

Комбінована дія низькодозових рівнів свинцю та цинку на кісткову тканину щурів

Е. М. Білецька, Н. М. Онул, В. В. Калінічева

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро

Забруднення довкілля, як і раніше, залишається актуальною проблемою глобального рівня. Найбільше занепокоєння викликають важкі метали, особливо свинець, який найбільше (до 90–95 %) накопичується в кістковій тканині організму людини.

Мета роботи – встановлення типу біоефекту комбінованої дії низькодозових рівнів свинцю та цинку на щільність кісткової тканини за вмістом у ній кальцію в експерименті.

Матеріали та методи. Для експериментальних досліджень розподілили щурів лінії Wistar на 5 груп. Для визначення типу впливу свинцю та цинку на рівень кальцію в кістковій тканині стегнової кістки визначили кількість останнього методом титрування. Для оцінювання відносин низьких доз цинку зі свинцем визначили коефіцієнт комбінованої дії ($K_{\text{зд}}$) і коефіцієнт зміни ефекту комбінованої дії ($K_{\text{зб}}$).

Результати. Аналіз результатів свідчить, що тип комбінованої дії свинцю та цинку за умови їхнього впливу на щільність кісткової тканини за вмістом у ній кальцію в низьких концентраціях характеризується як антагоністичний, оскільки величина $K_{\text{зд}}$ становила 0,32–0,39. Ефект підгострої комбінованої дії в бінарних системах «ацетат свинцю – хлорид цинку» та «ацетат свинцю – цитрат цинку» ослаблений у 2,6 і 3,1 раза відповідно.

Висновки. Тип комбінованої дії свинцю та цинку в низьких концентраціях, за умови їхнього впливу на щільність кісткової тканини щурів за вмістом у ній кальцію, котрі не перевищують поріг загальнотоксичної дії, характеризується як антагоністичний, оскільки $K_{\text{зд}} = 0,32–0,39$. Ефект підгострої комбінованої дії в бінарних системах «ацетат свинцю – хлорид цинку» та «ацетат свинцю – цитрат цинку» зменшується у 2,6 і 3,1 раза відповідно порівняно з ізольованим їх впливом, що свідчить про активне гальмування сполуками цинку накопичення свинцю кістковою тканиною та є особливо характерним для цитрату цинку.

Ключові слова:
кальцій, свинець, цинк, елементи, кістки.

Запорізький медичний журнал. – 2018. – Т. 20, № 1(106). – С. 101–104

DOI:
10.14739/2310-1210.2018.1.122121

E-mail:
enbelitska@ukr.net

Комбинированное действие низкодозовых уровней свинца и цинка на костную ткань крыс

Э. Н. Белецкая, Н. М. Онул, В. В. Калиничева

Загрязнение окружающей среды по-прежнему остается актуальной проблемой глобального уровня. Наибольшее беспокойство вызывают тяжелые металлы, особенно свинец, который в наибольшей степени (до 90–95 %) накапливается в костной ткани организма человека.

Цель работы – установление типа биоэффекта комбинированного действия низкодозовых уровней свинца и цинка на плотность костной ткани по содержанию в ней кальция в эксперименте.

Материалы и методы. Для проведения экспериментальных исследований распределили крыс линии Wistar на 5 групп. Для определения типа воздействия свинца и цинка на уровень кальция в костной ткани бедренной кости определили количество последнего методом титрования. Для оценки отношений низких доз цинка со свинцом определены коэффициент комбинированного действия ($K_{\text{зд}}$) и коэффициент изменения эффекта комбинированного действия ($K_{\text{из}}$).

Результаты. Анализ полученных результатов показывает, что тип комбинированного действия свинца и цинка при их влиянии на плотность костной ткани по содержанию в ней кальция в низких концентрациях характеризуется как антагонистический, поскольку величина $K_{\text{зд}}$ составляла 0,32–0,39. Эффект подострого комбинированного действия в бинарных системах «ацетат свинца – хлорид цинка» и «ацетат свинца – цитрат цинка» ослаблен в 2,6 и 3,1 раза соответственно.

