів з опіками.

Конфлікт інтересів

Відсутній.

Список використаної літератури

- World Health Organization (2018) Global Health Estimates. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns.
- Mofazzal Jahromi M.A., Sahandi Zangabad P., Moosavi Basri S.M. et al. (2018) Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 123: 33–64. DOI: 10.1016/j.addr.2017.08.001.
- D'Abbondanza J.A., Shahrokhi S. (2021) Burn Infection and Burn Sepsis. *Surg. Inf.*, 22(1): 58–64. DOI: 10.1089/sur.2020.102.
- Kozinets H.P., Osadcha O.I., Kovalenko O.M., Lynnyk O.M. (2019) Wound process influence on formation systemic inflammatory response and early sepsis in patients with burns in acute period of burn disease. *Mod. Med. Technol.*, 41(2): 13–20. DOI: 10.34287/MMT.2(41).2019.33.
- Jeschke M.G., van Baar M.E., Choudhry M.A. et al. (2020) Burn injury. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 6(1): 11. DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5.
- Roshangar L., Soleimani Rad J., Kheirjou R. et al. (2019) Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Wounds*, 31(12): 308–315.
- Incalza M.A., D'Orta R., Natalicchio A. et al. (2018) Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vasc. Pharmacol.*, 100: 1–19. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
- Lynnyk O.M., Osadcha O.I., Kozynets H.P. et al. (2021) Features of the immune response to thermal trauma. *Fiziol. Zh.*, 67(6): 32–39. DOI: 10.15407/fz67.06.032.
- Wang L., Cheng C.K., Yi M. et al. (2022) Targeting endothelial dysfunction and inflammation. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 168: 58–67. DOI: 10.1016/j.jmcc.2022.04.011.
- Brewster L.M., Garcia V.P., Levy M.V. et al. (2020) Endothelin-1-induced endothelial microvesicles impair endothelial cell function. *J. Appl. Physiol.*, 128(6): 1497–1505. DOI: 10.1152/japplphysiol.00816.2019.
- Taneja G., Sud A., Pendse N. et al. (2019) Nano-medicine and Vascular Endothelial Dysfunction: Options and Delivery Strategies. *Cardiovasc. toxicol.*, 19(1): 1–12. doi.org/10.1007/s12012-018-9491-x.
- Kim J., Kim H., Roh H., Kwon Y. (2018) Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch. Pharm. Res.*, 41(4): 372–383. DOI: 10.1007/s12272-018-1016-4.
- Esse R., Barroso M., Tavares de Almeida I., Castro R. (2019) The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(4): 867. DOI: 10.3390/ijms20040867.
- Kaplan P., Tatarikova Z., Sivonova M.K. et al. (2020) Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(20): 7698. DOI: 10.3390/ijms21207698.
- Djuric D., Jakovljevic V., Zivkovic V., Srejovic I. (2018) Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 96(10): 991–1003. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0112.
- Medina-Leyte D.J., Zepeda-García O., Domínguez-Pérez M. et al. (2021) Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(8): 3850. DOI: 10.3390/ijms22083850.
- Gambardella J., Khondkar W., Morelli M.B. et al. (2020) Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines*, 8(8): 277. DOI: 10.3390/biomedicines8080277.
- Akar E., Emon S.T., Uslu S. et al. (2019) Effect of L-Arginine Therapy on Vasospasm: Experimental Study in Rats. *World Neurosurg.*, 132: e443–e446. DOI: 10.1016/j.wneu.2019.08.119.
- Arribas-López E., Zand N., Ojo O. et al. (2021) The Effect of Amino Acids on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis on Arginine and Glutamine. *Nutrients*, 13(8): 2498. DOI: 10.3390/nu13082498.
- Haghighatdoost F., Jabbari M., Hariri M. (2019) The effect of L-carnitine on inflammatory mediators: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 75(8): 1037–1046. DOI: 10.1007/s00228-019-02666-5.
- Virmani M.A., Cirulli M. (2022) The Role of L-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(5): 2717. DOI: 10.3390/ijms23052717.
- Tian X.X., Kong W.C., Li P.T. et al. (2020) Effects of early supplement of exogenous L-carnitine on renal function in severely scalded rats. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 36(7): 553–559. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200203-00038.
- Li P., Xia Z., Kong W. et al. (2021) Exogenous L-carnitine ameliorates burn-induced cellular and mitochondrial injury of hepatocytes by restoring CPT1 activity. *Nutr. Metab. (Lond.)*, 18(1): 65. DOI: 10.1186/s12986-021-00592-x.
- Markiewicz-Gospodarek A., Koziol M., Tobiasz M. et al. (2022) Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. *Int. J. Environment. Res. Publ. Health*, 19(3): 1338. DOI: 10.3390/ijerph19031338.
- Amores-Sánchez M.I., Medina M.A. (2000) Methods for the determination of plasma total homocysteine: a review. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38(3): 199–204. DOI: 10.1515/CCLM.2000.028.
- Rossi G.P., Seccia T.M., Albertin G., Pessina A.C. (2000) Measurement of endothelin: clinical and research use. *Ann. Clin. Biochem.*, 37 (Pt. 5): 608–626. DOI: 10.1258/0004563001899906.
- Sokolova L., Belchina Y., Pushkarev V. et al. (2020) The blood level of endothelin-1 in diabetic patients depending on the characteristics of the disease. *Int. J. Endocrinol. (Ukraine)*, 16(3): 204–208. DOI: 10.22141/2224-0721.16.3.2020.205267.
- Rosai J. (Ed.) (2011) *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Seven ed., Elsevier Inc, 1(2, 3): 25–93 p.
- Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C., Perkins J.A. (2015) *Robbins and cotran pathologic basis of disease (Ninth)*. Elsevier/Saunders. 1379 p.
- Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. (2019) VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6): 1248–1264. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
- Peach C.J., Mignone V.W., Arruda M.A. et al. (2018) Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(4): 1264. DOI: 10.3390/ijms19041264.