Выводы. Тип комбинированного действия свинца и цинка в низких концентрациях, при условии их влияния на плотность костной ткани крыс по содержанию в ней кальция, которые не превышают порог общетоксического действия, характеризуется как антагонистический, так как $K_{\text{зд}} = 0,32–0,39$. Эффект подострого комбинированного действия в бинарных системах «ацетат свинца – хлорид цинка» и «ацетат свинца – цитрат цинка» уменьшается в 2,6 и 3,1 раза соответственно по сравнению с изолированным их влиянием, что свидетельствует об активном торможении соединениями цинка накопления свинца костной тканью, что особенно характерно для цитрата цинка.

Ключевые слова:
кальций, свинец, цинк, элементы, кости.

Запорожский медицинский журнал. – 2018. – Т. 20, № 1(106). – С. 101–104

Combined effect of low dose levels of lead and zinc on bone tissue of rats

E. M. Biletska, N. M. Onul, V. V. Kalinicheva

Pollution of the environment remains a pressing problem of the global level. The greatest concern is caused by heavy metals, especially lead, which to the greatest extent – up to 90–95 % accumulates in bone tissue of the human body.

Aim. The establishment of the bioeffect type of low-dose lead and zinc combined action on bone tissue density by the calcium content in it in the experiment.

Key words:
calcium, lead, zinc, elements, bone and bones.

Zaporozhye medical journal 2018; 20 (1), 101–104

Materials and methods. For experimental studies Wistar rats were divided into 5 groups. To determine the type of lead and zinc effect on the calcium level in femur bone tissue the content of the latter by the titration method was identified. To evaluate the relationship between low doses of zinc and lead, the combined action coefficient and change of combined action effect coefficient were determined.

Results. The analysis of the results shows that the type of lead and zinc low concentrations combined action in their influence on bone tissue density by calcium content in it is characterized as an antagonistic, since the combined action coefficient value was 0.32–0.39. The effect of subacute combined action in binary systems “lead acetate – zinc chloride” and “lead acetate – zinc citrate” is weakened by 2.6 and 3.1 times, respectively.

Conclusions. The type of lead and zinc low concentrations combined action provided that they affect the bone tissue density of rats by calcium content in it, which do not exceed the threshold of general toxicity, is characterized as antagonistic, since the combined action coefficient = 0.32–0.39. The effect of subacute combined action in binary systems, “lead acetate – zinc chloride” and “lead acetate – zinc citrate” is reduced by 2.6 and 3.1 times, respectively, compared with their isolated effects, indicating active inhibition of bone tissue lead accumulation by zinc compounds, which is especially characteristic of zinc citrate.

Довкілля – невіддільна складова умов життєдіяльності та існування людини як із погляду прогресу, так і шкідливих його наслідків. Його забруднення, як і раніше, залишається актуальною проблемою глобального рівня, що викликає погіршення середовища проживання та якості життя і негативно впливає на стан здоров'я населення. Найбільше занепокоєння викликають важкі метали, особливо свинець, адже за даними ВООЗ 0,6 % глобального тягаря всіх хвороб зумовлено саме його впливом [14]. Дані провідних науковців із проблеми свинцевої інтоксикації свідчать: найбільше свинець (до 90–95 %) накопичується в кістковій тканині організму людини [1,8,9,11,12]. Поряд з цим відзначимо важливу роль цинку як мікроелемента в кістковому ремоделюванні, 30 % якого (від усього в організмі) кумулюється в кістковій тканині [4].

Мета роботи

Встановлення типу біоефекту комбінованої дії низькодозового рівня свинцю та цинку на щільність кісткової тканини за вмістом у ній кальцію в експерименті.

Матеріали і методи дослідження

Для експериментальних досліджень обрали статевозрілих самиць щурів лінії Wistar з масою тіла 220–270 г. У досліді використані методичні підходи, котрі відповідають сучасним міжнародним вимогам токсикологічних експериментів із використанням тварин згідно з умовами Європейської конвенції [10]. Тварини утримувались на стандартному раціоні. Сформовано 5 груп по 8 щурів у кожній. Нами змодельований комбінований вплив бінарних систем «ацетат свинцю – хлорид цинку» (4 група) та «ацетат свинцю – цитрат цинку» (5 група) та ізольований вплив ацетату свинцю (1 група), хлориду цинку (2 група) та цитрату цинку (3 група) за умов підострого експерименту. Доза ацетату свинцю відповідала 0,05 мг/кг маси тіла, що становить майже 1/30000 LD₅₀ при пероральному його введенні, та не перевищувала загальнотоксичної дії. Дози хлориду цинку та цитрату цинку становили по 1,5 мг/кг маси тіла, що в 7 разів нижче від порогу токсичності. Вводили суміші за допомогою внутрішньошлункового зонда.

Для визначення типу впливу обраних елементів на рівень кальцію в кістковій тканині стегнової кістки визначили кількість останнього методом титрування у

Дніпропетровській філії ДУ «Інститут охорони ґрунтів України» «Держґрунтохорона» [3].

Для оцінювання відносин низьких доз цинку зі свинцем здійснили аналіз комбінованої дії бінарних сумішей «свинець – цинк», за допомогою коефіцієнта комбінованої дії ($K_{\text{кд}}$) згідно з методичними рекомендаціями [5]. Порівняння ефектів впливу на рівень кальцію в кістковій тканині щурів, що спостерігались за комбінованої дії металів, з ефектами ізольованої дії окремих сполук у суміші здійснили за формулою:

$$E_{\text{к}} >, < \sum E_i,$$

де $E_{\text{к}}$ – комбінаційний ефект;

E_i – ефект індивідуальної дії i -ої з n речовин.

Згідно з класифікацією Лево–Лазарева визначені типи комбінованої дії за токсичністю. При $K_{\text{кд}} = 1$ комбінована дія оцінювалась як адитивна (сумація), при $K_{\text{кд}} > 1$ – як потенціювання впливу (синергізм), при $K_{\text{кд}} < 1$ – як ефект менший за адитивний (антагонізм).

Статистичне опрацювання та аналіз результатів виконані за загальноприйнятими методиками з використанням ліцензійних програм статистичного аналізу Statistica v.6.1 (StatSoft Inc., серійний № AGAR909E415822FA) та Microsoft Excel. Результати рівнів кальцію наведені як ($M \pm m$), де M – середнє значення показника, m – стандартна похибка. Вірогідними вважали результати при $p < 0,01$.

Результати та їх обговорення

Результати, що отримали (табл. 1), та їхній аналіз свідчать, що вміст кальцію в кістках при ізольованому введенні цинку збільшився в 1,97–2,83 раза ($p < 0,01$), особливо під час введення цитрату цинку, порівняно з першою групою тварин, середній вміст кальцію у кістках яких становив 78,5 \pm 0,08 мг/г. При комбінованому впливі бінарних систем (4 та 5 груп) рівень кальцію у середньому був вищим на 16,43–22,04 % ($p < 0,01$) від щурів 1 групи, але нижчим в 1,7–2,4 раза ($p < 0,01$) від тварин, яким вводили різні сполуки цинку ізольовано. Порівнюючи результати між 4 та 5 групами, виявили, що рівень кальцію в кістковій тканині вищий на 4,8 % у тварин, яким у комбінації з ацетатом свинцю вводили й цитрат цинку.

Кількісне оцінювання характеру комбінованої дії бінарної суміші «свинець – цинк» за показниками вмісту

кальцію в кістковій тканині наведено на *рисунку 1*. Аналіз результатів свідчить, що тип комбінованої дії свинцю та цинку в низьких концентраціях, які не перевищують поріг загальнотоксичної дії, за умови їхнього впливу на щільність кісткової тканини за вмістом у ній кальцію, характеризується як антагоністичний, оскільки величина $K_{\text{зд}}$ становила 0,32–0,39.

За допомогою коефіцієнта зміни ефекту комбінованої дії ($K_{\text{зе}}$), який аналізувався як відношення комбінаційного ефекту впливу суміші металів до суми ефектів індивідуальної дії і-ої з п речовин у суміші, здійснили оцінювання кратності послаблення (посилення) комбінованого ефекту дії бінарних сумішей металів.