32. Battaglia R.A., Delic S., Herrmann H., Snider N.T. (2018) Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000 Res.*, 7: F1000 Faculty Rev-1796. DOI: 10.12688/f1000research.15967.1.
33. Dabbs D.J. (2021) *Diagnostic Immunohistochemistry*, 6th Ed. Theranostic and genomic applications. Elsevier, 1000 p.
34. Chi Y., Liu X., Chai J. (2021) A narrative review of changes in microvascular permeability after burn. *Ann. Transl. Med.*, 9(8): 719. DOI: 10.21037/atm-21-1267.
35. Wei J., Yu Y., Feng Y. et al. (2019) Negative Correlation Between Serum Levels of Homocysteine and Apolipoprotein M. *Curr. Mol. Med.*, 19(2): 120–126. DOI: 10.2174/1566524019666190308115624.
36. Gradinaru D., Borsari C., Ionescu C., Prada G.I. (2015) Oxidized LDL and NO synthesis—Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech. Ageing Dev.*, 151: 101–113. DOI: 10.1016/j.mad.2015.03.003.
37. Lertkiatmongkol P., Liao D., Mei H. et al. (2016) Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.*, 23(3): 253–259. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000239.
38. Luo L., Xu M., Liao D. et al. (2020) PECAM-1 protects against DIC by dampening inflammatory responses via inhibiting macrophage pyroptosis and restoring vascular barrier integrity. *Translational research. J. Lab. Clin. Med.*, 222, 1–16. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.04.005.

Effectiveness of the arginine-carnitine drug usage in patients with burn wounds

O.M. Lynnyk^{1,2}, H.P. Kozynets^{1,2}, O.O. Diadyk¹, O.I. Osadcha², O.M. Kovalenko³, V.I. Zaritska¹

¹Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²National Scientific Center of Radiation Medicine, Hematology and Oncology of NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Відомості про авторів:

Линник Олександра Миколаївна — доктор філософії, асистент кафедри комбустіології та пластичної хірургії Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, старший науковий співробітник відділення опікової травми Національного наукового центру радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України, Київ, Україна. ORCID ID: 0000-0001-9195-4843.