Так, аналіз типу дії цих металів на щільність кісткової тканини за вмістом у ній кальцію та отримані нами результати [2] експериментальних досліджень свідчать про ефект біоантагонізму в системі «свинець – цинк» в умовах їхнього низькодозового впливу на вміст кальцію в кістковій тканині, що підтверджує остеопротекторні властивості цинку за умови свинцевої інтоксикації.

Ефект підгострої комбінованої дії в бінарних системах «ацетат свинцю – хлорид цинку» та «ацетат свинцю – цитрат цинку» ослаблений у 2,6 і 3,1 раза відповідно та свідчить про зниження токсичного впливу свинцю в дозі 0,05 мг/кг на кісткову тканину за одночасного введення органічних і неорганічних форм цинку в дозі 1,5 мг/кг, що особливо характерно при введенні цитрату цинку.

Отже, результати, що отримали, їхнє взаємопорівняння, аналіз і зіставлення з даними наукової літератури дають можливість висунути певні припущення. Так, встановлений біоефект антагонізму свинцю та цинку тотожні даним А. Cantoral, М. М. Téllez-Rojo, Т. Shamah Levy [7], які виявили вплив свинцю на зріст мексиканських дітей за станом цинкового статусу, оскільки цинк є ключовим фактором, який може пом'якшити негативний вплив свинцю на кісткову тканину внаслідок антагоністичних взаємовідносин між елементами. Про біоантагоністичні взаємовідносини між свинцем і цинком роблять висновки й В. Pemmer, А. Roschger, А. Wastl [13], за результатами їхнього дослідження просторового розподілу мікроелементів цинку, стронцію та свинцю в кістковій тканині людини, в якому вивчалися рівні цих елементів та їх кореляція зі ступенем мінералізації. Різноспрямованість дії свинцю та цинку висвітлена й іншими авторами, які визначали їхні рівні в кістковій і хрящовій тканині з подальшим аналізом механізму їх впливу [6].

Отже, встановлені нами біоантагоністичні взаємовідносини між свинцем і цинком кореспондуються з дослідженнями інших науковців.

Висновки

1. Тип комбінованої дії свинцю та цинку в низьких концентраціях, що не перевищують поріг загальнотоксичної дії, на щільність кісткової тканини щурів за вмістом у ній кальцію, характеризується як антагоністичний, оскільки $K_{\text{зд}} = 0,32–0,39$.

2. Ефект підгострої комбінованої дії в бінарних системах «ацетат свинцю – хлорид цинку» та «ацетат свинцю – цитрат цинку» зменшується у 2,6 і 3,1 раза відповідно порівняно з ізольованим їхнім впливом, а це

Таблиця 1. Вміст кальцію в кістковій тканині щурів ($M \pm m$)

П/п групи	Розчини, що вводились тваринам	Результати, що отримали, мг/г
1	ацетат свинцю (Pb_a)	$78,5 \pm 0,08$
2	хлорид цинку (Zn_x)	$155,0 \pm 0,99^*$
3	цитрат цинку/ (Zn_c)	$222,2 \pm 3,0^*$
4	ацетат свинцю (Pb_a) + хлорид цинку (Zn_x)	$91,4 \pm 0,24^{*#}$
5	ацетат свинцю (Pb_a) + цитрат цинку/ (Zn_c)	$95,8 \pm 0,3^{*#}$

*: $p < 0,01$ щодо першої групи; #: $p < 0,01$ щодо другої групи; °: $p < 0,01$ щодо третьої групи за t-критерієм Стюдента.

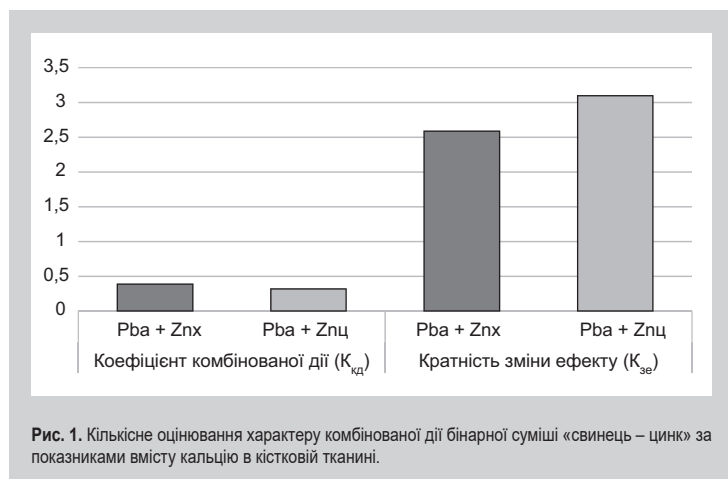


Рис. 1. Кількісне оцінювання характеру комбінованої дії бінарної суміші «свинець – цинк» за показниками вмісту кальцію в кістковій тканині.

свідчить про активне гальмування сполуками цинку накопичення свинцю кістковою тканиною з ефективнішою дією цитрату цинку.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні рівня свинцю, цинку, кадмію, міді з подальшим аналізом взаємодії цих елементів у кістковій тканині.

Список літератури

- Белецкая Э.Н. Формирование остеопатий: эколого-гигиенические аспекты проблемы на современном этапе / Э.Н. Белецкая, О.В. Безуб, В.В. Околова // Медицинские перспективы. – 2015. – Т. 20. – №2. – С. 100–108.
- Білецька Е.М. Порівняльна оцінка біопротекторної дії цинку в органічній та неорганічній формі на остеотропність свинцю в експериментальних умовах / Е.М. Білецька, Н.М. Онул, В.В. Калінічева // Медицинские перспективы. – 2016. – Т. 21. – №4. – С. 123–129.
- ГОСТ 26570-95 Межгосударственный стандарт. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения кальция.
- Дыдыкина И.С. От знаний о структуре костной ткани к выбору средств влияния на нее / И.С. Дыдыкина, П.С. Дыдыкина, А.В. Наумов // Русский медицинский журнал. – 2015. – Т. 23. – №7. – С. 388–390.
- Обґрунтування гігієнічних нормативів шкідливих хімічних речовин у різних середовищах на основі системного підходу: (МБ 1.1.5.088-02) / МОЗ України. – Київ, 2002. – 40 с.
- Differential accumulation of lead and zinc in double-tidemarks of articular cartilage / A. Roschger, J.G. Hofstaetter, B. Pemmer et al. // Osteoarthritis and Cartilage. – 2013. – Vol. 21. – №11. – P. 1707–1715.
- Differential association of lead on length by zinc status in two-year old Mexican children / A. Cantoral, M.M. Téllez-Rojo, T. Shamah Levy et al. // Environ Health. – 2015. – Vol. 14. – P. 95.
- Effects of fluoride and cadmium coexposure on bone in male rats / X. Chen, B. Qin, X. Li, et al. // Biol Trace Elem Res. – 2013. – Vol. 154. – P. 396–402.
- Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation / H. Lu, G. Yuan, Z. Yin, et al. // Int J Clin Exp Pathol. – 2014. – Vol. 7. – P. 640–647.
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 53 p.

- [11] Kupraszewicz E. Excessive ethanol consumption under exposure to lead intensifies disorders in bone metabolism: A study in a rat model / E. Kupraszewicz, M.M. Brzóška // *Chem Biol Interact.* – 2013. – Vol. 203. – Issue 2. – P. 486–501.
- [12] Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination / S. Dai, Z. Yin, G. Yuan et al. // *Environ Toxicol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 36. – Issue 3. – P. 1207–1216.
- [13] Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue / B. Pemmer, A. Roschger, A. Wastl et al. // *Bone.* – 2013. – Vol. 57. – №1. – P. 184–193.
- [14] Ten chemicals of major public health concern. WHO. Access mode: http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/.