Козинець Георгій Павлович — доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри комбустіології та пластичної хірургії Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна. ORCID ID: 0000-0002-0960-2265.

Дядик Олена Олександрівна — доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри патологічної анатомії та судової медицини Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна. ORCID ID: 0000-0002-9912-4286.

Осадча Оксана Іванівна — кандидат біологічних наук, доцент, старший науковий співробітник відділення опікової травми Національного наукового центру радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України, Київ, Україна. ORCID ID: 0000-0001-5883-425X.

Коваленко Ольга Миколаївна — доктор медичних наук, професор кафедри хірургії № 1 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Київ, Україна. ORCID ID: 0000-0002-9636-5383.

Заріцька Валентина Іванівна — кандидат медичних наук, доцент кафедри морфології, клінічної патології та судової медицини Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна. ORCID ID: 0000-0002-8837-8213.

Адреса для кореспонденції:

Линник Олександра Миколаївна
E-mail: sandra.linnik@gmail.com

Abstract. Aim: to study the effect of the combined arginine-carnitine drug in patients with burn wounds. **Materials and methods.** 41 patients (18 in main group and 23 in comparison group) were examined. Patients of the main group received combined arginine-carnitine drug in addition to the generally accepted scheme of medical and surgical treatment. All patients underwent a study in the capillary zone of thermal injury and in the peripheral blood for the content of homocystein, endothelin-1, and tumor necrosis factor- α . The pathomorphological and immunohistochemical study was performed with the determination of vimentin, CD31, VEGF and pancytokeratin. The studies were performed on the 2–3rd day after the injury (baseline), on the 8–10th day (during combined arginine-carnitine drug treatment) and on the 12–14th day (after completion of the combined arginine-carnitine drug course). **Results.** Tumor necrosis factor- α levels in peripheral blood significantly decreased in main group. The homocystein levels in the wound blood in main group significantly decreased on the 8–10th and the 12–14th day. The endothelin-1 levels in peripheral blood and in wound blood in main group significantly decreased during the study period. The immunohistochemical study showed increased expression of markers CD31, VEGF, vimentin in the regeneration zone, pronounced positive expression of epithelial cells (pancytokeratin) in main group. **Conclusions.** The combined arginine-carnitine drug usage in burn therapy reduces the inflammatory process intensity in a burn wound, reduces the risk of development and manifestation of endothelial dysfunction, ensures wound process optimization, creates favorable conditions for reparative regeneration processes in patients with burn wounds.

Key words: thermal trauma, burn wound, endothelial dysfunction, arginine, carnitine, immunohistochemical study.

Information about authors:

Lynnyk Olexandra M. — PhD, Assistant of the Department of Combustiology and Plastic Surgery, Shupyk National Healthcare University of Ukraine; Senior Researcher of the Department of Burn Trauma, National Scientific Center of Radiation Medicine, Hematology and Oncology of NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine. ORCID ID: 0000-0001-9195-4843.

Kozynets Georgy P. — MD, PhD, DSc, Professor, Head of Department of Combustiology and Plastic Surgery, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine. ORCID ID: 0000-0002-0960-2265.

Dyadyk Olena O. — MD, PhD, DSc, Professor, Head of Department Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine. ORCID ID: 0000-0002-9912-4286.

Osadcha Oksana I. — PhD, Associate Professor, Senior Researcher of the Department of Burn Trauma, National Scientific Center of Radiation Medicine, Hematology and Oncology of NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine. ORCID ID: 0000-0001-5883-425X.

Kovalenko Olga M. — MD, PhD, DSc, Professor, Department Surgery № 1, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine. ORCID ID: 0000-0002-9636-5383.

Zaritska Valentina I. — Candidate of medical sciences, Associate Professor of the Department of Morphology, Clinical Pathology and Forensic Medicine, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine. ORCID ID: 0000-0002-8837-8213.

Address for correspondence:

Olexandra Lynnyk
E-mail: sandra.linnik@gmail.com

Надійшла до редакції/Received: 03.09.2023

Прийнято до друку/Accepted: 27.10.2023