References

- [1] Biletska, E. M., Bezub, O. V., & Okolova, V. V. (2015) Formirovanie osteopatii: e'kologo-gigienicheskie aspekty problemy na sovremennom e'tape [Osteopathy development: ecological-hygienic aspects of the problem nowadays (literature review)]. *Medychni perspektivy*, 20(2), 100–108. [in Russian].
- [2] Biletska, E. M., Onul, N. M., & Kalinicheva, V. V. (2016) Porivnialna otsinka bioprotekturnoi dii tsynku v orhanichnii ta neorhanichnii formi na osteotropnist svyntsiu v eksperymentalnykh umovakh [Comparative evaluation of bioprotective action of zinc in organic and inorganic form on osteotropism lead in experimental conditions]. *Medychni perspektivy*, 21(4), 123–129. [in Ukrainian].
- [3] GOST 26570-95 Mezghosudarstvennyy standart. Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredeleniya kal'ciya [GOST 26570-95 Interstate standard. Feed, mixed fodder, feed forage. Methods for the determination of calcium]. [in Russian].
- [4] Dydikina, I. S., Dydikina, P. S., & Naumov, A. V. (2015) Ot znaniy o strukture kostnoj tkani k vyboru sredstv vliyaniya na neyo [From knowledge about the structure of bone tissue to the choice of means of influencing it]. *Russkij medicinskij zhurnal*, 23(7), 388–390. [in Russian].
- [5] Ministerstvo okhorony zdorovia (2002) *Obgruntuvannya hihienichnykh normatyviv shkidlyvykh khimichnykh rehovyn u riznykh seredovyshchakh na osnovi systemnoho pidkhodu: (MV 1.1.5.088-02) [Substantiation of hygienic norms of harmful chemicals in different environments on the basis of the system approach: (MV 1.1.5.088-02)].* Kyiv. [in Ukrainian].
- [6] Roschger, A., Hofstaetter, J. G., Pemmer, B., Zoeger, N., Wobraschek, P., Falkenberg, G., et al. (2013) Differential accumulation of lead and zinc in double-tidemarks of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(11), 1707–1715. doi: 10.1016/j.joca.2013.06.029.
- [7] Cantoral, A., Téllez-Rojo, M. M., Levy, T. S., Hernández-Ávila, M., Schnaas, L., Hu, H., et al. (2015) Differential association of lead on length by zinc status in two-year old Mexican children. *Environ Health*, 14, 95. doi: 10.1186/s12940-015-0086-8.
- [8] Chen, X., Qin, B., Li, X., Jin, T., Zhu, G., Zhou, W., & Wang, Z. (2013) Effects of fluoride and cadmium coexposure on bone in male rats. *Bio Trace Elem Res.*, 154, 396–402. doi: 10.1007/s12011-013-9750-4.
- [9] Lu, H., Yuan, G., Yin, Z., Dai, S., Jia, R., Xu, J., et al. (2014) Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation. *Int J Clin Exp Pathol.*, 7(2), 640–7.
- [10] (1986) European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasburg.
- [11] Kupraszewicz, E., & Brzóška, M. M. (2013) Excessive ethanol consumption under exposure to lead intensifies disorders in bone metabolism: A study in a rat model. *Chem Biol Interact.*, 203(2), 486–501. doi: 10.1016/j.cbi.2013.01.002.
- [12] Dai, S., Yin, Z., Yuan, G., Lu, H., Jia, R., Xu, J., et al. (2013) Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 36(3), 1207–1216. doi: 10.1016/j.etap.2013.10.003.
- [13] Pemmer, B., Roschger, A., Wastl, A., Hofstaetter, J. G., Wobraschek, P., Simon, R., et al. (2013) Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. *Bone.*, 57(1), 184–193. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.038.
- [14] Ten chemicals of major public health concern. WHO. Retrieved from: http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/.

Відомості про авторів:

Білецька Е. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. загальної гігієни, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

Онул Н. М., д-р мед. наук, доцент, професор каф. загальної гігієни, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

Калінічева В. В., аспірант каф. загальної гігієни, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

Сведения об авторах:

Белецкая Э. Н., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. общей гигиены, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Онул Н. М., д-р мед. наук, доцент, профессор каф. общей гигиены, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Калиничева В. В., аспирант каф. общей гигиены, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Information about the authors:

Biletska E. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Hygiene, State Establishment “Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine”, Dnipro.

Onul N. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of General Hygiene, State Establishment “Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine”, Dnipro.

Kalinicheva V. V., Postgraduate Student of the Department of General Hygiene, State Establishment “Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine”, Dnipro.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшло до редакції / Received: 15.08.2017

Після доопрацювання / Revised: 27.11.2017

Прийнято до друку / Accepted: 18.12.2017